

**Identifizierung und Charakterisierung  
eines Vsr-Homologen aus  
*Bacillus stearothermophilus***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Martin Laging**  
aus Celle

Göttingen 2000

**Referent: Prof. Dr. H.-J. Fritz**

**Korreferent: Prof. Dr. G. Braus**

**Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2001**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Über die Bedeutung der DNA-Reparatur.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Postreplikative DNA-Mismatch-Reparatur.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 DNA-Schädigung in nicht-replizierenden Zellen .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Übersicht .....	7
1.3.2 Hydrolytische Desaminierung am Cytosin.....	9
1.3.3 Hydrolytische Desaminierung am 5-Methylcytosin.....	9
1.3.3.1 Bedeutung der Methylierung zum 5-Methylcytosin.....	10
1.3.3.2 Desaminierung an 5-Methylcytosin: Mismatch-spezifische Glykosylasen .....	12
1.3.3.3 Desaminierung an 5-Methylcytosin: Vsp-Reparatur .....	14
<b>1.4 Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Material .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Stämme .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Nährmedien .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Plasmide.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Oligonukleotide .....</b>	<b>23</b>
2.4.1 <i>vsr</i> -Suche und -Klonierung .....	23
2.4.2 Substrate für Spalttests.....	24
2.4.3 Oligonukleotide für Klonierungen .....	25
2.4.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung .....	26
<b>2.5 DNA-Längenstandarts.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Proteinlängenstandarts (BioRad).....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit Protein.....</b>	<b>28</b>
<b>2.9 Enzyme und Proteine.....</b>	<b>29</b>
<b>2.10 Chemikalien.....</b>	<b>29</b>
<b>2.11 Sonstige Materialien und Geräte.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	32
3.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>Bacillus stearothermophilus</i> H3 .....	32
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.2.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation .....	34
3.2.3 Selektion von Klonen mittels X-Gal-Test .....	35
3.2.4 Methoden zur Präparation, Extraktion und Reinigung von DNA .....	35
3.2.4.1 Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen .....	35
3.2.4.2 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen .....	35
3.2.4.3 Phenol/Chloroform-Extraktion.....	36

3.2.4.4 Anreicherung biotinylierter PCR-Produkte mittels paramagnetischer Partikel .....	36
3.2.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	37
3.2.4.6 Reinigung von DNA aus Agarosegelen .....	37
3.2.4.7 Reinigung von Fluorescein-markierten Oligonukleotiden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	38
3.2.4.8 Präparation chromosomaler DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.2.4.9 Präparation chromosomaler DNA aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> H3 .....	38
3.2.4.10 Präparation von Plasmid-DNA .....	39
3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	40
3.2.5.1 SOE-PCR zur Fusionierung von DNA-Fragmenten .....	42
3.2.5.2 Inverted-PCR .....	42
3.2.5.3 Kolonien-Screening mittels PCR .....	42
3.2.6 Enzymatische Modifikation von DNA .....	43
3.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	43
3.2.6.2 Phosphorylierung von DNA-Enden .....	43
3.2.6.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	44
3.2.6.4 Glättung von DNA-Enden .....	44
3.2.6.5 Ligation von DNA-Enden .....	44
3.2.6.6 Markierung von DNA mit DIG-11-dUTP .....	45
3.2.7 Kolonie-Hybridisierung .....	45
3.2.8 Sequenzierung von DNA .....	47
3.2.9 Herstellung von Spaltsubstraten .....	48
3.2.10 Quantitative Detektion Fluorescein-markierter DNA .....	49
3.2.11 Konstruktion genomischer Kosmidbanken .....	49
3.2.12 Subklonierung von Kosmiden als Plasmidbibliotheken .....	51
<b>3.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	52
3.3.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese .....	52
3.3.3 Präparation von Zellextrakten im analytischen Maßstab .....	53
3.3.4 Präparative Gewinnung löslicher Proteine .....	53
3.3.5 Aufreinigung von Proteinen .....	54
3.3.5.1 Fraktionierte Fällung mittels Ammoniumsulfat .....	54
3.3.5.2 IMAC ('immobilized metal affinity chromatography') .....	54
3.3.5.3 Ionenaustauscher- und Heparin-Affinitätschromatographie .....	55
<b>3.4 Enzymatische Aktivitätstests .....</b>	<b>56</b>
3.4.1 Durchführung von Spalttests .....	56
3.4.2 Multiple Substratkinetiken .....	56
3.4.3 Berechnung relativer Geschwindigkeitskonstanten .....	57
3.4.4 Bestimmung kinetischer Konstanten ( $K_m$ , $K_{cat}$ , $v_{max}$ ) .....	59
3.4.5 Berechnung von theoretischen Zeit-Umsatz-Kurven .....	60

<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1 Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Genfragmenten bei Kenntnis nur eines konservierten Aminosäure-Blockes.....	61
4.2 Identifikation eines Fragmentes eines <i>vsr</i> -Homologen aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> ....	67
4.3 Sequenzierung des gesamten <i>vsr</i> -Gens aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	70
4.4 Expression und Aufreinigung der Vsr-Endonuklease aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> ....	72
4.5 Untersuchungen zur Aktivität des Vsr-Homologen aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	75
4.6 Untersuchung des Methylierungsmusters in <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	78
4.7 Untersuchungen zum Substratspektrum .....	80
4.7.1 Methylierungsmuster-abgeleitete Substrate .....	80
4.7.2 Erweiterung des Substratsatzes .....	83
4.8 Untersuchung der Spaltaktivität mit anderen DNA-Substraten .....	88
4.8.1 Spaltung von U/G.....	88
4.8.2 Spaltung an Thymin gepaart mit Adenin, Cytosin und Guanin .....	89
4.8.3 Überprüfung auf Spaltung des unteren Stranges .....	90
4.9 Bestimmung kinetischer Konstanten .....	91
4.10 Stabilität von Vsr. <i>Bst</i> .....	94
4.11 Sequenzumgebung des <i>vsr</i> -Gens aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	95
4.11.1 Konstruktion einer Kosmid-Bank von <i>Bacillus stearothermophilus</i> H3.....	95
4.11.2 Identifikation <i>vsr</i> -tragender Kosmide .....	96
4.11.3 Sequenzierung eines <i>vsr</i> -tragenden Kosmids.....	97
4.12 MutS- und MutL-Homologe aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	98
4.12.1 Expression und Aufreinigung des MutL-Homologen .....	I
4.12.2 Klonierung des MutS-Homologen .....	101
4.12.3 Expression und Aufreinigung des MutS-Homologen .....	I
4.12.4 Überprüfung des Einflusses von MutL und MutS auf die Aktivität von Vsr. <i>Bst</i> .....	105
4.13 ‚Alignment‘ Vsr-Homologer, Betrachtungen zur Struktur von Vsr. <i>Bst</i> .....	106
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>111</b>
<b>6. Literaturliste</b> .....	<b>113</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>I</b>
7.1 Abkürzungen.....	I
7.2 Nukleotidsequenz von MutS und MutL aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	II
7.3 Lebenslauf .....	VI

# 1. Einleitung

## 1.1 Über die Bedeutung der DNA-Reparatur

Die genetische Information wird in allen zellulären Lebewesen in Form von hochmolekularen Nukleinsäuren, der DNA, gespeichert. Die Zellen sind mit zwei wesentlichen Problemen konfrontiert: Zum einen setzt die Weitergabe der genetischen Information von Generation zu Generation eine hohe Genauigkeit der Replikation voraus, um sie vor einem ‚Verrauschen‘ zu bewahren. Der Anspruch an die Genauigkeit der Replikation wächst dabei mit zunehmender Genomgröße, was sich in einer wachsenden Komplexität der beteiligten enzymatischen Mechanismen niederschlägt (Abschnitt 1.2). Zum anderen ist nichtreplizierende DNA in den Zellen ständigen physikalischen und chemischen Einflüssen exogener und endogener Natur ausgesetzt, die eine Veränderung ihrer Struktur bewirken können (Abschnitt 1.3). Jede nicht replizierende Zelle wendet daher einen großen Anteil ihrer Stoffwechselenergie für eine dauernde Pflege der DNA auf. Diese Pflege zum Erhalt der genetischen Information erfolgt durch Reparaturmechanismen, die unterschiedlichsten Formen der DNA-Schädigung entgegenwirken. Auch die Ansprüche an diese Reparaturmechanismen steigt dabei mit zunehmender Genomgröße. Ein Beispiel verdeutlicht diesen Zusammenhang: In DNA kann es durch Hydrolyse der glykosydischen Bindung, bevorzugt an Purinen, zum spontanen Verlust von Basen kommen. Die Häufigkeit dieses Ereignisses liegt in Zellen von *Escherichia coli* bei etwa einem Basenverlust pro Generation. In menschlichen Zellen mit einem bedeutend größerem Genom erfolgen zwischen 2.000 und 10.000 Basenverluste pro Tag (Lindahl und Nyberg, 1972; Lindahl, 1993).

Bei vielzelligen Organismen ist der Erhalt der genetischen Information von direkter Bedeutung für das Überleben des Individuums. Die kumulative Anhäufung von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Genen, die direkt in DNA-Reparaturwegen mitwirken, führt zur Entartung von Zellen und der Ausprägung von Krebs. Allen Organismen ist jedoch gemeinsam, daß die Überlebensfähigkeit der Spezies von einer evolutiven Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen abhängt. Dies setzt eine gewisse genetische Variabilität innerhalb der Population voraus. Hieraus ergibt sich, daß eine unendliche Genauigkeit beim Erhalt und der Weitergabe der

Erbinformation, die schon aus energetischen Gründen unmöglich ist, auch unter evolutiven Gesichtspunkten nicht sinnvoll ist. Mit Hilfe von Modellerchnungen wurde von Eigen 1987 gezeigt, daß ein von der Genomgröße abhängiger Schwellenwert der Fehlerrate existiert. Wird dieser Wert überschritten, so ‚zerschmilzt‘ die Information innerhalb weniger Generationen. Man findet, daß sich speziesabhängige Fehlerraten evolviert haben, die oftmals nahe dieses Schwellenwertes liegen (Eigen, 1971; Eigen, 1987).

## 1.2 Postreplikative DNA-Mismatch-Reparatur

Am Beispiel von *Escherichia coli* sollen die verschiedenen Mechanismen aufgezeigt werden, welche die Genauigkeit der DNA-Replikation bestimmen. Der Primäreinbau von Nukleotiden im Zuge der Genomreplikation in *Escherichia coli* erfolgt durch die DNA-Polymerase III. Die Fehlerrate beträgt dabei durch konformationell bevorzugten Einbau korrekt gepaarter Basen etwa  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  (Kunkel und Bebenek, 1988). Die physikalisch-chemische Diskriminierung zwischen Watson-Crick-Basenpaarungen und nichtkomplementären Paarungen aufgrund der Differenz der freien Energie von etwa 10 kJ/mol leistet dabei einen Beitrag von etwa  $10^{-1}$  bei  $10^{-2}$  (Pitha *et al.*, 1968; Loeb und Kunkel, 1982; Wong *et al.*, 1990). Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase („*proof reading*“) entfernt falsch eingebaute Nukleotide und erhöht die Genauigkeit der Replikation um einen Faktor von etwa  $10^2$  (Kunkel, 1992), womit somit der Primäreinbau mit einer Fehlerrate von  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  erreicht wird. Verbleibende fehlgepaarte Basen sowie kurze Insertionen oder Deletionen von bis zu vier Basen sind Substrate der postreplikativen DNA-Mismatch-Reparatur. Dieser Mechanismus erhöht die Genauigkeit nochmals um einen Faktor von etwa  $10^3$ , sodaß schließlich die Replikation in *Escherichia coli* mit einer Fehlerrate von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  erreicht wird (Radman *et al.*, 1981; Carroll und Benkovic, 1990). Dies bedeutet, daß bei einer Genomgröße von  $4.6 \cdot 10^6$  Basen alle 200 Zellteilungen eine Base falsch inkorporiert wird.

Die Schlüsselenzyme der postreplikativen DNA-Reparatur sind MutS und MutL. Die Initiation der Reparatur erfolgt durch Bindung eines MutS-Homodimers (Su und Modrich, 1986). Die Bindung von verschiedenen Fehlpaarungen sowie Insertionen und Deletionen bis zu vier Basen durch MutS wurde *in vitro* untersucht (Su und Modrich, 1986; Su *et al.*, 1988; Jiricny *et al.*, 1988; Parker und Marinus, 1992; Prolla *et al.*, 1994). In Gelshift-Experimenten mit Proteinen aus *Escherichia coli* konnte die

Stimulation der Bindung von MutS durch MutL gezeigt werden, ein Komplex mit MutS wurde hierbei allerdings nicht detektiert (Drotschmann *et al.*, 1998). Weiterhin wurden *in vivo*-Reparatureffizienzen verschiedener Heteroduplices in *Escherichia coli* und in *Saccharomyces cerevisiae* gemessen. In diesen Experimenten konnte eine mittlere bis gute Reparatureffizienz für G/T-, G/G-, A/C-, A/A-, A/G-, T/T- sowie T/C-Fehlpaarungen gezeigt werden, während C/C-Fehlpaarungen sowie eine 38-Basenpaar-Insertion nur schlecht repariert wurden (Kramer *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1987; Kramer *et al.*, 1989). Die Bindungseffizienz *in vitro* korrelierte dabei in etwa mit den Reparatureffizienzen *in vivo*. Nach Bindung der Fehlpaarung kommt es unter ATP-Verbrauch zu einer beidseitigen Translokation entlang der DNA. Dabei wird eine Schleife gebildet, auf welcher die Fehlpaarung lokalisiert ist. Diese Translokation wird durch MutL stimuliert (Haber und Walker, 1991; Modrich, 1991; Allen *et al.*, 1997). Elektronenmikroskopische Daten sprechen dafür, daß MutL hier als Homodimer mit dem MutS-DNA-Komplex assoziiert ist.

Die Translokation erfolgt bis zum Erreichen einer GATC-Sequenz. Diese sind das Substrat der DNA-Adenin(N6)-Methyltransferase (Dam) und sind in ruhenden *Escherichia coli*-Zellen beidsträngig methyliert. Die transiente Hemimethylierung nach der Replikation erlaubt in einem gewissen Zeitfenster eine Diskriminierung zwischen parentalem und neusynthetisiertem Strang (Marinus, 1976; Szyf *et al.*, 1986). Das MutH-Protein, eine schwache Endonuklease mit struktureller Homologie zu Endonukleasen des Typs II, spaltet nach Aktivierung durch den MutL-MutS-DNA-Komplex 5' des Guanins des unmethylierten Stranges (Welsh *et al.*, 1987; Au *et al.*, 1992; Sancar und Hearst, 1993; Ban und Yang, 1998a). Je nach Lage der Fehlpaarung zum Schnitt kommt es dann zu einem exonukleolitischem Abbau des die fehleingebaute Base enthaltenden Stranges. Ein Abbau in 5'→3'-Richtung erfolgt durch Exonuklease VII (Chase und Richardson, 1974; Cooper *et al.*, 1993) oder RecJ (Lovett und Kolodner, 1989; Cooper *et al.*, 1993), ein Abbau in 3'→5'-Richtung erfolgt durch Exonuklease I (Cooper *et al.*, 1993). Das einzelsträngige Substrat für diesen Abbau wird durch eine Entwindung der DNA durch Helikase II erzeugt (Modrich, 1991; Grilley *et al.*, 1993). Die Beladung der DNA mit Helikase II wird von MutL vermittelt (Dao und Modrich, 1998, Yamaguchi *et al.*, 1998). Der Abbau erfolgt bis wenige Nukleotide über die Schadensstelle hinweg (Su *et al.*, 1989). Der abgebaute Strang wird von der DNA-Polymerase III resynthetisiert und der verbleibende Strangbruch durch DNA-Ligase geschlossen (Lahue *et al.*, 1989).



MutL scheint der Koordinator der postreplikativen Mismatch-Reparatur zu sein: Die Erkennung der Fehlpaarung durch MutS, die Translokation entlang der DNA, die Spaltung durch MutH sowie die Beladung der DNA mit Helikase II werden durch MutL stimuliert. Dabei konnte in keinem Fall ein stabiler Komplex von MutL und den beteiligten Proteinen nachgewiesen werden. Damit scheint das MutL-Protein als ‚*molecular matchmaker*‘ zu fungieren (Sancar, 1993). Mögliche Mechanismen dieser Funktion wurden im Wesentlichen durch strukturelle Aufklärung eines N-terminalen Fragmentes gefunden. MutL agiert als Homodimer, die Dimerisierung wird von der C-terminalen Region vermittelt (Pang *et al.*, 1997; Drotschmann *et al.*, 1998). Ein N-terminaler Bereich von etwa 300 Aminosäuren ist in der Familie der MutL-Homologen konserviert. Zunächst gelang die Aufklärung der Struktur eines 40 kDa N-terminalen Fragmentes des MutL aus *Escherichia coli* (Ban und Yang, 1998b). Es weist strukturelle Ähnlichkeiten zu einem ATPase-Fragment der DNA Gyrase B-Untereinheit und zu einer ATP-Bindedomäne von Hsp90 auf (Wigley *et al.*, 1991; Prodromou *et al.*, 1997; Stebbins *et al.*, 1997; Ban und Yang, 1998b). Die Bindung von ATP führt zu einer Dimerisierung des N-terminalen Fragmentes. Im intakten MutL führt die Bindung von ATP durch das MutL-Dimer zu einer signifikanten Verringerung des Stoke-Radius (Ban und Yang, 1998b). Die Strukturaufklärung des N-terminalen Fragmentes mit gebundenem ADP und ADPnP zeigte dann im Detail die Konsequenzen der Kompaktierung des MutL durch Bindung von ATP. Die Autoren postulieren, daß die Bindung von ATP zur Bildung zweier potentieller Bindungsstellen für Protein-Protein-Interaktionen führt. Eine dieser Bindungsstellen wird aufgrund ihrer Form als mögliche Interaktionsstelle mit MutH in Betracht gezogen, die zweite könnte zur Interaktion mit MutS dienen. Die Hydrolyse des ATP zu ADP führt dazu, daß die Dimerisierung der N-terminalen Bereiche aufgehoben wird. Die schwache ATPase-Aktivität des MutL ( $k_{\text{cat}}=0.4 \text{ min}^{-1}$ ) wird in Anwesenheit von ssDNA um einen Faktor von 3- bis 7-fach stimuliert. Während des Reparaturprozesses existiert ssDNA z.B. während des exonukleolytischen Abbaus nach Schneiden des einen Stranges durch MutH. Es ist daher denkbar, daß die ssDNA-abhängige ATPase-Aktivität von MutL eine Rolle spielt bei der Transition eines Reparatur-Initiationskomplexes zu einem Prozessierungs-Komplex (Ban und Yang, 1998b; Ban *et al.*, 1999).

Der Mechanismus der postreplikativen DNA-Mismatch-Reparatur ist quasi ubiquitär, Homologe dieser Proteine finden sich in Bakterien-, Pflanzen- und Säugerzellen. In

eukaryotischen Zellen erfolgt diese Reparatur durch mehrerer MutS- und MutL-Homologe, welche hier nicht als Homo-, sondern als Heterodimere agieren. So wurden in *Saccharomyces cerevisiae* sechs MutS-Homologe sowie vier MutL-Homologe (PMS1, MLH1-3) identifiziert (MSH1-6; Kramer *et al.*, 1989; Reenan und Kolodner, 1992; Prolla *et al.*, 1994; Ross-MacDonald und Roeder, 1994; Hollingsworth *et al.*, 1995). Die Reparatur von Fehlpaarungen und Insertionen/Deletionen erfolgt hier mit unterschiedlicher Effizienz durch Heterodimere der MutS- und der MutL-Homologe: Msh2 kann einen Komplex mit Msh3 oder Msh6 bilden. Der Msh2-Msh6-Komplex scheint dabei hauptsächlich für die Reparatur von Fehlpaarungen sowie kleineren Insertionen/Deletionen, der Msh2-Msh3-Komplex für die Reparatur von größeren Insertionen/Deletionen verantwortlich zu sein (Marsischky *et al.*, 1996; Alani, 1996; Lühr *et al.*, 1998). An den Reparaturprozessen scheinen auch die MutL-Homologen in Form unterschiedlicher Homodimere mitzuwirken. Die Stimulation der Bindung des Msh2/3-Heterodimers an einen kleinen Loop durch ein Heterodimer aus Pms1 und Mlh1 konnte gezeigt werden (Habraken *et al.*, 1997). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Beteiligung eines Mlh1-Mlh3-Heterodimers an der Msh2-Msh3-vermittelten Reparatur (Flores-Rozas und Kolodner, 1998). In menschlichen Zellen wurden ebenfalls eine Vielzahl von MutS- und MutL-Homologen gefunden (Leach *et al.*, 1993; Fishel *et al.*, 1994; Nicolaides *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994; Kolodner *et al.*, 1995). Ähnlich zur Situation in *Saccharomyces cerevisiae* findet man hier zwei heterodimere Komplexe der MutS-Homologen (hMSH2/6, genannt hMutS $\alpha$ , und hMSH2/3, genannt hMutS $\beta$ ), welche eine ähnliche Präferenz für die Reparatur unterschiedlicher Schäden zeigen (Hughes und Jiricny, 1992; Drummond *et al.*, 1995; Karran, 1995; Acharya *et al.*, 1996; Palombo *et al.*, 1996; Genschel *et al.*, 1998; Marra *et al.*, 1998). Ebenfalls werden verschiedene Heterodimere der MutL-Homologen hMLH1, hPMS1 und hPMS2 gefunden (Prolla *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1998). In der Pflanze *Arabidopsis* wurde kürzlich ein dritter heterodimerer MutS-Komplex beschrieben (AtMSH2/7), der von den Bindungspräferenzen der oben beschriebenen Komplexe abweicht. Ersten Versuche machen eine Spezialisierung auf die Reparatur von T/G-Fehlpaarungen denkbar (Culligan und Hays, 2000).

Wie oben erwähnt, erfolgt die Strangdiskriminierung in *Escherichia coli* methylierungsinstruiert. Die Diskriminierung in anderen Organismen ist nicht bekannt, allerdings gibt es Hinweise darauf, daß dies auf zwei Arten geschieht: Die Replikation des ‚lagging strand‘ erzeugt auf dem neusynthetisierten Strang Okazaki-Fragmente,

sodaß etwa alle 2.000 Basen ein ‚nick‘ vorliegt. Diese können als Strangdiskriminierungs-Signal dienen. Diese Hypothese wird von der Beobachtung unterstützt, daß beispielsweise in *Escherichia coli* eine einzige Strangunterbrechung die Reparatur von Fehlpaarungen unabhängig von der Anwesenheit von MutH macht (Au *et al.*, 1992). Im Falle der ‚leading strand‘-Synthese könnte die Reparatur durch Kopplung mit der Replikationsmaschinerie erfolgen. Evidenzen dafür liefern Hinweise auf eine Interaktion von PCNA mit Proteinen der Mismatch-Reparatur (Umar *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2000; Flores-Rozas *et al.*, 2000). Der Mechanismus der Strangunterscheidung ist allerdings bisher nur am Modell von *Escherichia coli* aufgeklärt. Die hier gefundene methylinstuierte Unterscheidung ist jedoch als Sonderfall zu betrachten und wird in dieser Form nur im nahe verwandten *Salmonella typhimurium* gefunden.

In den vergangenen Jahren wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Defekten in Genen der Mismatch-Reparatur und der Tumorentstehung im Menschen gefunden. So wurden Defekte in hMSH2 (Fishel *et al.*, 1994; Bronner *et al.*, 1994; Leach *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995), in hMSH3 (Orimo *et al.*, 2000) und in hMLH1 (Bronner *et al.*, 1994; Papadopoulos, 1994; Kane *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 1998) mit der Entstehung von HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) in Verbindung gebracht. Defekte in hMLH1 stehen offenbar ebenfalls in Verbindung zur Entstehung von Leukämie (Hangaishi *et al.*, 1997).

## 1.3 DNA-Schädigung in nicht-replizierenden Zellen

### 1.3.1 Übersicht

Ruhende DNA ist in den Zellen dauerhaften exogenen und endogenen Einflüssen ausgesetzt, die eine Schädigung dieses Moleküles bewirken können. Diese Schäden können zur Entstehung prämutagener Läsionen führen, welche, wenn sie nicht repariert werden, im Zuge einer Replikation als Mutation fixiert werden. Andere Schäden führen zu einem Arrest von Transkription oder Replikation und können auf diese Weise die Integrität einer Zelle gefährden.

Zu den exogenen Einflüssen, welche DNA-Schäden herbeiführen können, zählen ionisierende Strahlung, UV-Strahlung sowie Chemikalien. Ionisierende Strahlung, z.B. in Form von Röntgenstrahlen, führt zu Strangbrüchen, Schädigungen von Basen oder kovalenten Verknüpfungen von DNA und Proteinen. Diese sind auf direkte Treffer der DNA oder auf sekundäre Reaktionen mit reaktiven Molekülen, die hauptsächlich durch Radiolyse des Wassers erzeugt werden, zurückzuführen. Eine Reparatur erfolgt, je nach Schadensform, durch Excision geschädigter Basen oder durch Rekombination mit einem intakten DNA-Molekül. UV-Strahlung kann eine kovalente Verknüpfung von benachbarten Pyrimidinen auslösen (Cyclobutan-Produkte oder 6-4-Photoproducte). Diese bewirken einen Arrest des Replikationsapparates. Derartige Schäden können durch die Aktion von Photolyasen oder durch die Nukleotid-Excisions-Reparatur behoben werden. Der Angriff exogener Chemikalien auf die DNA kann verschiedenste Arten der Schädigungen hervorrufen. Alkylierende Agenzien können zur Modifikation von Basen führen, die zu einem Basenverlust führen kann. Andere Chemikalien reagieren mit der DNA (z. B. Benzpyrene), interkalieren in DNA (z. B. Ethidiumbromid) oder führen zur Verknüpfung von DNA-Strängen (z. B. Psoralene). Die Zellen begegnen diesen Schäden mit Basen- und Nukleotid-Excisionsreparatur sowie durch Rekombination vermittelter Reparatur. Eine Übersicht zu den hier nur angeschnittenen Arten der Schädigung findet sich bei Friedberg, 1985.

Endogene Schädigungen der in den Zellen liegenden DNA werden durch reaktive oxidierende Spezies, alkylierende Agenzien und durch Hydrolyse verursacht. Oxidierende Agenzien entstehen intrazellulär im Wesentlichen als Nebenprodukte der Atmung. Es handelt sich dabei um Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und

Sauerstoffradikale. Die häufigste Schädigung ist dabei die Konversion von Guanin zu 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG). Diese modifizierte Base paart sowohl mit Adenin als auch mit Cytosin, sodaß es bei Nichtreparatur zu G/C→T/A-Transversionen kommen kann. Oxidativ geschädigte Basen werden von speziellen Glykosylasen in einer Basenexcisionsreparatur entfernt.

Die Anwesenheit des zelleigenen Methylgruppen-Donors S-Adenosyl-Methionin kann zu spontanen Methylierungen führen, beispielsweise an der Position O<sup>6</sup> des Guanins oder N<sup>3</sup> des Adenins. Derartige Schäden werden durch Basenexcision repariert. Es existieren auch sogenannte ‚Selbstmord‘-Proteine, wie die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase, welche die Methylgruppe auf sich selbst übertragen und so eine Reparatur der Base erzielen.

Eine permanente Gefährdung der Integrität der DNA geht von dem sie umgebenden Wasser aus. Durch spontane Hydrolyse der glykosydischen Bindung kommt es zu Basenverlusten und der Bildung sogenannter AP-‚sites‘. Diese apurinischen/apyrimidinischen Stellen liegen zu einem gewissen Anteil in der offenen aldehydischen Konformation vor, die eine erleichterte Strangbruch-Reaktion bewirkt. Eine Reparatur derartiger Schäden wird durch die Aktion der AP-Lyasen und Phosphodiesterasen initiiert. Eine weitere Form der Schädigung stellt die spontane hydrolytische Desaminierung exocyclischer Aminogruppen dar. Diese führt im Falle von Adenin zu Hypoxanthin, von Guanin zu Xanthin, von Cytosin zu Uracil und von 5-Methylcytosin zu Thymin. Erstere beiden Schädigungen werden von Glykosylasen in einer Basenexcisionsreparatur behandelt. Für einen Überblick der bisher dargestellten Schädigungs- und Reparaturmechanismen sei wiederum auf Friedberg, 1985, verwiesen. Auf die Behandlung der Desaminierungsschäden an Cytosin sowie an 5-Methylcytosin wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

### 1.3.2 Hydrolytische Desaminierung am Cytosin

Die Desaminierungsrate von Cytosin zu Uracil wurde zunächst durch Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion bei erhöhten Temperaturen gemessen. Anschließend wurde die Desaminierungsrate unter physiologischen Bedingungen errechnet (Lindahl und Nyberg, 1974; Ehrlich *et al.*, 1990). Diese Daten wurden später in einem genetischen ‚*assay*‘, welcher auf die Messung der Desaminierungsrate eines einzelnen Cytosins im *lacZ*-Gen aus *Escherichia coli* beruht, bestätigt (Frederico *et al.*, 1990). Demnach beträgt die Halbwertszeit eines Cytosins in ssDNA bei 37 °C und pH 7.4 etwa 200 Jahre, für dsDNA ist die Halbwertszeit mit 30.000 Jahren bestimmt. Die etwa 40fach höhere Rate der Cytosindesaminierung in *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich mit *Escherichia coli* kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß in Eukaryoten die DNA während der Transkription für längere Zeit in einzelsträngiger Form vorliegt (Impellizzeri *et al.*, 1991). Durch eine hydrolytische Desaminierung des Cytosins entsteht Uracil. Dieses paart mit Adenin, sodaß es im Zuge einer Replikation zu C/G→T/A-Transitionen kommen kann. Uracil als DNA-fremde Base wird in *Escherichia coli* effektiv durch die Aktion der Uracil-DNA-N-Glykosylase entfernt. Die verbleibende AP-, ‚site‘ wird von AP-Lyasen erkannt und weiterprozessiert (Lindahl, 1974; Lindahl *et al.*, 1977).

Homologe der Uracil-DNA-N-Glykosylase wurden in vielen Organismen entdeckt. Dieser Reparaturweg scheint sich zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Evolution entwickelt zu haben. Es wird vermutet, daß sich die Verwendung von Thymin anstelle des in RNA verwendeten Uracils mit der Entstehung größerer Genome etabliert hat, um das Produkt einer hydrolytischen Schädigung des Cytosins als DNA-fremde Base erkennen und somit effizienter reparieren zu können (Coulondre *et al.*, 1978; Eigen, 1987).

### 1.3.3 Hydrolytische Desaminierung am 5-Methylcytosin

Eine weit verbreitete Modifikation des Cytosins stellt die Methylierung an Position C<sup>5</sup> zum 5-Methylcytosin dar, die auch als ‚fünfte Base‘ der DNA bezeichnet wird. Die Bedeutung dieser Modifikation wird im Abschnitt 1.3.3.1 behandelt. Eine Desaminierung des 5-Methylcytosins führt zu Thymin, einer natürlicherweise in DNA vorkommenden Base. Diese bildet mit Guanin eine ‚*wobble*‘-Basenpaarung aus. Diese prämutagene Läsion führt im Falle der Nichtreparatur zu einer C/G→TA-Transition

im Zuge der Replikation. Die spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin erfolgt etwa 2- bis 4-fach schneller als die des Cytosin, für dsDNA ist der Faktor 2.2fach (Ehrlich *et al.*, 1990; Lindahl, 1993; Shen *et al.*, 1994). Ein alternativer Weg der Desaminierung wurde der aktiven Entfernung von Methyltransferasen unter Mangel des Methyl donors S-Adenosly-Methionin in Betracht gezogen, nachdem diese Reaktion für einige dieser Enzyme *in vitro* gezeigt werden konnte (Shen *et al.*, 1992; Wyszynski *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). *In vivo*-Untersuchungen zeigten jedoch, daß dieser Mechanismus in *Escherichia coli* sowie in menschlichen Zellen höchstens eine untergeordnete Rolle spielen sollte (Wyszynski *et al.*, 1994; Schmutte *et al.*, 1996). Die Reparatur der aus der Desaminierung von 5-Methylcytosin resultierenden T/G-Fehlpaarung stellt die Zelle vor zwei Probleme: Zum ersten handelt es sich bei der ‚geschädigten‘ Base um eine natürlicherweise in DNA vorkommende Base, zum zweiten stellt sich nach Erkennung der Fehlpaarung das Problem der Richtung der Reparatur. Ein Mechanismus der Reparatur dieses Schadens muß stets das Thymin entfernen. Zwei Wege, die sich zur Lösung dieses Problems evolviert haben, werden in den Abschnitten 1.3.3.2 und –3 behandelt.

### 1.3.3.1 Bedeutung der Methylierung zum 5-Methylcytosin

Die Methylierung an 5'-Position des Cytosins ist unter Bakterien weit verbreitet (Vanyushin, 1968). Die Modifikation erfolgt in *Escherichia coli* K12 durch die Aktion der DNA-Cytosin-Methyltransferase. Das zugehörige Gen *dcm* liegt auf der genetischen Karte von *Escherichia coli* bei 43 min (Marinus, 1973) und findet sich ebenfalls auf dem Genom des Phagen  $\lambda$ 25D8. Das Enzym methyliert alle inneren Cytosine der Sequenz CC<sup>A</sup>/TGG, der Gehalt der DNA an 5-Methylcytosin liegt in *Escherichia coli* K12 damit bei 1%. Der Mechanismus der Methylierung konnte durch Untersuchungen mit einem Substrat aufgeklärt werden, welches anstelle des inneren Cytosins der Erkennungssequenz ein 5-Fluorcytosin enthält. Es kommt zur Addition der Sulfhydryl-Gruppe eines Cysteins des aktiven Zentrums an die C<sup>5</sup>-C<sup>6</sup>-Doppelbindung des Cytosins unter Aktivierung des C<sup>5</sup>-Atoms, auf welches die Methylgruppe des Donors S-Adenosylmethionin übertragen wird. Dazu wird das zu modifizierende Cytosin wahrscheinlich aus der DNA herausgedreht, wie in der Struktur der Cytosin-Methyltransferase *HhaI* aus *Haemophilus haemolyticus* beobachtet wird (Hanck *et al.*, 1993; Klimasauskas *et al.*, 1994). Die Methylierung von Basen wird in Prokaryoten meist mit einem Schutz vor Fremd-DNA z. B. von

Viren in Verbindung gebracht. Oftmals werden Restriktions-Modifikations-Systeme gefunden, wobei eine Methyltransferase in Nachbarschaft einer Restriktionsendonuklease gefunden wird. Beide Enzyme weisen dieselbe Sequenzspezifität auf, wobei die Restriktionsendonuklease methylierte DNA nicht schneiden kann. Somit ist die eigene DNA vor Abbau geschützt (Dörfler, 1991). Im Falle der Dcm-Methylierung in *Escherichia coli* findet man jedoch keine zugehörige Restriktionsendonuklease, und *dcm*<sup>-</sup>-Zellen weisen keinen erkennbaren Phänotyp auf (Marinus und Morris, 1973). Daß die Dcm-Methylierung trotzdem beibehalten wurde, muß in irgend einer Form von Bedeutung sein. Konsequenzen, die sich aus der Dcm-Methylierung ergeben, und mögliche Erklärungsansätze werden in Abschnitt 1.3.3.3 angesprochen.

In höheren Eukaryoten ist die Modifikation zum 5-Methylcytosin ebenfalls weit verbreitet. In Säugerzellen sind etwa 3 bis 4 % der Cytosine methyliert. Die Methylierung findet an CpG-Dinukleotiden statt; die zu 60 bis 90 % in methylierter Form vorliegen (Riggs und Jones, 1983; Bird, 1992). Allerdings finden sich sogenannte CpG-Inseln, die sich durch eine erhöhte Frequenz von CpG-Dinukleotiden auszeichnen, im Bereich etwa der Hälfte aller menschlichen Gene. Diese sind frei von Methylierung, und es wird angenommen, daß dieser Status mit transkriptioneller Aktivität oder der Möglichkeit der Transkription einhergeht (Bird, 1987; Bird, 1992). Methylierung dieser CpG-Inseln wird auf dem inaktivierten X-Chromosom weiblicher Zellen gefunden und mit ‚genomic imprinting‘ in Verbindung gebracht (Shapiro und Mohandas, 1983; Li *et al.*, 1993; Panning und Jaenisch, 1996). Die Methylierung von CpG-Inseln im Bereich von Genen, die in normalem Gewebe unmethyliert vorliegen, wurde mit einigen Formen von Krebs in Verbindung gebracht (Jones, 1996; Baylin *et al.*, 1998; Jones und Laird, 1999). Unter ihnen befindet sich auch hMLH1 in Verbindung mit HNPCC (Kane *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 1998). Die Unterdrückung der Transkription scheint dabei durch Remodellierung der lokalen Chromatin-Struktur zu erfolgen. Für das 5-Methylcytosin-Bindeprotein MeCP2 konnte eine Interaktion mit Histon-Deacetylase gezeigt werden (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Eine Deacetylierung der N-terminalen Region von Histonen wird allgemein mit der Etablierung einer ‚repressiven Chromatinstruktur‘ in Verbindung gebracht (Kass *et al.*, 1997).

Die Modifikation zum 5-Methylcytosin bedeutet für Zellen ein erhöhtes Risiko der Mutation. 5-Methylcytosin als ‚hotspot‘ für Mutationen wurde zuerst in *Escherichia*



*coli* gefunden (Coulondre *et al.*, 1978). Dies scheint vor allem an der langsamen Reparatur der bei der Desaminierung entstehenden T/G-Fehlpaarungen zu liegen (Lutsenko und Bhagwat, 1999). In menschlichen Zellen sind CpG-Dinukleotide um den Faktor 5 unterrepräsentiert (Sved und Bird, 1990; Bird, 1992). Auch dieser Befund wird mit einer ineffizienten Reparatur von Hydrolyseschäden an 5-Methylcytosin in Verbindung gebracht (Waters und Swann, 2000). Etwa 35 % der mit Gendefekten verbundenen Punktmutationen beim Menschen werden auf diese Art von Schädigung zurückgeführt (Cooper und Krawczak, 1990). Untersuchungen tumorspezifischer Mutationsspektren in p53 geben zudem Hinweise darauf, daß methylierte CpG-Dinukleotide auch bevorzugte Ziele exogener Schädigungen sind, die zu einem gehäuften Auftreten von C/G→TA-Transitionen führen. Weiterhin werden aberrante Methylierungsmuster zunehmend mit Alterungsprozessen in Verbindung gebracht (Issa *et al.*, 1994; Ahuja *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999)

#### **1.3.3.2 Desaminierung an 5-Methylcytosin: Mismatch-spezifische Glykosylasen**

DNA-Glykosylasen reparieren ein breites Spektrum an DNA-Schäden. Ihre Beteiligung an der Entfernung von von geschädigten Basen wurde in 1.3.1 angesprochen. Der prominenteste Vertreter, der auch am weitesten verbreitet ist, ist die Uracil-DNA-N-Glykosylase, welche Uracil aus DNA entfernt (1.3.2). Eine weitere Glykosylase ist MutY, welche in *Escherichia coli* an der Reparatur oxidativer Schädigung von Guanin beteiligt ist. MutY entfernt Adenin aus A/G- und A/8-oxoG-Fehlpaarungen (Michaels *et al.*, 1992)(1.3.1). Es handelt sich bei beiden Vertretern um monofunktionale Glykosylasen, welche im Gegensatz zu bifunktionalen Glykosylasen, wie Endonuklease III, die AP-,*site*' nach Spaltung der glykosydischen Bindung nicht weiterprozessieren. Die resultierende AP-,*site*' wird von AP-Endonukleasen gespalten und im Weiteren durch Polymerase- und Ligaseaktivität behandelt.

Auf der Suche nach einer Reparaturaktivität des Desaminierungsschadens an 5-Methylcytosin wurde in menschlichen Zellen eine Glykosylase gefunden. Die T(U)/G DNA N-Glykosylase (TDG) entfernt Thymin und Uracil aus T/G- und U/G-Fehlpaarungen, es wurde auch eine schwache Aktivität gegenüber T/T- und T/C-Fehlpaarungen bestimmt. Anders als im Falle der Uracil DNA N-Glykosylasen, welche Uracil auch aus ssDNA entfernen, ist dieses Enzym dsDNA-spezifisch. Weiterhin wurde eine Präferenz für Desaminierungsprodukte in den Dinukleotiden CpG bzw. 5-meCpG gefunden. Dies deutet darauf hin, daß das Enzym für die

Reparatur von Desaminierungsschäden an 5-Methylcytosin spezialisiert ist. Das schwache hydrolytische Potential dieses Enzyms sowie dessen geringe Konzentration in den Zellen warf jedoch die Frage auf, ob diese Aktivität ausreichend für eine Reparatur der Desaminierungsschäden ist (Brown und Jiricny, 1989; Neddermann und Jiricny, 1993, 1994). Für das Methyl-CpG-Bindeprotein MBD4 wurde eine Mismatch-spezifische Glykosylaseaktivität gefunden. Dieses Enzym entfernt mit Guanin fehlgepaartes Uracil und Thymin im CpG-Kontext mit einer Präferenz für T/G-Fehlpaarungen in hemimethylierten CpG-Dinukleotiden. (Hendrich und Bird, 1998; Hendrich *et al.*, 1999). Es wird aber anscheinend nur in sich teilenden Zellen von in der Differenzierung befindlichem embryonischem Gewebe exprimiert.

Eine T/G-spezifische Glykosylase wurde ebenfalls in einem anaeroben thermophilen Archaeon (Wachstumsoptimum bei 65 °C), *Methanobacterium thermoautotrophicum*, gefunden (Horst und Fritz, 1996). Das Enzym Mig.*Mth* katalysiert die Entfernung von Thymin und Uracil gegenüber Guanin von dsDNA im Sequenzkontext der plasmidständigen Methyltransferase mthTIM (Nölling und de Vos, 1992), wobei die Entfernung von Uracil etwas effektiver ist. Strukturelle Ähnlichkeiten zu MutY (s. o.) waren die Basis für ein Experiment, in welchem eine Aminosäure im katalytischen Zentrum von Mig.*Mth* ausgetauscht wurde. Die Mutante L187Q zeigte eine um den Faktor 20 veränderte Substratspezifität von T/G nach A/G. Die gesteigerte Aktivität gegenüber der Spaltung von A/G-Fehlpaarungen und verminderte Aktivität gegenüber T/G-Fehlpaarungen zeigte, daß die Änderung nur einer Aminosäure im Falle von Mig.*Mth* zu einer Verschiebung in Richtung MutY-Aktivität führte (Fondufe, 2000). Die Spezifität einiger Glykosylasen ist somit zum Teil durch einfache Determinanten festgelegt. In *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurde kein Homologes der Uracil DNA N-Glykosylase gefunden, und die alternative Möglichkeit der Entfernung von Uracil aus dsDNA durch Mig.*Mth* oder weitere Glykosylasen ist Bestandteil laufender Untersuchungen.

Aufgrund von Homologien zu TDG wurde in *Escherichia coli* eine Mismatch-spezifische Uracil-Glykosylase entdeckt (MUG), welche ebenfalls dsDNA-spezifisch agiert (Galliani *et al.*, 1996). Die Strukturaufklärung dieser Glykosylase lieferte ein Modell für die Erkennung und Prozessierung der Fehlpaarung. Das Enzym scheint DNA unter Veränderung ihrer Struktur (Kompression, Knicken) zu binden und dabei über Interaktion mit der ‚*minor groove*‘ auf das Vorhandensein von Uracil zu ‚*scannen*‘ (Parikh *et al.*, 1998). Wird ein solches gefunden, wird das Uracil aus der

DNA herausgedreht, während Aminosäuren des Enzyms die entstehende Lücke invadieren (dies wird als ‚*push and pull*‘-Mechanismus bezeichnet). Dieser Mechanismus scheint der generelle Weg der meisten Glykosylasen zu sein.

### 1.3.3.3 Desaminierung an 5-Methylcytosin: Vsp-Reparatur

Erste Hinweise auf einen Mechanismus zur Reparatur von Desaminierungsschäden an 5-Methylcytosin in *Escherichia coli* wurden von Margareth Lieb gefunden. In Kreuzungsexperimenten am Phagen  $\lambda$  fand sie außergewöhnlich hohe Rekombinationsfrequenzen für eine gewisse ‚*amber*‘-Mutation (*am6*) im *cI*-Gen (Lieb, 1976, 1981). Die Untersuchung benachbarter Marker hätte diese Ereignisse unter Interpretation als Rekombinationsereignisse auf 3fach-‚*crossing-over*‘ zurückgeführt. Die beobachtete Häufigkeit dieser Ereignisse ließ sich jedoch mit dem sehr seltenen Ereignis eines derartigen 3-fach-‚*crossing-over*‘ nicht erklären. Dies ließ M. Lieb vermuten, daß der Grund für den beobachteten Effekt die Bildung von Heteroduplex-DNA und nachfolgende Mismatch-Reparatur zurückzuführen sei. Da eine Koreparatur nur in enger Nachbarschaft der *am6*-Mutationen beobachtet werden konnte, postulierte sie weiterhin, daß diese Reparatur sich durch besonders kurze Trakte auszeichnen müsse und nannte sie daher ‚*very short patch*‘-Reparatur (Vsp) (Lieb, 1983). Die *am6*-Mutation konnte im Vergleich mit der Sequenz des *cI*-Gens (Sauer, 1978) als eine Punktmutation (CAG→TAG) im Sequenzkontext CCAGG identifiziert werden. Im Vergleich mit Arbeiten von Coulondre fiel auf, daß diese Mutation das Ergebnis einer Desaminierung eines 5-Methylcytosins innerhalb der Erkennungssequenz der Dcm-Methyltransferase widerspiegelt. Also schlug M. Lieb vor, daß die Vsp-Reparatur T/G-Fehlpaarungen innerhalb dieser Erkennungssequenz repariert, um dem Mutationsrisiko verbunden mit einer Desaminierung von 5-Methylcytosin entgegenzuwirken (Coulondre, 1978; Lieb, 1983). Dies setzt eine gerichtete Reparatur dieser Schäden von T/G nach C/G voraus, was von M. Lieb experimentell gezeigt und von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte (M. Lieb, 1985; Jones *et al.*, 1987a, b; Zell und Fritz, 1987). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Reparatur nicht streng an die Erkennungssequenz der Dcm-Methyltransferase gebunden ist, sondern auch die um ein Nukleotid 5' oder 3' verkürzte Sequenzen C<sup>A</sup>/<sub>T</sub>GG und CC<sup>A</sup>/<sub>T</sub>G von dem Mechanismus betroffen sind (Lieb *et al.*, 1986; Hennecke *et al.*, 1991).

Die Reparaturaktivität wurde mit dem *vsr*-Gen in Verbindung gebracht, dessen erste 7 Kodone mit dem Ende des *dcm*-Gens im Raster +1 überlappen (Bhagwat *et al.*, 1988; Sohail *et al.*, 1990). Die beiden Gene werden von einem gemeinsamen Transkript translatiert, eine Regulation der Methylierungsaktivität scheint also mit einer Regulation der Reparaturaktivität einherzugehen (Dar und Bhagwat, 1993). Das Genprodukt von *vsr* konnte als Sequenz-, Mismatch- und Strang-spezifische Endonuklease identifiziert werden. T/G-Fehlpaarungen im Erkennungssequenz-Kontext  $C\underline{T}^A/TGG$  werden 5' des fehlgepaarten Thymins (unterstrichen) unter Generieren von 5'-Phosphat- und 3'-OH-Termini gespalten (Hennecke *et al.*, 1991). Die Inzision dient dann als Ausgangspunkt einer 5'→3'-Exonukleaseaktivität und anschließende Auffüllreaktion der DNA Polymerase I. Die kurzen Synthesetrakte dieser Polymerase kann die beobachteten kurzen Reparaturtrakte erklären (Dzidic und Radman, 1989).

Eine Reihe von Untersuchungen befassten sich mit der Sequenzspezifität der Vsr-Endonuklease. Die dabei *in vitro* (Gläsner *et al.*, 1995) und *in vivo* (Lieb und Rehmat, 1995) gefundenen Daten stimmen weitgehend überein. Hieraus wurde die Konsensus-Erkennungssequenz mit  $N_1\underline{T}^A/TGN_2$  abgeleitet (N1 und N2 stehen für A, C, G oder T, das fehlgepaarte Thymin ist unterstrichen)(Gläsner *et al.*, 1995). Die Aufklärung der Struktur der *Escherichia coli* Vsr-Endonuklease als N-terminal verkürzte Variante sowie im Komplex mit einem gespaltenen 12meren DNA-Substrat konnte den Mechanismus der Erkennung erklären (Tsutakawa *et al.*, 1999a, b). Die T/G-Fehlpaarung wird durch die mit ihr einhergehende charakteristische Veränderung der DNA-Struktur erkannt. Dabei wurde ein neuartiger Bindungsmechanismus gefunden, der mit dem Interkalieren dreier hydrophober Aminosäurereste von Seiten der ‚major groove‘ einhergeht. Die ‚minor groove‘ wird von einer im solitären Protein flexiblen N-terminalen Region kontaktiert. Die Diskriminierung gegen ein C/G-Basenpaar statt der T/G-Fehlpaarung erfolgt nicht durch direkten Kontakt mit den Basen der Fehlpaarung, sondern durch sterischen Ausschluß einer C/G-Basenpaarung im aktiven Zentrum. Im Bereich der Erkennungssequenz werden nur wenige direkte Kontakte mit den funktionellen Gruppen der Basen beobachtet, darunter ein direkter Kontakt zum in der Erkennungssequenz invarianten Guanin (s. o.) und dem zugehörigen Cytosin. Die Wechselwirkung ist im Wesentlichen durch ein Netzwerk von Wasser-vermittelten Interaktionen mit Basen beider Stränge der Erkennungssequenz charakterisiert. Die

Oberfläche des Proteins und dessen Ladungsverteilung ist schließlich perfekt der Oberfläche des gebundenen DNA-Substrates angepaßt. Über 20 % der Proteinoberfläche sind im Komplex im Kontakt mit der gebundenen DNA. Auf die beteiligten Aminosäurereste wird detailliert in Abschnitt 7.1 eingegangen. Im aktiven Zentrum des Enzyms sind zwei Magnesiumionen koordiniert. Diese und ein Histidin des Enzyms koordinieren das Phosphatende des gespaltenen Produktes. Das 3'-OH-Ende des Produktes ist in unprotonierter Form mit einem der Magnesiumionen koordiniert. Die Struktur von Vsr weist Homologie zu Endonukleasen des Typs II auf. Die in Endonukleasen des Typs II beobachteten konservierten Aminosäuren, welche für eine Spaltung der DNA essentiell sind, werden hier allerdings nicht gefunden, der Spaltungsmechanismus in Vsr ist noch nicht geklärt.

In einer Reihe von Experimenten wurde die Beteiligung weiterer Proteine an der Vsp-Reparatur untersucht. Dabei wurde beobachtet, daß diese Reparatur im Hintergrund von *mutS*<sup>-</sup>- und *mutL*<sup>-</sup>-Stämmen drastisch reduziert, jedoch nicht völlig herabgesetzt ist (Zell und Fritz, 1987; Lieb, 1987; Jones *et al.*, 1987). Von Drotschmann *et al.* konnte 1998 gezeigt werden, daß die Bindung von Vsr an ihr Substrat durch MutL stimuliert wird. Ein Modell, welches einen Zusammenhang zwischen der Vsp-Reparatur und der Aktion von MutL und MutS herstellt, könnte folgendermaßen aussehen: Zunächst wird eine T/G-Fehlpaarung durch MutS und MutL erkannt und es kommt zur Ausbildung eines  $\alpha$ -'loop'. Auf diese Weise könnte die Struktur der DNA im Bereich der Fehlpaarung derart verändert werden, daß es zu einer effizienteren Erkennung durch Vsr kommt. Diese Hypothese wird durch die Aufklärung des Erkennungsmechanismus gestützt. Eine Deformation der DNA-Struktur im 'loop' könnte beispielsweise das Interkalieren der Aminosäuren im Bereich der Fehlpaarung erleichtern (Horst, 1997; Tsutakawa, 1999b).

Eine Überexpression von Vsr ist mutagen und verursacht einen Mutatophänotyp, welcher auch bei der Inaktivierung der MuthLS-Reparatur beobachtet wird (Doiron *et al.*, 1996). Die Überexpression von MutS wiederum reduziert die Effizienz der Vsp-Reparatur (Macintyre *et al.*, 1997). Dies vermittelt den Eindruck eines Austitrierens einer Komponente durch die andere und spräche für eine direkte Wechselwirkung der Proteine beider Reparaturwege. Dies konnte bis dato jedoch nicht nachgewiesen werden.

Eine Folge der Koexistenz der Mismatch-Reparatur und der Vsp-Reparatur ist die Konkurrenz um T/G-Fehlpaarungen. Diese können im Zuge der Replikation entstehen und stellen im Zeitfenster der Hemimethylierung der GATC-Sequenzen, welche zur Strangunterscheidung der Mismatch-Reparatur dienen, für beide Reparaturwege ein Substrat dar. Wird eine solche Fehlpaarung durch die Vsp-Reparatur prozessiert, so kommt es für den Fall, daß fälschlicherweise ein Guanin gegenüber einem Thymin eingebaut wurde, zur Reparatur in Richtung eines C/G-Basenpaares und damit zur Fixierung einer T/A→CG-Transition. Wurde dagegen ein Thymin gegenüber einem Guanin eingebaut, so erfolgt die Reparatur durch beide Wege in derselben Richtung, es entsteht keine Mutation. Untersuchungen der Tetranukleotidhäufigkeiten am Genom von *Escherichia coli* K12 zeigten tatsächlich eine signifikante Unterrepräsentation der Sequenzen T<sup>A</sup>/TGG und CT<sup>A</sup>/T<sub>G</sub>, während die Sequenzen C<sup>A</sup>/TGG und CC<sup>A</sup>/T<sub>G</sub> überrepräsentiert sind (Bhagwat und McClelland, 1992; Merkl *et al.*, 1992). Später konnten die Effizienz der Spaltbarkeit unterschiedlicher Sequenzumgebungen der Fehlpaarung mit dem Maß an Unterrepräsentation der entsprechenden Thymin-enthaltenden Sequenzen korreliert werden (Gläsner *et al.*, 1995).

Das Vorhandensein der Dcm-Methylierung und Vsp-Reparatur hat also für den Organismus weitreichende Folgen. Dieses System übt einen direkten Einfluß auf die Gestalt des Genoms aus. Die Tatsache daß es überhaupt existiert, muß bedeuten, daß der Organismus nicht nur Nachteile sondern auch Vorteile erlangt. Erklärungsansätze wurden 1992 von Merkl *et al.* geliefert. Sie schlagen vor, daß dieses System als Teil eines Mutagenese/Rekombinationssystems verstanden werden kann, welches durch unidirektionalen Transfer kurzer DNA-Sequenzen zu Sequenzpolymorphismen führt. Diese könnten dem Organismus evolutive Vorteile verschaffen. Die Aktivität der Vsr-Endonuklease könnte weiterhin zu einer Erhaltung von Sequenzmotiven beitragen, die ein Cytosin innerhalb der von Vsr erkannten Sequenzen an Position eines fehlgepaarten Thymins enthalten. (Lieb und Bhagwat, 1996). Die Vermeidung von C→T-Mutationen im Zuge der Replikation würde beispielsweise zu einem Erhalt von Chi-Sequenzen führen, welche ein potentiell Substrat-Motiv der Vsr-Endonuklease enthält. Die Sequenz ist GCTGGTGG, das von Vsr erkannte Motiv ist unterstrichen. Eine Fehlinkorporation eines Thymins anstelle des fett gedruckten Cytosins würde von der Vsp-Reparatur zum Cytosin repariert werden. Diese Sequenz spielt eine wichtige

Rolle bei Rekombinationsereignissen (Übersicht bei Smith, 1994). Sequenzmotive, die ebenfalls von einer Vsp-Reparatur erhalten werden könnten, finden sich in REP-Palindromen, welchen eine Rolle bei der Genregulation sowie der Chromosomenstruktur zugeordnet wird (Dimri *et al.*, 1992).

Es gibt Hinweise auf die Beteiligung weiterer Proteine an der Vsp-Reparatur. So wurde von Ruiz und anderen 1993 ein *Escherichia coli*-Stamm isoliert, welcher eine hohe Frequenz von C→T-Mutationen an 5-Methylcytosin-Positionen aufweist. Dieser Phänotyp konnte weder mit der MthLS-Reparatur noch mit einem Defekt des *vsr*-Gens in Verbindung gebracht werden. Das zugehörige Gen wurde jedoch nicht beschrieben. Im Falle der T/G-spezifischen Glykosylase Mig.Mth (Abschnitt 1.3.3.2) konnte eine Stimulation der Aktivität durch das Genprodukt eines benachbarten offenen Leserasters gezeigt werden. Die Stimulation erfolgte ohne Beeinflussung der Sequenzselektivität (Fondufe, 2000). Der Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch unklar.

In anderen Enterobakterien wurden aufgrund von Homologien zur Aminosäuresequenz des Vsr-homologe Proteine identifiziert (siehe Abschnitte 4.1 und 7.1). Diese liegen in Nachbarschaft von Cytosin-Methyltransferasen, was eine Funktion ähnlich der des Vsr aus *Escherichia coli* nahelegt. Die einzige Studie zur Aktivität eines Homologen bestand in der Koexpression des Vsr-Homologen aus *Haemophilus influenza* und der assoziierten HpaII-Methylase. Der Phänotyp der erhöhten C→T-Mutation innerhalb der Erkennungssequenz CCGG bei alleiniger Expression der Methylase konnte bei Koexpression mit dem Vsr-Homologen nicht unterdrückt werden. Dies kann allerdings auch auf mangelnde Deaktivierung des Vsr-homologen Proteins durch MutS und MutL aus *Escherichia coli* zurückzuführen sein. Bis dato ist die Aktivität eines Mitglieds der Familie der Vsr-Homologen nur für das Enzym aus *Escherichia coli* gezeigt.

## 1.4 Zielsetzung

Die Reparatur von Schäden, die durch hydrolytische Desaminierung von 5-Methylcytosin entstehen, ist bei allen Organismen, in welchen diese modifizierte Base vorkommt, wichtig für den Erhalt der genetischen Information. Die Reparatur dieser Schäden wird durch eine Mismatch-spezifische Glykosylase oder, wie in *Escherichia coli* gefunden, durch eine spezifische Endonuklease eingeleitet. Die Eigenschaft der Vsp-Reparatur konnte mit der Verarmung gewisser Pentanukleotidsequenzen im Genom von *Escherichia coli* korreliert werden. Hierbei spielt die Konkurrenz von Vsp und DNA-Mismatch-Reparatur, einer postreplikativen Reparatur zu Erhöhung der Replikationsgenauigkeit, eine Rolle. Eine Aufklärung solcher ursächlichen Mechanismen für die Zusammensetzung von Genomen kann auch für die Interpretation der zur Zeit bereits in großer Zahl vorliegenden vollständigen genomischen Sequenzen hilfreich sein.

Die Vsp-Reparatur als Mechanismus der Reparatur hydrolytischer Desaminierung von 5-Methylcytosin ist biochemisch bisher nur in *Escherichia coli* charakterisiert worden. Es gibt aber Hinweise darauf, daß es einen ähnlichen Reparaturweg auch in anderen Bakterien gibt, da enge Sequenzverwandte des *Escherichia coli*-Vsr-Proteins auch anhand vollständiger genomischer Sequenzen identifiziert wurden.

Um biochemisch zu untersuchen, ob die Vsp-Reparatur auch in anderen Organismen eine Rolle spielt, sollte ein entsprechendes Protein untersucht werden. Die Wahl des Organismus fiel auf *Bacillus stearothermophilus*, von welchem bekannt war, daß es 5-Methylcytosin enthält. Weiterhin sollte das Problem der Desaminierung bei einer Wachstumstemperatur von 50 °C im Vergleich zu *Escherichia coli* noch drängender sein. Es besteht weiterhin die Voraussetzung für eine Untersuchung der Interaktion von Vsp- und DNA-Mismatch-Reparatur, da auch das *mutS*- und *mutL*-Gen durch B. Fartmann bereits identifiziert worden waren. Neben diesen wissenschaftlichen Erwägungen war ein weiterer Aspekt auch, daß von einem Protein aus Thermophilen eine höhere Stabilität zu erwarten ist, sodaß es für eine Anwendung zur Detektion von Fehlpaarungen z. B. in der Diagnostik wahrscheinlich besser geeignet ist als Proteine aus mesophilen Organismen.



## 2. Material

### 2.1 Stämme

*Bacillus stearothermophilus* **H3** (Quelle: Trautner)

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
<b>BL21 DE3</b>	F <sup>-</sup> ompT hsd S <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (λDE3)	Studier und Noffat, 1986; Novagen
<b>BMH 71-18</b>	Δ(lac-proAB) supE thi [F' lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 proA <sup>+</sup> proB <sup>+</sup> ]	B. Müller-Hill
<b>DH5-α</b>	F <sup>-</sup> ,φ80-dlacZΔM15, endA1, recA1, hsdR1 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), sup E44 thi-1, gyrA96(Nal <sup>r</sup> ), relA1, Δ(lacZYA-argF) U169	Hanahan, 1983

Der Stamm **BMH71-18** enthält auf dem F-Epison das durch die M15-Deletion verkürzte *lacZ*-Gen; eine Expression des Gens führt zu einer um 30 Aminosäuren (Aminosäure 11 bis 41) verkürzten, enzymatisch inaktiven β-Galaktosidase. Vektoren, die das *lacZα*-Fragment enthalten, ermöglichen die Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität (α-Komplementation). Diese ist durch Umsetzung des Substrates X-Gal in einen Indigo-Farbstoff optisch überprüfbar.

Der Stamm **BL21 DE3** besitzt chromosomal integriert das Gen für die T7-Polymerase und wurde in Kombination mit dem Expressionsplasmid pET21d verwendet, welches zu exprimierende Gene unter Kontrolle des T7-Promotors stellen kann.

**DH5α** war der bevorzugte Stamm für Klonierungsarbeiten

## 2.2 Nährmedien

### TB-Medium

24 g Trypton, 12 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, H<sub>2</sub>O *ad* 900 ml; 23.1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 125.4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O *ad* 1 l; getrennt autoklavieren, danach wird der Nährlösung 100 ml des Phosphatpuffers zugesetzt.

### dYT-Medium

16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, *ad* 1 l H<sub>2</sub>O, autoklaviert.

### dYT-Agar

16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar, *ad* 1 l H<sub>2</sub>O, autoklaviert.

Zur Herstellung von Selektivmedien wurden den Medien nach dem Autoklavieren sterile Antibiotikallösungen zugegeben, die, wenn nicht anders angegeben, in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt wurden:

Ampicillin: 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml

Kanamycin: 70 mg/ml

Chloramphenicol: 25 µg/ml

Zur Herstellung von Indikatorplatten als Nachweis von β-Galaktosidase-Aktivität wurde dem Agar nach dem Autoklavieren X-Gal in einer Endkonzentration von 40 mg/ml zugegeben. Zur Induktion des *lac*-Promoter wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0.4 mM bis 1 mM zugegeben.

## 2.3 Plasmide

**pBluescript II SK (-)**. Dieses Plasmid wurde für Klonierungen verwendet.

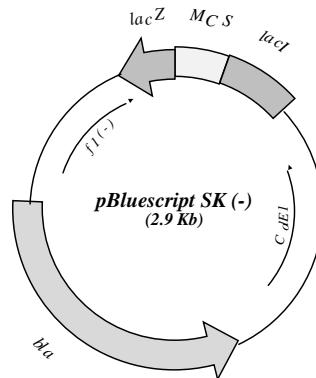


ABBILDUNG 1: Karte des Plasmides pBluescript II SK (-). *f1-ori*: Replikationsursprung des f1-Bakteriophagen. *ColE1*: Replikationsursprung von *Escherichia coli*. *bla*: Gen der  $\beta$ -Lactamase (Ampicillinresistenz). *lac*: Gen für das *lacZ*  $\alpha$ -Fragment. MCS: 'Multiple-cloning-site'.

**pET 21-d**: Dieses Plasmid wurde für die Expression von *Vsr.Bst*, MutS und MutL verwendet.

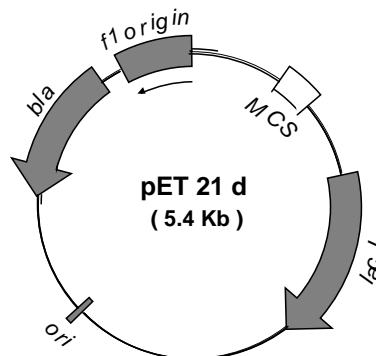


ABBILDUNG 2: Karte des Plasmides pET 21-d. *f1-ori*: Replikationsursprung für die f1-Bakteriophagen. *bla*: Gen der  $\beta$ -Lactamase (Ampicillinresistenz). MCS: 'Multiple-cloning-site'. *lacI*: Gen des *lac*-Repressors. *ori*: Replikationsursprung von *Escherichia coli*.

**pET 21-d(+)-BstMutL**: Dieses Plasmid wurde als Ausgang für die Klonierung des Hexahistidin-MutL verwendet. Es trägt im pET 21d-Plasmid das MutL-Gen aus *Bacillus stearothermophilus* auf einem chromosomalen *HindIII*-Fragment.

**pTZ19R- $\Delta$ *bla-cat***: Dieses Plasmid besitzt ein *cat*-Gen und vermittelt Resistenz gegen Chloramphenicol. Es zeichnet sich weiterhin durch ein *lacZ*-Gen aus, welches bei Klonierungen unterbrochen wird. Im geeigneten Stamm ist ein ‚insert screen‘ durch  $\alpha$ -Komplementation möglich.

**SuperCos1**: Dieses Plasmid wurde zu Konstruktion von Kosmidbibliotheken verwendet. Kosmidarme werden durch Spaltung mit *Xba*I und einem geeigneten Enzym der MCS freigesetzt.

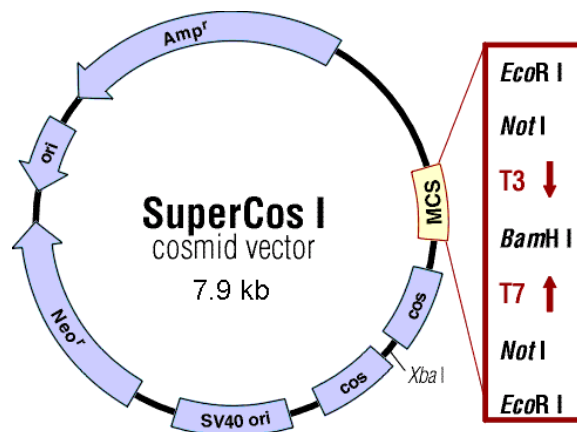


ABBILDUNG 3: Karte des Plasmids SuperCos1. *Amp*<sup>r</sup>: Gen der  $\beta$ -Laktamase (Ampicillinresistenz). *Neo*<sup>r</sup>: Gen für Kanamycinresistenz. MCS: ‚Multiple-cloning-site‘. *cos*: Sequenzen zur Verpackung in  $\lambda$ -Phagenpartikel. *ori*: Replikationsursprung von *Escherichia coli*.

## 2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5‘ $\rightarrow$ 3‘-Orientierung angegeben.

### 2.4.1 vsr-Suche und -Klonierung

DG-Mix	AGA GGA TCC GAY GGN TGY TTY TGG CA
HG-Mix	AGA GGA TCC CAY GGN TGY TTY TGG CA
DS-Mix	AGA GGA TCC GAY WSN TGY TTY TGG CA
HS-Mix	AGA GGA TCC CAY WSN TGY TTY TGG CA
DS1-Mix	AGA GGA TCC GAY TCN TGY TTY TGG CA
HS1-Mix	AGA GGA TCC CAY TCN TGY TTY TGG CA
DS2-Mix	AGA GGA TCC GAY AGY TGY TTY TGG CA

HS2-Mix	AGA GGA TCC CAY AGY TGY TTY TGG CA
Kassetten-Oligonukleotid 1	CTG AAT TCA CAA GGT GCG TTA CAG GTT C
Kassetten-Oligonukleotid 2	GAT CGA ACC TGT AAC GGC AAC AGT GAA TTC AGA
Kassetten-Primer	CTG AAT TCA CAA GGT G
5'VsrBst	GCT CTA GAA TAC ATG GAC GGA TC
3'VsrBst	GGA CTA GTT GTA TTT CAC ATG CG
5'BstVsr-Xba	TGC TCT AGA TAT GGA GTT AAT GTT ATG GC
5'BstVsr-Nco	CAT GCC ATG GAT GGC AGA TGT CCT TAC A
3'BstVsr-Xho	CCG CTC GAG ACT TTG AGA ATC TTT GGC
5'BstVsr-Seq	TTA CGA CCT GTG TGT CCA
3'BstVsr-Seq	CGC CTA CGT TAA TCC CTC

## 2.4.2 Substrate für Spalttests

### 5'-Fluorescein-markierte Oligonukleotide

Substrat 1	GGCTTATCTCCG CTCGGG TTAATCTGTCGCA
Substrat 2	ACTTGGCTTATCTCCG ATCGGT TTAATCTGTCGCA
Substrat 3	GGGTACTTGGCTTATCTCCG CCTGGG TTAATCTGTCGCA
Substrat 4	GCTTGGGTACTTGGCTTATCTCCG ACTGGT TTAATCTGTCGCA
Substrat 5	GGCTTATCTCCG GTGCGC TTAATCTGTCGCA
Substrat 6	ACTTGGCTTATCTCCG GCGTGC TTAATCTGTCGCA
Substrat 7	GGCTTATCTCCG TGGTCA TTAATCTGTCGCA
Substrat 8	GGGTACTTGGCTTATCTCCG ATCCCT TTAATCTGTCGCA
Substrat 9	GCTTGGGTACTTGGCTTATCTCCG ATCAAT TTAATCTGTCGCA
Substrat 10	GGCTTATCTCCG TCTCTA TTAATCTGTCGCA
Substrat 11	GGGTACTTGGCTTATCTCCG TATTAG TTAATCTGTCGCA
Substrat 12	GCTTGGGTACTTGGCTTATCTCCG GATAGC TTAATCTGTCGCA
Substrat 13	GGCTTATCTCCG TTCGGG TTAATCTGTCGCA
Substrat 14	GGGTACTTGGCTTATCTCCG CTTGGG TTAATCTGTCGCA
Substrat 15	GCTTGGGTACTTGGCTTATCTCCG TATGAG TTAATCTGTCGCA
FUGxC	GGGTACTTGGCTTATCTCCG AGGTCC TTAATCTGTCGCA
Substrat 1 Uracil	ACTTGGCTTATCTCCG CUCGGG TTAATCTGTCGCA
Test 1 unterer Strang	TGCGACAGATTAA CCCGGG CGGAGATAAGCC

## Untere Stränge, unmarkiert

Substrate 1, 3	TGCGACAGATTAA CCCGGG CGGAGATAAGCC
Substrate 2, 4	TGCGACAGATTAA ACCGGT CGGAGATAAGCC
Substrate 5, 6	TGCGACAGATTAA GCGCGC CGGAGATAAGCC
Substrat 7	TGCGACAGATTAA TCGCCA CGGAGATAAGCC
Substrat 8	TGCGACAGATTAA AGGGGT CGGAGATAAGCC
Substrat 9	TGCGACAGATTAA ATTGGT CGGAGATAAGCC
Substrat 10	TGCGACAGATTAA TAGGGA CGGAGATAAGCC
Substrat 11	TGCGACAGATTAA CTAGTA CGGAGATAAGCC
Substrat 12	TGCGACAGATTAA GCTGTC CGGAGATAAGCC
Substrat 13	TGCGACAGATTAA CCCGGA CGGAGATAAGCC
Substrat 14	TGCGACAGATTAA CCCGAG CGGAGATAAGCC
Substrat 15	TGCGACAGATTAA CTCATG CGGAGATAAGCC
FUGxC-A	TGCGACAGATTAA GGACCT CGGAGATAAGCC
FUGxC-C	TGCGACAGATTAA GGCCCT CGGAGATAAGCC
FUGxC-T	TGCGACAGATTAA GGTCTT CGGAGATAAGCC

## 2.4.3 Oligonukleotide für Klonierungen

### Konstruktion der MutL-Hexahistidin-Variante

5'pET21d-H6	CGT CTA TCA GGG CGA
3'pET21d-H6	CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA
5'BstMutL-H6	GAT CTC AGT GGT GGT GGT GGT GGT GGG TAC CCA TAA CGC GCT TGA ACA T
3'BstMutL-H6	GAC TGC CCA GGA AGC

### Klonierung des MutS-Homologen aus *Bacillus stearothermophilus*

3'BstMutS-SacI	TCG ATT TGT CCC GTA TCG TTT CGG
5'BstMutS-NcoI	CAG CTG ACC ATG GCA CAA TAT
3'BstMutS-H6	CCG CTC GAG CTT GCT TTT TTT CAT TTG CTG
5'BstMutS-Int1	TGC AGG CAT TCG CTA CAG

## „Screen“-Primer

scos\_for                    AGT GCC ACC TGA CGT CTA AGA  
 scos\_rec                    TGT CCG TGG AAT GAA CAA TGG

### 2.4.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung

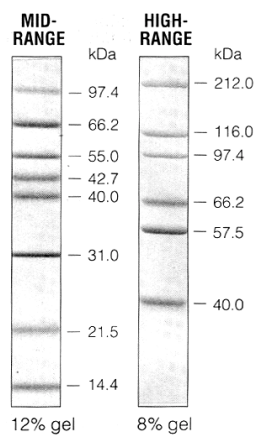
M13reverse                (IRD800) – GGA AAC AGC TAT GAC CAT G  
 T7 Terminator pET        (IRD800) – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G  
 BstVsrSeq-Nterm        (IRD800) – AAG ACC GCC TTT ATC AAT CG  
 BstVsrSeq-Nterm        (IRD800) – ATA TAA ATC GCC ATC GAT CC

## 2.5 DNA-Längenstandarts

**1 kb-Leiter** (MBI): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10.000 bp

**100 bp-Leiter** (MBI): 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp

## 2.6 Proteinlängenstandarts (BioRad)



## 2.7 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA

Alle Pufferkonzentrationen sind in einfacher Endkonzentration angeben.

### **BW-Puffer**

.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl

### **Fermentas Restriktionspuffer R**

10 mM Tris/HCl pH 8.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl.

### **Fermentas Restriktionspuffer G**

10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl.

### **Fermentas Restriktionspuffer Y**

33 mM Tris-acetat pH 7.5, 10 mM Mg-acetat, 66 mM K-acetat.

### **Fermentas Restriktionspuffer O**

50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.

### **Fermentas Restriktionspuffer B**

10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl.

### **Formamid-Farbmarker**

100 ml Formamid, 0.1 g Bromphenolblau, 0.1 g Xylen Cyanol FF, 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0.

### **KGB**

25 mM Tris/Acetat pH 7.5, 10 mM Mg-Acetat, 100 mM Kaliumglutamat, 50 µg/ml BSA, 0.5 mM β-Mercaptoethanol.

### **Ligase-Puffer**

66 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP.

### **Mini-Puffer I**

50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8.0.

### **Mini-Puffer II**

0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS.

### **Mini-Puffer III**

3 M Kaliumacetat, pH 5.5.

### **PNK-Puffer**

1.2 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% Ethanol.

### **SSC-Puffer**

15 mM tri-Natriumcitrat pH 7.2, 150 mM NaCl.



**STE-Puffer**

10 % (w/v) sucrose, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0

**Sucrose-Farbmarker**

60% (w/v) Saccharose, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 0.05% (w/v) Xylencyanol FF, in 0.5 x TBE-Puffer.

**TAE-Puffer**

40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8.0.

**TBE-Puffer**

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA.

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0.

**TES-Puffer**

10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA.

**Tfl-DNA-Polymerase-Puffer**

50 mM Tris/HCl pH 9.0, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

## 2.8 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit Protein

**HEPES-Puffer**

20 mM HEPES, pH 7.6; 5 mM  $\alpha$ -Mercaptoethanol.

(Die NaCl-Konzentration wird als Zahlzusatz angegeben, HEPES 100 bedeutet Puffer mit 100 mM NaCl)

**IMAC-Puffer 1**

25 mM HEPES/KOH pH 7.6, 0.5 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol.

**IMAC-Puffer 2**

25 mM HEPES/KOH pH 7.6, 0.5 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 M Imidazol.

**Laemmli-Probenpuffer**

62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% (v/v) Glycerin, 70 mM SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.0025% (w/v) Bromphenolblau.

**Laufpuffer für SDS-PAGE**

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS.

**PAG-Färbelösung**

500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 7.5 g Coomassie Brilliant Blue R, *ad* 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Protein-Probenpuffer**

62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% (v/v) Glycerin, 70 mM SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.0025% (w/v) Bromphenolblau.

**Proteinase K-Puffer**

0.5 M EDTA, 1 % Laurylsarkosin, 1 mg/ml Proteinase K, pH 8.0

**Sammelgelpuffer**

1 M Tris/HCl pH 6.8.

**Trenngelpuffer**

2 M Tris/HCl pH 8.8.

## 2.9 Enzyme und Proteine

**Bio-Rad Laboratories GmbH, München:** Molekulargewichtsstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, *Low Range*)

**Biozym Epicentre Technologies, Hameln:** *Tfl*-DNA-Polymerase, *Cycle-Sequencing-Kit*.

**Boehringer Mannheim, Mannheim:** Ribonuklease A, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, Proteinase K, ‚Complete‘ Protease-Inhibitor-Cocktail

**MBI Fermentas, Vilnius, Litauen:** Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I, "*large fragment*"), T4-Polynukleotidkinase, T4-DNA-Ligase, Bakterielle Alkalische Phosphatase.

**NEB New England Biolabs, Frankfurt a.M.:** Restriktionsendonukleasen

**Promega, Madison, USA:** *Tfl* Polymerase, MagneSphere Partikel, GFX Plasmid Purification Kit

## 2.10 Chemikalien

**AT Biochem, Malvern, USA:** Acrylamid-/Bisacrylamidlösung für A.L.F.-Gele ("*hydrolink*").

**J.T. Baker Chemicals B.V., Deventer, Niederlande:** Dimethylformamid.

**Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg:** 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid Dinatriumsalz (*x-gal*), 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat p-Toluidinsalz (BCIP), Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG).

**Boehringer, Mannheim:** Ampicillin, 2', 3'- Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphate  
**Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm:** Bromphenolblau, Glycerin, Saccharose.  
**Genomed, Research Triangle Park, USA:** Jetstar Plasmid Kit.  
**Gibco/BRL GmbH, Eggenstein:** Agarose Electrophoresis Grade; Yeast Extract  
**Merck AG, Darmstadt:** Alle sonstigen verwendeten Chemikalien.  
**National Diagnostics, Simerville, New Jersey, USA:** PROTOGEL™  
(vorgemischtes Acrylamid/Bisacrylamid), Acrylagel, Bis-Acrylagel.  
**Oxoid, Hampshire:** Agar bacteriological grade, Trypton.  
**Pharmacia/LKB GmbH, Freiburg:** Ammoniumperoxodisulfat, N, N, N', N'-  
Tetramethylethylendiamin (TEMED)  
**Riedel de Haen AG, Seelze:** Chloroform, Ethanol, Natriumchlorid, konz. Salzsäure  
**Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg:** Ethylendiamin-tetra-essigsäure  
Dinatriumsalz (EDTA), Dithiotreitol (DTT), Kanamycin, Natriumdodecylsulfat  
(SDS), Harnstoff  
**Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen:** Coomassie Brilliant Blue R, Ethidiumbromid,  
β-Mercaptoethanol, Natriumnitrit, 4-Nitro-tetrazoliumchloridblau (NBT), Ponceau-  
S-Konzentrat, Tetramethylammoniumchlorid, Xylencyanol FF.

## 2.11 Sonstige Materialien und Geräte

**Aminco SLM, Urbana, Illinois USA:** French Pressure Cell Press.  
**Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt:** Poros-Medien, 'Vision Workstation'  
Biocad Perseptive,  
**Bender & Hobein AG, Zürich:** Vortex Genie 2  
**Cybertech GmbH, Berlin:** Cybertech CS-1 Elektronische Sofortbildkamera zum  
Fotografieren von Gelen.  
**Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg:** Eppendorf-Reaktionsgefäße.  
**C. A. Greiner & Söhne GmbH & CoKG, Nürtingen:** Petrischalen, 10 ml- und  
50 ml-Röhrchen  
**G. Heinemann Laboratoriums-Ausrüstungen, Schwäb. Gmünd:** Ultraschallgerät  
Branson Sonifier W-250.  
**Hettich Zentrifugen, Tuttlingen:** Mikroliter Tischzentrifuge; Kühlzentrifuge Mikro  
Rapid/K, Kühlzentrifuge Rotanta/RPC; Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP.

**Kimberley-Clark GmbH:** Kimwipes<sup>TM</sup> fusselfreie Papiertücher.

**Kontron Instruments GmbH, Eching:** Zweistrahl-Spektralphotometer Uvikon 930

**MJ Research:** Thermal Cycler für *Cycle Sequencing*.

**Pharmacia/LKB GmbH, Freiburg:** Activated Laser Fluorescence DNA-Sequencer (A.L.F.), Säulenmaterial: Chelating Sepharose<sup>R</sup>

**Savant Instruments, Vaterstetten:** Speed Vac Concentrator SVC 100 H.

**Sorvall Instruments, Bad Nauheim:** Zentrifuge RC-5C, Rotortyp SS34

**Schleicher & Schüll GmbH, Dassel:** 3MM-Filterpapier (Whatman).

## 3. Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, unter Schütteln bei 120-150 rpm bei 37 °C in dYT-Medium, welchem gegebenenfalls geeignete Antibiotika zugesetzt wurde. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (O.D. <sub>600</sub>) verfolgt. Zur Erzeugung von Einzelkolonien wurden Zellsuspensionen auf dYT-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C kultiviert.

Auf festem Nährmedium kultivierte Zellen konnten für einen Monat bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen einer Übernachtskultur mit 1 Volumen sterilem Glycerin vermischt und bei -70 °C gelagert.

#### 3.1.2 Anzucht und Lagerung von *Bacillus stearothermophilus* H3

*Bacillus stearothermophilus* H3 wurde unter Schütteln bei 100 rpm im 50 °C-Wasserbad kultiviert. Die Anzucht erfolgte in dYT-Medium, welchem 2 g *Beef extract* zugesetzt wurde. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (O.D. <sub>600</sub>) verfolgt. Zur Erzeugung von Einzelkolonien wurden Zellsuspensionen auf dYT-Beef extract-Agarplatten ausgestrichen und bei 50 °C kultiviert. Um eine Austrocknung der Agarplatten zu vermeiden, wurden diese in Plastikfolie verschweißt.

Auf festem Nährmedium kultivierte Zellen konnten für einen Monat bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen einer Übernachtskultur pelletiert, in sterilem Wasser resuspendiert und bei -70 °C gelagert. Die Zugabe von DMSO oder Glycerin erwies sich hier als nachteilig.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

#### 3.2.1.1 Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Cohen *et al.*, 1972)

Zur Präparation der kompetenten Zellen wurden 50 ml dYT-Medium mit 1 ml einer Übernacht-Kultur in 1 ml dYT bei 37 °C bis zum Erreichen einer O.D.<sub>600</sub> von 0.3 bis 0.4 geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4 °C, 10 min) und mit 20 ml und anschließend 10 ml einer eiskalten 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Nach Resuspendieren in 2 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis gelagert. Derart präparierte Zellen konnten eine Woche bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zur Transformation wurden 200 µl der Zellsuspension mit DNA (20 bis 400 ng in bis zu 10 µl Volumen) vermischt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde für 3 Minuten auf 42 °C erhitzt, 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes dYT-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 50 bis 200 µl auf geeignetem Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.1.2 Transformation gefrierkompetenter Zellen (Inoue *et al.*, 1990)

(Alle verwendeten Lösungen und Medien zur Präparation der Zellen wurden zur Verringerung von Spuren verunreinigender Agenzien mit Aktivkohle-behandeltem Wasser angesetzt. Weiterhin wurden alle verwendeten Geräte zweimal mit destilliertem Wasser autoklaviert.)

Zur Präparation der kompetenten Zellen wurden 400 ml SOC-Medium mit 2 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft und bei 18 °C über Nacht geschüttelt. Bei Erreichen einer O.D.<sub>600</sub> von 0.6 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend pelletiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4 °C, 10 min). Nach Aufnahme in 128 ml eiskaltem TB-Puffer wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und wie oben pelletiert. Dann wurden die Zellen in 32 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, mit DMSO versetzt (Endkonzentration: 7 % (v/v)) und weitere 10 Minuten auf Eis gelagert. Aliquots von 200 µl wurden dann in vorgekühlte sterile 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die so präparierten Zellen wurden bis zu einem Monat bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, DNA (bis 200 ng in bis zu 5  $\mu$ l) untergemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde für 30 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten SOC-Mediums wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Aliquots von 20 bis 200  $\mu$ l wurden dann auf geeignetem Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2 Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation

(nach Dower *et al.*, 1988)

Zur Präparation von Zellen wurden 50 ml SOC-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer O.D.<sub>600</sub> von 0.4 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 25 °C, 10 min) und in 400 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen. Nach weiterer Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen bei Erreichen einer O.D.<sub>600</sub> von 0.4 auf Eis abgekühlt und geerntet (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4 °C, 10 min). Dann wurden die Zellen in 100 ml eiskaltem, Aktivkohle-gereinigtem Wasser resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gelagert. Dann wurden die Zellen pelletiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4 °C, 10 min), in 20 ml eiskaltem, Aktivkohle-gereinigtem Wasser resuspendiert und wiederum 10 Minuten auf Eis gelagert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem, Aktivkohle-gereinigtem Wasser resuspendiert und nochmals 10 Minuten auf Eis gelagert. So behandelte Zellen wurden zur Transformation eingesetzt, weiterhin konnten Aliquots von 50  $\mu$ l in 1.5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C aufbewahrt werden.

Zur Transformation wurden 50  $\mu$ l Zellsuspension in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit DNA (10 bis 100 ng in maximal 2  $\mu$ l) vermischt. Dann wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0.1 oder 0.2 cm) überführt und ein elektrischer Puls angelegt (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 2.5 kV). Die Zeitkonstanten erreichten Werte von 4.0 bis 4.5 Millisekunden. Die Küvette wurde dann mit 1 ml dYT gefüllt und die Suspension zur Inkubation (1 Stunde bei 37 °C) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 20 bis 200  $\mu$ l auf geeignetem Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.3 Selektion von Klonen mittels X-Gal-Test

Plasmide der pBluescript-Reihe oder pTZ19 ermöglichen im geeigneten Stamm die Selektion auf ‚insert‘-tragende Klone mittels X-Gal-Test. Diese Plasmide weisen eine im 5'-Ende des *lacZ*-Gens gelegene multiple Klonierungsstelle auf. Dieses Plasmid-kodierte *lacZ*-Genfragment, welches für das sogenannte  $\alpha$ -Peptid kodiert, kann, unter Kontrolle der *lac*- Promoter- und Operatorregion durch IPTG-Zugabe induziert, eine im Stamm inaktivierte  $\beta$ -Galaktosidase komplementieren (Vieira und Messing, 1982). Zugegebenes Substrat X-Gal wird durch  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität gespalten und oxidiert dann zum blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo. Klone, bei welchem ein Insert in der multiplen Klonierungsstelle vorliegt, können das Plasmid-kodierte  $\alpha$ -Peptid nicht bilden und erscheinen als weiße Kolonien, während solche, denen ein Insert fehlt, blau erscheinen.

### 3.2.4 Methoden zur Präparation, Extraktion und Reinigung von DNA

#### 3.2.4.1 Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Messung wurden Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) verwendet. Eine O.D. von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger bzw. 31  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA. Die Reinheit einer DNA-Lösung konnte durch weitere Messung der O.D. bei 280 nm abgeschätzt werden. Ein Quotient  $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280} < 2$  zeigt eine Verunreinigung durch Proteine an.

#### 3.2.4.2 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Zur Fällung von DNA wurden 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat und 3 Volumina 96 % Ethanol zugegeben. Die so erreichte hohe Konzentration an monovalenten Kationen und anschließender Lösungsmittelentzug bewirken eine Fällung der DNA. Im Allgemeinen wurde für 5 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bei geringer DNA-Konzentration und/oder kleinen Fragmentgrößen wurde für eine Stunde bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (HETTICH Tischzentrifuge, 12.000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min) und das Pellet mit 75 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (HETTICH



Tischzentrifuge, 12.000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde das Ethanol vollständig abgenommen, Ethanolreste wurden durch Trocknen des Pellets für 10 Minuten bei Raumtemperatur oder 37 °C entfernt. Ein völliges Austrocknen des Pellets war hierbei zu vermeiden, da dies das anschließende Resuspendieren in TE-Puffer erschwert.

Bei größeren Volumina erfolgte die Fällung wie beschrieben, jedoch wurden zur Fällung statt Ethanol 0.7 Volumina Isopropanol zugegeben.

#### **3.2.4.3 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Zunächst wurde eine Phenollösung hergestellt werden. Dazu wurden 250 g kristallinen Phenols mit 65 ml destilliertem Wasser, 3.75 ml 2 M NaOH und 3 ml 1 M Tris/HCl (pH 7.5) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Als Oxidationsschutz wurden zur Lösung 0.1 % (w/v) p-Hydroxychinolin gegeben und schließlich mit Paraffin überschichtet. Diese Lösung wird im folgenden als Phenol bezeichnet.

Die Extraktion mit Phenol/Chloroform dient der Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen. Die Lösung wird mit 1 Volumen eines Gemisches aus Phenol und Chloroform (1:1) versetzt und durch Vortexen stark durchmischt. Es kommt zur Denaturierung der Proteine, welche sich nach Zentrifugation (HETTICH Tischzentrifuge, 12.000 rpm, RT, 5 min) in der Interphase sammeln. Die DNA-haltige wässrige Oberphase wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgt zur Entfernung von Phenolresten eine analoge Extraktion mit 1 Volumen Chloroform. Die wässrige Oberphase wird erneut überführt und die DNA mit Ethanol gefällt (3.2.4.2).

#### **3.2.4.4 Anreicherung biotinylierter PCR-Produkte mittels paramagnetischer Partikel**

Zur Anreicherung von biotinylierten PCR-Produkten aus einem Reaktionsgemisch wurden 10 µl einer PCR zur Entfernung von Oligonukleotiden mit dem NucleotraPCR<sup>®</sup> Kit nach Anweisungen des Herstellers behandelt. Die DNA wurde in 50 µl TE eluiert. 40 µl des Eluates wurden mit 50 µl Streptavidine MagneSphere-Partikelsuspension und 40 µl 2x BW Puffer gemischt und für 15 Minuten bei

Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach vier Runden des Waschens mit je 100 µl 1x BW Puffer wurden die Proben auf Eis platziert und gebundene DNA durch Aufnahme der Partikel in 40 µl eiskalter 0.1 M NaOH für zwei Minuten denaturiert. Der Überstand wurde durch Zugabe von 40 µl eiskaltem 0.1 M HCl und 5 µl 1 M Tris/HCl, pH 7.5 neutralisiert. Diese einzelsträngige DNA wurde als ‚template‘ in einer anschließenden zweiten PCR-Runde weiter angereichert.

#### **3.2.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe wurden 0.7 bis 1.5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst und, je nach verwendeter Gelkammer, in eine entsprechende Form oder direkt in eine Flachbettkammer gegossen. Sofortiges Einsetzen eines Kammes formt Taschen zum späteren Beladen der Gele mit DNA-Lösung. Nach Erkalten wird 1x TBE als Laufpuffer aufgefüllt. Die DNA-Lösung wurde mit Sucrose-Farbmarker versetzt und in die Taschen des Geles pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 bis 140 V durchgeführt. Gelen wurde entweder vor dem Gießen Ethidiumbromid zugesetzt (0.5 µg/ml) oder diese nach der Elektrophorese für 15 Minuten in einem Ethidiumbromid-Färbepad (1 µg/ml) geschwenkt und anschließend in Wasser entfärbt (5 Minuten). Das in DNA interkalierende Ethidiumbromid erlaubt das Sichtbarmachen von DNA im UV-Durchlicht (302 nm). Sollten kleine DNA-Fragmente (kleiner als 300 bp) aufgetrennt werden, so wurde eine Mischung aus 1 % (w/v) Hydroxyethylcellulose (HEC) und 1.5 % Agarose verwendet (nach Perlman und Halvorson, 1987).

#### **3.2.4.6 Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurde diese zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und der entsprechende Bereich aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte im weiteren mit dem Nucleotrap-Kit (Macherey & Nagel) nach den Angaben des Herstellers. Die Agarose wird dazu in einem chaotrophen Puffer gelöst und mit einer Silica-Matrix-Suspension versetzt, an welche die DNA bindet. Nun folgen Waschschrte mit Hochsalzpuffer sowie einem

Ethanol-haltigen Puffer. Die DNA wird schließlich in einem Niedrigsalz-Puffer (meist TE-Puffer) eluiert.

#### **3.2.4.7 Reinigung von Fluorescein-markierten Oligonukleotiden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Aufreinigung von Fluorescein-markierten Oligonukleotiden wurden diese in einem denaturierenden Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele der Maße 20 x 25 x 1.5 cm enthielten 15 % (v/v) Acrylamid und Bisacrylamid im Gewichtsverhältnis 30:0.8 (Protogel, National Diagnostics) und 8 M Harnstoff in 1x TBE-Puffer, als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Es wurden 7.5 nM Oligonukleotid mit 1 Volumen Formamid versetzt und aufgetragen, dann wurde mit 25 W für 2 Stunden aufgetrennt. Die an ihrer charakteristischen Farbe leicht erkennbaren Banden wurden ausgeschnitten und die DNA in 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 42 °C eluiert. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

#### **3.2.4.8 Präparation chromosomaler DNA aus *Escherichia coli***

Zellen einer 1.5 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 570 µl TE-Puffer resuspendiert, welcher zusätzlich 1 mg/ml Proteinase K enthielt. Dann wurden 30 µl 10 % (w/v) SDS zugegeben und bei 37 °C für 1h inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 5 M NaCl zugesetzt und eine Ethidiumbromid-Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Dann erfolgte eine dreifache Extraktion mit Phenol/Chloroform. Nach Zugabe von RNase A (1 mg/ml) und einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch Zugabe von 0.6 Volumina Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C über Nacht in 100 µl TE resuspendiert.

#### **3.2.4.9 Präparation chromosomaler DNA aus *Bacillus stearothermophilus* H3**

Niedermolekulare chromosomale DNA, welche als Template in einer PCR eingesetzt werden sollte, wurde wie folgt präpariert: Zellen einer Übernachtskultur wurden pelletiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4 °C, 10 min) und in 1/4 Volumen STE-Puffer, welcher 5 mg/ml Lysozym enthielt, aufgenommen. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten wurden 1/10 Volumen einer 10 % SDS-Lösung

(w/v) und Proteinase K in einer Konzentration von 5 mg/ml zugesetzt und für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. Dann wurde Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 1 mg/ml) und zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Anschließend wurde RNase A in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Extraktion mit Phenol/Chloroform wurde die DNA durch Zugabe von 1.5 Volumina Ethanol (96 %) gefällt, pelletiert (HETTICH Tischzentrifuge, 12000 rpm, 4°C, 1 min) und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde über Nacht bei 4 °C in in TE-Puffer (1/10 Volumen der Ausgangskultur) resuspendiert.

Hochmolekulare DNA zur Konstruktion von Kosmidbanken wurde folgendermaßen präpariert: 50 ml einer Übernachtskultur wurden zum Animpfen einer 500 ml-Kultur eingesetzt. Bei Erreichen einer O.D.<sub>600</sub> von 1.0 wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4°C, 30 min) und in 12.5 ml TEN-Puffer, welcher 1 mg/ml Lysozym enthielt, aufgenommen. Anschließend wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 12.5 ml Proteinase K-Puffer zugegeben und nach vorsichtigem Mischen über Nacht bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 ml Ethanol (96 %) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen die gefällte DNA in ein neues Gefäß überführt. Diese wurde dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht in 5 ml TE-Puffer resuspendiert.

#### **3.2.4.10 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (nach Le Gouill *et al.*, 1994) wurden 2 ml einer Übernachtskultur pelletiert (HETTICH Tischzentrifuge, 12000 rpm, RT, 1 min) und in 150 µl Mini-Lösung I resuspendiert. Die Lyse im Alkalischen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Mini-Lösung II und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Minuten. Dann wurden 225 µl Mini-Lösung III, anschließend 200 µl Chloroform zugegeben und durch Vortexen kräftig gemischt. Die schnelle Neutralisation und anschließendes Mischen mit Chloroform bewirkt eine Fällung der chromosomalen DNA und Proteine, Plasmid-DNA bleibt in Lösung. Nach einer Zentrifugation (HETTICH Tischzentrifuge, 12000 rpm, RT, 5 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol gefällt (3.2.4.2). Alternativ zu dieser Methode wurden Kits (Amersham Pharmacia, Quiagen) zur

analytischen Isolierung nach Angaben der Hersteller verwendet. Bei diesen wird die Plasmid-DNA nicht mit Ethanol gefällt, sondern in kleinen Säulen an eine Anionenaustauscher-Matrix gebunden, gewaschen und eluiert. Die Säulen werden dazu in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, wodurch eine schnelle Aufreinigung erreicht werden kann. Diese DNA eignete sich besonders zur Sequenzierung wenn nur vergleichsweise kurze Leseweiten nötig waren.

Zur Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden Jetstar-Kits (Genomed) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dazu wurde Plasmid-DNA ausgehend von 30 ml einer Übernacht-Kultur präpariert. Das Prinzip entspricht dem der alkalischen Lyse. Nach Fällung der chromosomalen DNA und der Proteine wird die Plasmid-DNA-Lösung hier zunächst über Anionenaustauscher-Säulen gereinigt und anschließend mit Isopropanol gefällt.

### 3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Mullis und Falloona, 1987)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden zwei die amplifizierende DNA flankierende Oligonukleotide (Primer) sowie Matrizen-DNA in einem geeigneten Puffer mit einer temperaturstabilen Polymerase vermischt und einem dreistufigen Temperaturzyklus in mehreren Zyklen ausgesetzt. Die üblicherweise angesetzte Mischung war folgende:

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Matrizen-DNA	200 ng
Primer	je 100 pmol
dNTP-Gemisch	20 mM je dNTP
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Tfl-Puffer	1x (laut Hersteller)
Tfl-Polymerase	1 u
Wasser	ad 50 µl

Durch Zugabe von Tetramethylammoniumchlorid konnte in einigen Fällen die Spezifität der Amplifikation sowie die Ausbeute an Produkt zu erhöht werden (Chevet *et al.*, 1995).

Die Ansätze wurden in 0.5 ml-Reaktionsgefäßen mit ‚Chill-out‘ Wachs überschichtet und in einem PCR-Block plaziert. Üblicherweise wurde zunächst ohne Polymerase für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt (*‚hot start‘*), dann auf 85 °C abgekühlt und dann die Polymerase zugegeben. Dann wurde 15 Sekunden bei 92 °C denaturiert, dann für 15 Sekunden hybridisiert und schließlich bei 72 °C elongiert. Die Hybridisierungstemperatur war abhängig von den verwendeten Primern. Die Schmelztemperatur errechnete sich für jeden Primer nach:

$$T_M = 69.3 + 0.41 \times (\text{GC-Gehalt in mol\%}) \text{ [}^\circ\text{C]}$$

Die Hybridisierungstemperatur (auch *‚annealing‘*-Temperatur) ist abhängig von den Schmelztemperaturen  $T_1$  und  $T_2$  der beiden verwendeten Primer:

$$T_{\text{hyb}} = (T_1 + T_2) \div 2.5$$

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des amplifizierten Fragmentes. Üblicherweise werden hier 1 Minute pro kbp gerechnet. Die drei Zyklen wurden nun 20 bis 30 mal wiederholt, die Reaktion am Ende auf 4 °C abgekühlt.

Eine Optimierung der *‚annealing‘*-Temperatur konnte auf einem ‚Mastercycler Gradient‘ (Eppendorf) durchgeführt werden. Dabei wurde im *‚annealing‘*-Schritt über den Bereich des Heizblockes ein definierter Temperaturgradient erzeugt, die Reaktionsgefäße wurden in geeigneter Weise auf dem Block plaziert.

Wurden Gemische aus Oligonukleotiden (*‚degenerierte Primer‘*) eingesetzt, so konnte die Spezifität durch eine *‚touchdown‘*-PCR erhöht werden (Don *et al.*, 1991). Dabei werden vor einer PCR unter Standardbedingungen (s.o.) zunächst einige Zyklen vorangesetzt, bei welchen eine *‚annealing‘*-Temperatur deutlich über der errechneten gewählt wird. Diese wird dann in jedem Zyklus verringert. Dies führt dazu, daß Oligonukleotide, welche mit der *‚template‘*-Sequenz gut übereinstimmen, einige Zyklen eher eine Amplifikation bewirken. Dieser ‚Vorsprung‘ in der Amplifikation führt zu einer bevorzugten Amplifikation mit passenden Primern eines Gemisches.

### 3.2.5.1 SOE-PCR zur Fusionierung von DNA-Fragmenten

Zur Fusionierung zweier DNA-Fragmente, die über einen Bereich von 20 bp oder mehr überlappen mußten, wurde die Methode der SOE-PCR (*„splicing by overlap extention“*) angewandt (Yon und Fried, 1989; Daugherty *et al.*, 1991, Horton *et al.*, 1993). Dazu wurden zunächst zehn Zyklen einer Standard-PCR mit je etwa 50 ng der zu fusionierenden DNA-Fragmente durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur lag hier bei 45 °C. Dann wurden zwei Primer zugegeben, die das Gesamtfragment flankieren. Anschließend wurde eine PCR unter Standardbedingungen fortgeführt.

### 3.2.5.2 Inverted-PCR (Ochman *et al.*, 1988; Triglia *et al.*, 1988)

Die *„inverted“*-PCR wurde eingesetzt, wenn Sequenzinformation 5' und 3' eines bekannten DNA-Abschnittes benötigt wurden. Dazu wurde *„template“*-DNA, auf welcher der bekannte Abschnitt vorhanden ist, mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten und in verdünnter Lösung ligiert, sodaß zirkuläre DNA gebildet wurde. Diese diente dann als Matrize. Die Primer paarten dabei derart mit der Matrizen-DNA, daß eine DNA-Synthese ausgehend von den beiden Primern in entgegengesetzte Richtung verlief. Die PCR-Bedingungen waren dann dieselben wie in Abschnitt 3.2.5. Wegen der zirkulären Natur der Matrize kam es zur Amplifikation eines linearen DNA-Fragmentes, welches fast der gesamten zirkulären Matrize entsprach. Ein solches Fragment konnte dann kloniert und sequenziert werden.

Um zu zirkulärer DNA der hierfür geeigneten Größe zu gelangen, mußten verschiedenen Restriktionsendonukleasen zur Herstellung der zirkulären Matrizen-DNA getestet werden. Sehr kurze DNA-Fragmente können nicht zirkularisiert werden. Entstehen bei der Ligation zu kleine zirkuläre Moleküle, so ist die Menge an neuer Sequenzinformation unter Umständen zu gering. Sind die zirkulären Produkte, auf welchen das bekannte Fragment liegt, zu groß, ist die Sequenzierung langwierig. Unter Umständen läßt sich wegen der Größe gar kein PCR-Produkt erzeugen.

### 3.2.5.3 Kolonien-*„screening“* mittels PCR

Zum *„screening“* von Plasmid-tragenden Klonen auf Anwesenheit bestimmter Plasmid-kodierter Sequenzen wurden Zellen einer Kolonie mit einem Zahnstocher in ein PCR-Reaktionsgefäß übertragen und anschließend auf einer Masterplatte abgelegt. Durch Kochen der Zellen für 2 Minuten bei 98 °C wurden diese

aufgeschlossen. Nach Abkühlen auf 85 °C wurden Polymerase und Primer zugegeben; dem schloß sich eine gewöhnliche PCR an. Nach Analyse der Reaktionen auf einem Agarosegel konnten identifizierte positive Klone von der Masterplatte abgenommen werden. Diese Methode erlaubte die Untersuchung einer großen Anzahl von Klonen.

In der Praxis wurden zunächst zwei Gemische angesetzt. Das erste Gemisch enthielt einfachen Polymerasepuffer, 0.1 % Triton-X100 sowie Wasser mit einem Volumen von 25 µl pro PCR. Das zweite Gemisch enthielt einfachen Polymerasepuffer sowie alle auf 50 µl Gesamtvolumen berechneten restlichen Komponenten (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Primer und Polymerase) in 25 µl Volumen. Die Zellen wurden zunächst in 25 µl Detergenz-haltigem Puffer aufgekocht. Alle für eine PCR notwendigen Komponenten wurden dann in 25 µl des zweiten Gemisches zugefügt. Dann erfolgte eine Standard-PCR wie in Abschnitt 3.2.5.

### **3.2.6 Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **3.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde nach Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren. Die DNA wurde in einem geeigneten Puffer mit der nötigen Enzymmenge versetzt und bei geeigneter Temperatur inkubiert. Bei gleichzeitiger Spaltung mit zwei oder mehr Enzymen erwies sich KGB-Puffer oft als geeignet. Im Falle präparativer Spaltung wurde unter Verwendung einer geringeren Enzymmenge über Nacht inkubiert. Einige Enzyme konnten durch Hitze, etwa durch Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten, inaktiviert werden.,'

#### **3.2.6.2 Phosphorylierung von DNA-Enden**

Zur Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA wurden 200 pmol DNA mit 1 u T4 Polynukleotidkinase in PNK-Puffer versetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde durch einen Hitzeschritt das Enzym inaktiviert (20 Minuten, 65 °C). Die Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA war nötig, wenn Oligonukleotide mit ihrem 5'-Ende ligiert werden sollten.



### 3.2.6.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden wurde durchgeführt, um eine Religation von Plasmid-DNA zu vermeiden und war besonders dann wichtig, wenn Plasmid-DNA mit nur einer Restriktionsendonuklease oder mit solchen, die glatte Enden erzeugen, gespalten war.

Die Dephosphorylierung der DNA erfolgte nach deren Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durch Zusatz von 10 u CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) pro  $\mu\text{g}$  DNA und einer weiteren Inkubation bei 37 °C für 30 min. Die Dephosphorylierung konnte in allen verwendeten Puffern durchgeführt werden. Eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C ist möglich. Für maximale Ligationseffizienzen, wie z.B. im Falle der Generierung von Repertoires und DNA-Banken benötigt, war die Verwendung von *Shrimp Alkaline Phosphatase* vorzuziehen, da diese weitaus hitzelabiler ist und die effizientere Inaktivierung sich positiv auf die Ligationseffizienz auswirkte. Die Inkubation wurde in diesem Fall bei 16 °C durchgeführt.

### 3.2.6.4 Glättung von DNA-Enden

Zur Glättung von DNA-Enden wurden 2 u T4 DNA Polymerase pro  $\mu\text{g}$  DNA im vom Hersteller empfohlenen Puffer in Anwesenheit von 20  $\mu\text{l}$  jenden dNTPs gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 11 °C wurde die Polymerase durch Erhitzen inaktiviert (10 Minuten, 75 °C).

### 3.2.6.5 Ligation von DNA-Enden

Die Ligation von DNA wurde in geeignetem ATP-haltigen Puffer durchgeführt. Dabei wurde für eine Standardligation 1 u T4 DNA Ligase mit etwa 200 ng Plasmid-DNA sowie einem 2-3fachen molaren Überschuß an ‚insert‘-DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 16 °C über Nacht. In einigen Fällen war eine Inkubation bei 37 °C für 1 h ausreichend.

Sollte eine Rezirkularisierung von DNA-Fragmenten erzielt werden, so war eine DNA-Konzentration von maximal 2  $\mu\text{g/ml}$  sowie 0.02 u/ $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase einzusetzen.

### 3.2.6.6 Markierung von DNA mit DIG-11-dUTP

Zur Erzeugung Digoxigenin-markierter DNA, welche als Sonden eingesetzt werden sollte, wurde eine PCR unter Verwendung von ‚DIG dNTP labeling mixture‘ (Boehringer) durchgeführt. Die Mischung für die PCR war folgende:

Komponente	Menge
Matrizen-DNA	200 ng
Primer	je 100 pmol
DIG-dNTP-Gemisch	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
KCl	10 mM
Tris/HCl, pH 8.8	10 mM
Taq-Polymerase	1 u
Wasser	ad 50 µl

Es wurden 30 Zyklen einer Standard-PCR durchgeführt. Zur Entfernung von Nukleotiden sowie Primern wurde der Ansatz anschließend mit Hilfe des NucleotraPCR (Macherery und Nagel) aufgereinigt.

### 3.2.7 Kolonie-Hybridisierung

Bei der Kolonie-Hybridisierung wurden Zellen auf eine Membran übertragen und auf dieser lysiert. Anschließend wurde die DNA aus den Zellen durch Backen auf der Membran fixiert. Nach Behandlung mit Proteinase K wurden Zelltrümmer entfernt. Mit Hilfe einer spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde konnten dann DNA-Abschnitte identifiziert und mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern detektiert werden. Die Antikörper waren mit Alkalische Phosphatase gekoppelt, welche das zur Detektion verwendete Substrat CSPD spaltet. Dadurch kam es zur Emission von Licht der Wellenlänge 477 nm, auf diese Weise konnte die Sonde autoradiographisch detektiert werden. Diese Methode erlaubte eine effiziente Suche nach DNA-Abschnitten in Plasmid- oder Kosmid-Bibliotheken.

Die Agarplatten, auf welchen die zu untersuchenden Kolonien gezogen worden waren, wurden für 30 Minuten bei 4 °C gekühlt. Vorbereitend wurden je zwei Lagen Whatman-Papier mit Lysislösung, Neutralisierlösung sowie 2x SSC getränkt. Nun

wurde auf Größe der Agarplatten zurechtgeschnittene Nylonmembran für eine Minute vorsichtig auf die Agarplatten gelegt und die Lage durch drei Einstiche mit einer Nadel markiert. Die Membran wurde dann kurz auf trockenes Whatman-Papier gelegt. (Die Seite der Membran, welche den Kolonien zugewandt war, zeigte dabei und in allen folgenden Schritten stets nach oben.) Dann wurde die Membran für 15 Minuten auf dem mit Lysislösung getränkten Whatman-Papier plaziert, anschließend kurz auf trockenem Whatman-Papier. Anschließend wurde dieser Vorgang mit dem mit Neutralisierlösung getränkten Papier wiederholt. Nach Äquilibrieren auf dem mit 2x SSC getränkten Whatman-Papier für 10 Minuten wurde die Membran zur Fixierung der DNA für 3 Minuten in einer Mikrowelle (600 W) gebacken. Dann wurde mit Proteinase K-Lösung überschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zum Entfernen von Agaroseresten und Zelltrümmern wurde die Membran anschließend mehrmals zwischen zwei mit Wasser getränkten Stücken Whatman-Papier gepresst.

Nun erfolgte eine Prähybridisierung mit ‚DIG Easy-Hyb‘-Lösung für zwei Stunden im auf 42 °C vorgeheizten Hybridisierungssofen. Dann wurde gegen Sondenlösung ausgetauscht und über Nacht bei 42 °C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC gewaschen, gefolgt von zwei Waschschritten für je 15 Minuten bei 68 °C in 0.5x SSC.

Zur Detektion wurde die Membran zunächst für eine Minute bei Raumtemperatur in Waschpuffer äquilibriert. Der Antikörper wurde in ‚blocking‘-Lösung gegeben (Verdünnung: 1:5000 (v/v); diese Antikörper-Lösung konnte bei 4 °C für bis zu 4 Wochen gelagert werden). Die Antikörper-Lösung wurde zur Sedimentation von Aggregaten zentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 25 °C, 5 min) und die Membran in dieser für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Dann wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen (je 15 Minuten bei Raumtemperatur). Nach Äquilibrieren mit Detektionspuffer für zwei Minuten bei Raumtemperatur wurde über der Membran CSPD-Lösung verteilt (10 µl/cm<sup>2</sup>) und in Folie eingeschlagen. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten wurden Hybridisierungssignale durch Schwärzung eines Röntgenfilms (X-OMAT, Kodak) detektiert. Die Expositionszeiten variierten hier zwischen 15 Minuten und 2 Stunden. Die Filme wurden durch Schwenken in Entwicklerlösung (zwei Minuten), Wässern, Schwenken in Fixierer (zwei Minuten), nochmaliges Wässern und schließlich Trocknen an der Luft entwickelt.

### 3.2.8 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von doppelsträngiger DNA wurden durch ‚*cycle sequencing*‘ Abbruchfragmente nach der Dideoxynukleotidmethode (Sanger *et al.* 1977) generiert. Die Verwendung eines IRD800-markierten Oligonukleotides ermöglichte die Analyse mit Hilfe eines LICOR DNA Sequencers (Modell 4000 L). Hierbei werden die Proben elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen Infrarot-Laser-Scanner detektiert.

Die ‚*cycle sequencing*‘-Reaktionen enthielten 1 pmol des IRD800-markierten Oligonukleotids und 50 ng DNA pro kb der zu sequenzierenden Matrize in insgesamt 3 µl sowie jeweils 1 µl einer der vier Stopmixe (A-, C-, G- oder T-Stopmix; *ThermoSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit*, Amersham). Die Stopmix-Lösungen enthielten alle sonstigen erforderlichen Komponenten (Puffer, Polymerase, dNTPs und Dideoxynukleotid). Als Polymerase kam hierbei eine Variante der Taq-Polymerase zum Einsatz, bei welcher das Phenylalanin 677 gegen Tyrosin ausgetauscht ist, was zu einer verbesserten Einbau-Effizienz von Dideoxynukleotiden führt (Tabor und Richardson, 1995). Die Sequenzreaktion wurde zunächst für 2 Minuten bei 95 °C inkubiert, dann folgten 20 Zyklen von jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 15 Sekunden Hybridisierung und 30 Sekunden Elongation bei 72 °C. Die Hybridisierungstemperatur lag dabei 3 °C über der berechneten Schmelztemperatur (siehe Abschnitt 3.2.5). Anschließend wurden 4 µl LICOR-Stopmix zugegeben und das Sequenzgel mit 0.5 bis 1.5 µl beladen.

Die Größe sowie die Zusammensetzung der Sequenzgele richtete sich nach der angestrebten Leseweite. Sollten nur wenige Basen (bis etwa 150 bp) gelesen werden, genügte ein 25 cm langes Gel. Für größere Leseweiten wurden 41 cm (bis etwa 400 bp) oder 66 cm (bis über 1000 bp) lange Gele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele sowie die zugehörigen Laufparameter sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Geltyp	25 cm	41 cm	66 cm
Sequagel XR	24 ml	40 ml	-
Sequagel complete	6 ml	10 ml	-
Protogel	2 ml	-	-
Longranger	-	-	4.3 ml
Harnstoff	-	-	21 g
10x TBE	-	-	5 ml
TEMED	-	-	50 $\mu$ l
10 % APS (w/v)	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Wasser	-	-	32 ml
Voltage	800 V	1500 V	2200 V
Power	40 W	50 W	50 W
Current	37 mA	37 mA	37 mA
Temperature	50 °C	50 °C	45 °C
Scan speed	4	3	3
Frames	20	25	35
Prerun	20 min	30 min	45 min
Buffer (TBE)	1x	1x	0.8x

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des ‚BaseImage‘-Programmpaketes (v 2.21, LI-COR).

### 3.2.9 Herstellung von Spaltsubstraten

Zur Herstellung von Spaltsubstraten für Spalttests (3.4.1) und multiple Substratkinetiken (3.4.2) wurden 6 pmol eines oberen, Fluorescein-markierten Oligonukleotides, mit 30 pmol eines unmarkierten unteren Oligonukleotides in SSC-Puffer in 30  $\mu$ l Gesamtvolumen gemischt und für zwei Minuten auf 80 °C erhitzt. Dann wurde das Gemisch bei 50 °C für 15 Minuten auf einem Thermoblock plaziert, anschließend für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Konzentration an doppelsträngigem Substrat wurde durch Verdünnen mit SSC-

Puffer auf 10 fmol/ $\mu$ l eingestellt (Endvolumen 600  $\mu$ l) und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.10 Quantitative Detektion Fluorescein-markierter DNA

Die quantitative Detektion von Substraten und Produkten der Spaltungsreaktionen (3.4.1 und 3.4.2) erfolgte mit einem A.L.F.-Sequenzierautomaten. Dazu wurden die DNA-Fragmente eines Reaktionsgemisches auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion wird das Gel im unteren Bereich horizontal von einem Laser ( $\lambda=490\text{ nm}$ ) durchleuchtet. Auf der Höhe des Laserstrahles sind hinter der Glasplatte des Geles 40 Detektoren im Abstand der 40 Spuren des Geles angebracht. Passiert im Verlaufe der Elektrophorese ein Fluorescein-markiertes DNA-Fragment einen Detektor, so wird die durch den Laser angeregte Fluoreszenz quantitativ gemessen.

Die Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele ist in folgender Tabelle aufgeführt:

Komponente	Menge
Acrylamid (40 %)	17.3 ml
Bisacrylamid (10 %)	10.7 ml
Harnstoff	32 g
10x TBE	9.7 ml
TEMED	75 $\mu$ l
APS (10 %, w/v)	500 $\mu$ l
Wasser	ad 80 ml

Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung bis 1.500 V bei bis zu 34 W. Die Geltemperatur betrug  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Proben wurden nach einem einstündigen Vorlauf aufgetragen. Bei der Größe der hier verwendeten Substrate waren mehrere Aufträge im Abstand von 60 bis 70 Minuten möglich.

### 3.2.11 Konstruktion genomischer Kosmidbanken

Zur Konstruktion von Kosmidbanken wurde chromosomale DNA einem Partialverdau mit *Bsp143I* unterzogen. Dieses Enzym spaltet die Sequenz GATC und

produziert einzelsträngige Überhänge von vier Basen. Es schneidet bei einem G/C-Gehalt von 50 % statistisch alle 256 Basen. Die partialverdaute DNA wurde dann mit Kosmidarmen ligiert, welche durch Spaltung des Plasmides SuperCos1 erzeugt wurden. Anschließend erfolgte eine *in vitro*-Verpackung in Phagenpartikel, welche für eine Infektion eines geeigneten Stammes eingesetzt wurden.

Für die Konstruktion von Kosmidbanken mußte hochmolekulare chromosomale DNA verwendet werden (3.2.4.8). Diese wurde in einem Partialverdau derart geschnitten, daß auf einem Agarosegel ein minimaler Unterschied zur unverdauten DNA erkannt werden konnte. Anschließend wurde die gespaltene DNA von Restriktionsendonuklease befreit (Phenol/Chloroform-Extraktion, 3.2.4.3, Ethanol-Fällung, 3.2.4.2) und zur Dephosphorylierung der 5'-Enden mit CIAP behandelt (3.2.6.3)(gefolgt von einer weiteren Extraktion mit Phenol/Chloroform und anschließender Ethanol-Fällung). Dies verhinderte die Ligation zweier Stücke chromosomaler DNA bei der folgenden Ligation mit Kosmid-Armen.

Die Kosmid-Arme wurden folgendermaßen vorbereitet: 20 µg SuperCos1-DNA (siehe 2.3) wurden mit *Xba*I linearisiert und dephosphoryliert. Die Vollständigkeit der Dephosphorylierung wurde durch einen Ligationstest, bei welchem mit und ohne Zusatz von Polynukleotidkinase inkubiert wurde, überprüft. Multimere sCos1-DNA durfte dabei nur im Ansatz mit Polynukleotidkinase zu beobachten sein. Dann folgte eine Spaltung mit *Bam*HI, welche zur Erzeugung zweier Kosmidarme führt und die geeigneten Überhänge zur *Bsp*143I-verdauten chromosomalen DNA erzeugt.

Zur Ligation wurden 4 µg Kosmid-Arme sowie 3 µg partialverdauter chromosomaler DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Vor Zugabe der Ligase wurde ein Aliquot (1 µl) entnommen und nach Ligation zusammen mit einem Aliquot der Ligation auf einem Agarosegel betrachtet. Der Vergleich der Aliquots vor und nach Ligation ließ eine erfolgreiche Ligation daran erkennen, daß die Kosmidarm-Fragmente nach der Ligation auf einem Agarosegel nicht mehr detektierbar waren.

Zur Verpackung in Phagenpartikel des Phagen  $\lambda$  wurde 1/10 Volumen des Ligationsansatzes eingesetzt. Dabei wurde das Gigapack III XL-Kit verwendet, welches bevorzugt große rekombinante  $\lambda$ -DNA-Fragmente im Bereich von 47-57 kbp verpackt. Der Verpackungsextrakt wurde aus einem  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Kühlfach entnommen und zwischen den Fingerspitzen angetaut. Bevor dieser komplett aufgetaut war, wurden 2 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl SM-Puffer

sowie 20 µl Chloroform zugegeben, kurz zentrifugiert und der infektiöse Überstand abgenommen. Dieser Verpackungsansatz konnte einen Monat bei 4 °C aufbewahrt werden.

Als Wirtstamm wurde BMH71-18 verwendet. 20 ml dYT wurden mit 0.2 % Maltose und 10 mM Magnesiumsulfat versetzt. Nach Animpfen mit einer Einzelkolonie wurde bei 37 °C bis zum Erreichen einer maximalen O.D.<sub>600</sub>=1.0 geschüttelt. Dann wurden die Zellen pelletiert (Hettich Rotanta/PC, 4000 rpm, 25 °C, 5 min) und in 6 ml 10 mM Magnesiumsulfatlösung resuspendiert. Die O.D.<sub>600</sub> wurde mit 10 mM Magnesiumsulfatlösung auf einen Wert von 0.5 eingestellt. Dann wurden 25 µl einer 1/25- und einer 1/50-Verdünnung mit 25 µl Zellsuspension vermischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl dYT wurde für eine Stunde bei 37 °C zur Ausprägung der Antibiotikaresistenzen inkubiert. Dann wurde auf SOC-Agar plattiert, welcher zur Selektion Kosmid-tragender Zellen Kanamycin und Ampicillin enthielt, es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

Die Anzahl der Kolonien, welche nötig ist, um eine bestimmte Abdeckung des Genoms (*coverage* [%]) zu erreichen, errechnet sich nach:

$$\text{Kolonienzahl} = \frac{\ln(1 - \text{coverage})}{\ln\left(1 - \frac{\text{Fragmentgröße}}{\text{Genomgröße}}\right)}$$

### 3.2.12 Subklonierung von Kosmiden als Plasmidbibliotheken

Zur Sequenzierung von Kosmiden wurde eine Plasmidbibliothek mit ‚insert‘-Größen von 2.5 bis 5 kbp erzeugt. Dazu wurden 10 µg Kosmid-DNA mechanisch gesichert (Hengen, 1997). Die DNA-Lösung wurde zehn Minuten mit einer Flußrate von 7 ml/min über eine Düse in einem Kreislaufsystem gepumpt, was einen Druck mit Spitzen von etwa 0.5 kpsi erzeugte. Die Hauptfraktion der entstandenen Fragmente lag auf diese Weise bei 4 kbp. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und zur Erzeugung glatter Enden mit T4 DNA Polymerase behandelt (3.2.6.4). Fragmente der Größe von 2.5 bis 5 kbp wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert und zur Klonierung in den Vektor pTZ19R- $\Delta$ *bla cat* eingesetzt. Dieser war dazu mit *Sma*I



linearisiert und mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert worden. Zur Ligation wurden 2 µg Kosmid-DNA sowie 20 ng Plasmid-DNA eingesetzt und über Nacht bei 16 °C ligiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert und für 30 Minuten auf einem Schwammfilter gegen destilliertes Wasser dialysiert. Zur Transformation wurden Elektroporationskompetente DH5α-Zellen eingesetzt (3.2.2). Die Kombination von pTZ19R-*Δbla-cat* und DH5α ließ eine Selektion ‚insert‘-tragender Klone *via* X-Gal-Test zu (3.2.3). Der hier erreichte Anteil Insert-tragender Klone lag über 50 %.

### 3.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

#### 3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde spektroskopisch ermittelt. Hierfür wurde die Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $E_{280}$ ) bestimmt. Nach  $\epsilon = 5500 \cdot (\text{Anzahl der Tryptophane}) + 1490 \cdot (\text{Anzahl der Tyrosine}) + 125 \cdot (\text{Anzahl der Cysteine})$  (Pace *et al.*, 1995) wird der Extinktionskoeffizient des betreffenden Proteins berechnet und kann die Konzentration  $c$  mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermitteln:

$$c = E_{280} / \epsilon \cdot d \quad \text{mit } d: \text{ Schichtdicke der Küvette (hier meist 1cm).}$$

#### 3.3.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

(SDS-PAGE) (nach Laemmli, 1970)

Zur analytischen Auftrennung von Proteingemischen und zur Dokumentation von Proteinreinigungsschritten wurde eine Gelelektrophorese unter Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur durchgeführt. Die Auftrennung nach Molekülgröße erfolgte auf SDS-Polyacrylamidgelen der Größe 100x60x0.75 mm bei einer konstanten Stromstärke von bis zu 30 mA. Das Trenngel enthielt 10-15 % (v/v) Acrylamid und Bisacrylamid im Gewichtsverhältnis 30:0.8 sowie 375 mM Tris/HCl, pH 8.8 und 0.1 % SDS (w/v), das Sammelgel enthielt stets 5 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0.8), 125 mM Tris/HCl, pH 6.8 sowie 0.1 % SDS (w/v). Als Laufpuffer diente PAGE-Puffer. Proteinproben wurden vor der Elektrophorese

mit Proteinprobenpuffer versetzt (1:1) und zur Denaturierung 5 Minuten auf einem Heizblock bei 100 °C inkubiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten unter leichtem Schwenken in PAG-Färbelösung angefärbt und dann wiederholt durch Kochen in Wasser in einer Mikrowelle (5 Minuten, 750 W) entfärbt, bis Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

### 3.3.3 Präparation von Zellextrakten im analytischen Maßstab

Zur Präparation löslicher Proteine wurde 1 ml einer 3 ml-Kultur (Anzucht über Nacht) abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 12000 rpm, 4°C, 10 min) und das Zellpellet in 200 µl Proteinprobenpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden auf Eis plaziert und durch Ultraschall (Branson Sonifier W-250 mit 1/2"-Titan-Mikrospitze) aufgeschlossen (zehn 1-Sekunden-Pulse). Anschließend wurde für 10 Minuten auf einem Heizblock bei 100 °C inkubiert. Vor einer elektrophoretischen Auftrennung wurde 1 Minute zentrifugiert (Tischzentrifuge, 12000 rpm, 4°C, 10 min).

### 3.3.4 Präparative Gewinnung löslicher Proteine

Die Zellen von 50 ml einer frischen Übernachtskultur des Plasmid-tragenden Expressionsstammes wurden zum Animpfen von 1 l TB Selektivmedium eingesetzt und anschließend eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Nachdem die Kultur weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert worden war, wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 4°C, 30 min) und in 20 ml geeignetem Puffer aufgenommen. So gewonnene Zelllösungen konnten mehrere Wochen bei -70°C gelagert werden. Zum Zellaufschluß wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und eine Tablette ‚Complete‘ Protease-Inhibitor, die zuvor in 1 ml geeignetem Puffer gelöst worden war, zugegeben. Durch Passage durch eine *French Cell Press* (138 MPa) und nachfolgende Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier W-250 mit 1/2"-Titan-Mikrospitze) wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (Sorvall RC5C, SS34, 15000 rpm, 4°C, 30 min) und der Überstand abgenommen.

### 3.3.5 Aufreinigung von Proteinen

#### 3.3.5.1 Fraktionierte Fällung mittels Ammoniumsulfat

Bei der fraktionierten Fällung mittels Ammoniumsulfat wird die Beobachtung genutzt, daß verschiedene Proteine bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen präzipitieren. Werden nicht sehr hohe Konzentrationen benötigt, so wird zur Proteinlösung bei 4 °C unter leichtem Rühren eine gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung zugetropft. Dies geschah zur Vermeidung erhöhter lokaler Konzentrationen so langsam wie möglich bis zum Erreichen der gewünschten prozentualen Sättigung an Ammoniumsulfat. Ausgefallenes Protein wurde anschließend abzentrifugiert, das Pellet im geeigneten Puffer durch langsames Schwenken resuspendiert und dann zur Entfernung des Salzes gegen ein 50faches Volumen geeigneten Puffers unter leichtem Rühren bei 4 °C über Nacht dialysiert.

#### 3.3.5.2 IMAC ('*immobilized metal affinity chromatography*') (Porath, 1975)

Proteine, welche mit einer N- oder C-terminalen Hexahistidin-Sequenz fusioniert wurden, konnten durch Bindung an Nickelionen-beladene *Chelating Sepharose* (Pharmacia) aufgereinigt werden. Die hier verwendeten Säulenvolumina waren 2 bis 4 ml, die Aufreinigung erfolgte gravimetrisch. Vor Auftragen der Proteinlösung wurde das Säulenmaterial zweimal mit drei Säulenvolumina Wasser gewaschen, dann wurden zur Beladung mit Nickelionen 5 ml einer 0.5 M NiCl<sub>2</sub>-Lösung aufgetragen. Nach einmaligem Waschen mit drei Säulenvolumina Wasser wurde das Material mit zweimal drei Säulenvolumina IMAC-Puffer 1 prääquilibriert. Dann wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben. Anschließend wurden durch zweimaliges Waschen mit drei Säulenvolumina IMAC-Puffer 1 ungebundene Proteine entfernt. Dann folgte eine Elution des Proteins in einem Imidazol-Stufengradienten. Die benötigten Imidazolkonzentrationen wurden durch Mischen von IMAC-Puffer 1 und 2 eingestellt. Durch Waschschrte mit niedriger Imidazolkonzentration wurden dabei Proteine mit einer niedrigen Affinität zur beladenen Matrix entfernt. Proteine, die eine Hexahistidin-Sequenz aufwiesen, wurden bei Imidazolkonzentrationen über 100 mM eluiert. Die Aufreinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE dokumentiert.

### 3.3.5.3 Ionenaustauscher- und Heparin-Affinitätschromatographie

Bei der Ionenaustauscher-Chromatographie wird die unterschiedliche Affinität von Proteinen zu geladenen Matrix-ständigen Gruppen genutzt. Hierbei werden Matrices mit negativ (Kationenaustauscher) oder positiv (Anionenaustauscher) geladenen Gruppen verwendet. Als affinitätschromatographische Matrix wurde hier Heparin verwendet, wobei die Affinität DNA-bindender Proteine zu Heparin genutzt wird (Farooqui, 1980). Bei beiden Trennmethoden wird eine Proteinlösung in Niedrigsalzpuffer aufgetragen und nach einem Waschschrift mit Niedrigsalzpuffer zur Entfernung nichtgebundenen Proteins ein NaCl-Gradient eingesetzt. Dadurch kommt es zur Verdrängung gebundener Proteine in Abhängigkeit ihrer Affinität zur Matrix und damit zu einer Fraktionierung von Proteingemischen unterschiedlicher Bindungseigenschaften. Die hier eingesetzte Perfusions-Chromatographie (Afeyan, 1990) zeichnet sich durch den Einsatz spezieller poröser Trägermatrices aus, welche einem hohen Druck standhalten und damit gegenüber herkömmlichen Matrices deutlich höhere Flußraten möglich machen. Dazu wurde mit einer ‚Vision Workstation‘ (Perseptive Biosystems) gearbeitet, die speziell für die Anforderung hoher Flußraten und hohen Druckes ausgelegt ist. Die hier eingesetzten Flußraten betragen für analytische Säulen (1.7 ml Volumen) 10 ml/min, für präparative Säulen (7.9 ml Volumen) 25 ml/min. Die verwendeten Matrices waren Poros-HQ (funktionelle Gruppe: quarternäres Polyethylenimin) sowie –HE (Heparin). Vor dem Auftrag einer Proteinlösung wurde diese durch Passage durch einen Filter der Porengröße 0.45 µm filtriert.

Eine typische Aufreinigung verlief in folgenden Schritten:

Reinigungsschritt	Laufpuffer	Säulenvolumina
Äquilibrierung	Hepes-Puffer	5
Beladung	(Proteinlösung)	(variabel)
Waschen	Hepes-Puffer	8
Elution	Hepes-Puffer, linearer Gradient (0 bis 1.5 M NaCl)	15
Waschen	Hepes-Puffer + 2 M NaCl	5
Regeneration	Hepes-Puffer	5

Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der O.D.<sub>280</sub> sowie der Leitfähigkeit als Maß für den Salzgehalt verfolgt. Fraktionen wurden mit Hilfe eines robotischen Fraktionssammlers aufgefangen und gelelektrophoretisch analysiert.

### 3.4 Enzymatische Aktivitätstests

#### 3.4.1 Durchführung von Spalttests

20 fmol nach 3.2.9 hergestellte DNA-Duplex wurden mit 5-10 pmol *Vsr.Bst* in *Tfl*-Puffer vermischt (Gesamtvolumen 20 µl) und 5-15 min bei 50 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 0.5 M EDTA, pH 8.0, welches 1 mg/ml Proteinase K enthielt, auf einem auf Eis gelagerten Aluminium-Kühlblock abgestoppt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten. Nach Zugabe von einem halben Volumen Formamid-Farbmarker wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt mit Hilfe eines A.L.F.-Sequenzierautomaten analysiert (3.2.10).

#### 3.4.2 Multiple Substratkinetiken

Für die Durchführung multipler Substratkinetiken wurden vier Substrate im Gemisch mit *Vsr.Bst* inkubiert. Die Substrate zeichneten sich dabei durch unterschiedlich lange, Fluorescein-markierte obere Stränge aus, welche im Zuge der Prozessierung durch das Enzym gespalten wurden. Auf diese Weise war eine Quantifizierung der Substrate und Produkte im Gemisch möglich. Eine schematische Darstellung der

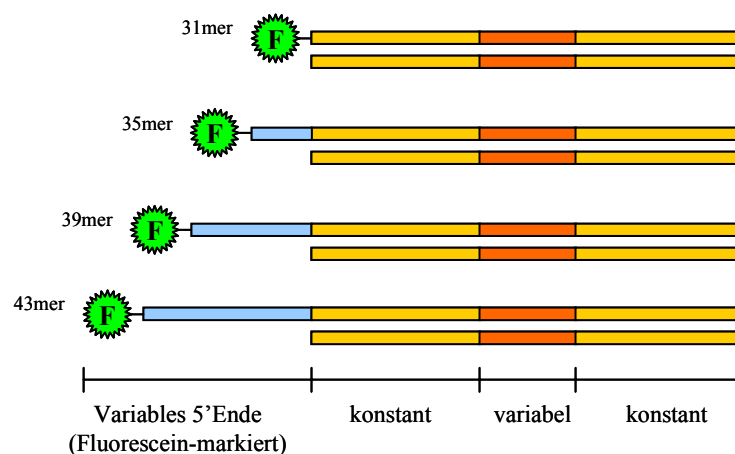


ABBILDUNG 4: Aufbau von Substraten für multiple Substratkinetiken. In einer variablen Region liegt die Fehlpaarung sowie die zu untersuchende Sequenzumgebung. Bei einer Prozessierung des entsprechenden Substrates kommt es zur Spaltung des oberen Fluorescein-markierten Stranges im Bereich der Fehlpaarung. Die variable Region ist in eine konstante doppelsträngige Region eingebettet. Zur Unterscheidung von Substraten und Produkten eines Gemisches unterscheiden sich die oberen Stränge in ihrer Länge.

Multiple Substratkinetiken wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C auf einem Heizblock durchgeführt. Die Zeitpunkte der Probenentnahme nach Zugabe des Enzyms waren 20, 40 Sekunden, 1, 2, 5, 7, 10 und 20 Minuten.

Es wurden 220 fmol von jedem Substrat in Spaltpuffer in einem Endvolumen von 220 µl vermischt und 30 Sekunden bei 50 °C präinkubiert. Dann wurden 20 µl abgenommen, anschließend 114 pmol Enzym in 20 µl (20 Sekunden bei 50 °C präinkubiert) zugegeben, auf einem Vortexer kurz vermischt und wieder auf dem Heizblock plaziert. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots von 20 µl entnommen und in vorgekühlte 1.5 ml-Gefäße (Kühlblock, 0 °C) pipettiert. In diesen vorgekühlten Gefäßen waren 2 µl einer 0.5 M EDTA-Lösung (pH 8.0) vorgelegt, welche zusätzlich 1 mg/ml Proteinase K enthielt. Nach Entnahme aller Aliquots wurde für 20 Minuten bei 65 °C inkubiert. Dann wurden die Proben mit 20 µl A.L.F.-Stopmix vermischt. Nach Auftrennung auf einem A.L.F.-,sequencer' wurden die Peakflächen mit Hilfe des Programmes ‚Fragment Manager' (Pharmacia) integriert. Aus den so gewonnenen absoluten Werten für die Substrat- und Produktfluoreszenz wurde die relative Substratfluoreszenzabnahme für die einzelnen Zeitpunkte berechnet. Dazu wurde die Summe aus Substrat- und Produktfluoreszenz jeweils als 100% angenommen. Die Werte der Substratabnahme für jeweils mehrere Messungen wurden gemittelt und verwendet, um daraus relative Geschwindigkeitskonstanten zu berechnen.

### 3.4.3 Berechnung relativer Geschwindigkeitskonstanten

Die Auswertung der multiplen Substratkinetiken ergibt sich in abgewandelter Form nach Schellenberger *et al.* (1992) durch die Betrachtung einer Reaktion 2. Ordnung, in der einem Enzym (E) mehrere miteinander kompetitierende Substrate ( $S_i$ ) angeboten werden. Für eine derartige Reaktion gilt in Abhängigkeit der Reaktionszeit (t):

$$\frac{d[S_i]}{dt} = -k_i \cdot [E] \cdot [S_i] \quad (\text{mit: } k_i = \frac{k_{cat}}{K_M}) \quad (1)$$

Aus (1) folgt für die Substrate  $i=1$  und  $i=2$ :

$$\frac{d[S_1]}{d[S_2]} = \frac{-k_1 \cdot [S_1] \cdot [E] \cdot dt}{-k_2 \cdot [S_2] \cdot [E] \cdot dt} = \frac{k_1 \cdot [S_1]}{k_2 \cdot [S_2]} \quad (2)$$

Durch Integration erhält man somit:

$$\frac{d[S_1]}{[S_1]} = \frac{k_1}{k_2} \cdot \frac{d[S_2]}{[S_2]} \Leftrightarrow \int_{t_0}^{t_1} \frac{d[S_1]}{[S_1]} = \frac{k_1}{k_2} \cdot \int_{t_0}^{t_1} \frac{d[S_2]}{[S_2]} \quad (3)$$

Löst man das Integral aus (3) und formt um, so folgt:

$$\ln \frac{[S_1]_{t_1}}{[S_1]_{t_0}} = \frac{k_1}{k_2} \cdot \ln \frac{[S_2]_{t_1}}{[S_2]_{t_0}} \Leftrightarrow \frac{[S_1]_{t_1}}{[S_1]_{t_0}} = \left( \frac{[S_2]_{t_1}}{[S_2]_{t_0}} \right)^{\frac{k_1}{k_2}}$$

Setzt man nun schließlich  $k_1=1$ , so erhält man:

$$\left( \frac{[S_1]_{t_1}}{[S_1]_{t_0}} \right)^{k_2} = \frac{[S_2]_{t_1}}{[S_2]_{t_0}} \Leftrightarrow [S_2]_{t_1} = [S_2]_{t_0} \cdot \left( \frac{[S_1]_{t_1}}{[S_1]_{t_0}} \right)^{k_2} \quad (4)$$

Wie aus (4) ablesbar ist, kann also unter Kenntnis allein der Substratkonzentrationen  $[S_1]$  und  $[S_2]$  zu den Zeitpunkten  $t_0$  und  $t_1$  das Verhältnis der Geschwindigkeiten  $k_1$  und  $k_2$  zueinander bestimmt werden. Die Kenntnis der Enzymkonzentration ist hierbei nicht nötig.

Aus (4) läßt sich ein Algorithmus ableiten, mit welchem mit Hilfe des Programmes *Sigma Plot* (unter Einbeziehen der bei der Auswertung der multiplen Substratkinetiken berechneten Substratmengen) relative Geschwindigkeitskonstanten für die Umsetzungsgeschwindigkeit der eingesetzten Substrate berechnet werden können. Der Code eines solchen Fitting-Algorithmus sieht folgendermaßen aus:

```
[Parameters]
k_test=0.8;
c0_ref=50;
c0_test=50;
[Variables]
c_ref=col (1);
c_test=col (2);
[Equations]
ctest=c0_test*(c_ref/c0_ref)**(k_test)
fit ctest to c_test
[Constraints]
k_test > 0.0001
```

Als Parameter sind Anfangs-Schätzwerte für die zu berechnende Konstante ( $k_{\text{test}}$ ) sowie für die Anfangskonzentrationen des Referenz- und des Testsubstrates ( $c0_{\text{ref}}$  und  $c0_{\text{test}}$ ) angegeben, die im Laufe des *fitting* berechnet werden. Als Variablen werden die Spalten angegeben, welche die gemessenen Konzentrationen von Referenz- und Testsubstrat enthalten.

### 3.4.4 Bestimmung kinetischer Konstanten ( $K_m$ , $K_{\text{cat}}$ , $v_{\text{max}}$ )

Zur Bestimmung kinetischer Konstanten wurden verschiedene Konzentrationen an Substrat mit einer konstanten Enzymkonzentration inkubiert und die Substratabnahme im Verlauf der Reaktionszeit berechnet. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktionen wurde graphisch ermittelt und der Quotient von Anfangskonzentration an Substrat und Anfangsgeschwindigkeit ( $a/v$ ) gegen die Anfangskonzentration an Substrat aufgetragen. Dadurch wurde eine Gerade erhalten, deren Schnitt der  $a/v$ -Achse den Wert  $K_M/v_{\text{max}}$  und deren Steigung den Wert  $1/v_{\text{max}}$  angibt („Hanes-Plot“). Dies soll im folgenden verdeutlicht werden

Durch reziproke Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung erhält man:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot a}{K_M + a} \Leftrightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{a}$$

Dieser Form der Michaelis-Menten-Gleichung liegt die weit verbreitete Auftragung von  $1/v$  gegen  $1/a$  zur Bestimmung kinetischer Konstanten zugrunde (Lineweaver und Burk, 1934). Wie von Dowd und Riggs 1965 beschrieben, beschönigt diese Form der Auftragung die Daten und führt gerade bei kleinen Werten von  $a$  zu einer Unterschätzung des Fehlers bei der Bestimmung von  $v$ . Auf die Möglichkeit, diesem Problem mit geeigneter Gewichtung der Daten zu begegnen, wurde bereits von Lineweaver *et al.* 1934 hingewiesen (alle Referenzen aus Cornish-Bowden, 1995 und dort nachzulesen). Eine elegantere Form des Auftrages wurde von Hanes beschrieben, bei welcher die Auswirkungen des Fehlers bei der Bestimmung von  $v$  sich in den Werten von  $a/v$  widerspiegeln. Multipliziert man obige Gleichung mit  $a$ , so erhält man:

$$\frac{a}{v} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \cdot a$$



Wie aus dieser Gleichung abzulesen ist, erhält man durch Auftragen des Quotienten aus Anfangskonzentration an Substrat und Anfangsgeschwindigkeit ( $a/v$ ) gegen die Anfangskonzentration an Substrat eine Gerade, deren Schnitt der  $a/v$ -Achse den Wert  $K_M/v_{\max}$  und deren Steigung den Wert  $1/v_{\max}$  angibt („Hanes-Plot“). Mit  $v_{\max}=k_{\text{cat}} \cdot E$  läßt sich schließlich  $k_{\text{cat}}$  errechnen.

### 3.4.5 Berechnung von theoretischen Zeit-Umsatz-Kurven

Die Berechnung von Zeit-Umsatz-Kurven unter Kenntnis kinetischer Konstanten erfolgte nach Integration der Michaelis-Menten-Gleichung (A. Cornish-Bowden, 1995). Die Michaelis-Menten-Gleichung wird zur Beschreibung der Produktkonzentration in Abhängigkeit der Zeit umgeschrieben in:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V_{\max} (a_0 - p)}{K_M + a_0 - p}$$

Mit  $a_0$ : Ausgangskonzentration an Substrat  
 $p$ : Produktkonzentration  
 $t$ : Zeitpunkt der Reaktion  
 $v_{\max}=k_{\text{cat}} \cdot [\text{Enzymkonzentration}]$

Die Variablen werden getrennt und Integrale gebildet:

$$\int \frac{(K_M + a_0 - p) dp}{a_0 - p} = \int V_{\max} dt$$

Durch Lösen der Integrale und Umformen folgt schließlich:

$$V_{\max} t = p + K_M \cdot \ln \left( \frac{a_0}{a_0 - p} \right)$$

Diese Gleichung kann herangezogen werden, um bei Kenntnis kinetischer Konstanten theoretische Zeit-Umsatz-Kurven für verschiedene Ausgangskonzentrationen und Enzymkonzentrationen ( $v_{\max}=k_{\text{cat}} \cdot E$ ) zu berechnen.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Genfragmenten bei Kenntnis nur eines konservierten Aminosäure-Blockes

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur Identifikation von Genen entwickelt. Existiert eine Mutante, so kann z.B. eine plasmidständige Genbibliothek transformiert und auf Komplementation des Phänotyps durchmustert werden. Diese Methode ist hier nicht geeignet, da der *vsr<sup>-</sup>*-Phänotyp (eine erhöhte C/G → T/A-Transition innerhalb der Erkennungssequenz einer Methyltransferase) keine geeignete ‚*screening*‘-Möglichkeit bietet. Einen anderen Weg stellt die Aufreinigung eines Proteins dar, welches dann durch Proteolyse fragmentiert wird. Die Peptidfragmente können dann sequenziert werden. Durch reverse Translation der Peptidsequenzen werden dann DNA-Sequenzen abgeleitet, welche zur Konstruktion von Sonden herangezogen werden. Mit diesen Sonden werden anschließend Genbibliotheken durchgemustert. Auch diese Methode ist hier ungeeignet, da die in den Zellen vorliegende Menge an Vsr-Endonuklease vermutlich niedrig ist (Macintyre, 1997). Die steigende Anzahl an Sequenzinformation führte in letzter Zeit zur Kenntnis einer immer steigenden Zahl bekannter Familien homologer Gene. In Kombination mit der PCR-Technik ist es nunmehr möglich, neue Mitglieder einer Genfamilie zu identifizieren, wenn zwei oder mehrere Blöcke konservierter Aminosäuren gefunden werden, welche durch Bereiche schwacher oder keinerlei Homologie getrennt sind. Durch reverse Translation der Aminosäuren zweier solcher konservierten Regionen werden zwei Oligonukleotidmischungen synthetisiert, welche alle möglichen DNA-Sequenzen repräsentieren, die für die entsprechende konservierte Region kodieren. Diese beiden Oligonukleotidmischungen werden dann als Primer in einer PCR eingesetzt. Aufgrund der Kenntnis der Größe der Region zwischen den konservierten Blöcken können dann PCR-Produkte der erwarteten Größe angereichert, kloniert und sequenziert werden. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit waren die Aminosäuresequenzen von sechs Vsr-Homologen bekannt. Diese Methode ist hier nicht einsetzbar, da im Falle der Familie der Vsr-Homologen nur ein Bereich genügender Konservierung erkennbar ist. Dieser Bereich ist in Abbildung 5 gezeigt (für ein ‚*alignment*‘ aller zur Zeit bekannter Vsr-Homologer

siehe Abbildung 36). Es wurde daher eine Methode entwickelt, welche es erlaubt, Fragmente eines Gens zu identifizieren, wenn nur ein Block konservierter Aminosäuren bekannt ist. Eine schematische Übersicht dieser Methode bietet Abbildung 6.

<i>Alu</i>	56	PVPSQRRRTIDVAFTRAKVAVFVDGCFWHG..CPEHGTSP
<i>Bsu</i>	44	LFG.....KPDLSIKKYKVVIFIDSCFWHF..CPVHGRIP
<i>Eco</i>	46	LPG.....RPDFVVDEYRCVIFTHGCFWHHHHCYL.FKVP
<i>Hpa</i>	46	IFG.....TPDLSFKRYKIAIFIDGCFWHGKDWDIRKYDI
<i>Nae</i>	64	RLGDGVKVKPDIVFTARKVAVFIDGCFWHV..CPDHGRQP
<i>Xor</i>	46	LPG.....TPDIVFPSRRLVLFVHGCFWHGHGCRIGQLP

ABBILDUNG 5: Ausschnitt aus einem ‚alignment‘ sechs (potenzieller) Vsr-Endonukleasen aus *Arthrobacter luteus* (*Alu*), *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*), *Bacillus subtilis* (*Bsu*), *Escherichia coli* (*Eco*), *Nocardia aerocolonigenes* (*Nae*), *Haemophilus parainfluenzae* (*Hpa*) sowie *Xanthomonas oryzae* (*Xor*). Nummern geben die Position der jeweils ersten gezeigten Aminosäure in der Proteinsequenz an. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Der für die Definition degenerierter Primer geeignete Bereich ist durch eine Box gekennzeichnet.

Bei dieser neuen Methode wird ein Bereich konservierter Aminosäuren durch reverse Translation in DNA-Sequenzen übersetzt, sodaß alle für diesen Block kodierenden Sequenzen repräsentiert sind. Dieser wird in einer PCR als degenerierter Primersatz verwendet. Als Template dient partialverdaute chromosomale DNA, an deren Enden eine DNA-Kassette ligiert wird. Dadurch ist die Verwendung eines definierten Gegenprimers möglich. Um die Anzahl von Nebenprodukten der PCR zu erniedrigen, zeichnet sich die DNA-Kassette durch einen zentralen, nichtpaarenden Bereich aus. Eine Elongation des Kassettenprimers ist so nur möglich, wenn zuvor ausgehend von einem Primer des degenerierten Satzes der Bereich der Kassette repliziert worden ist. Weiterhin wird der degenerierte Primersatz in Subsätze aufgeteilt und diese in getrennten Reaktionen verwendet. Dies erlaubt stringendere PCR-Bedingungen, da die Anzahl der Sequenzen pro degeneriertem Primersatz geringer ist und somit eine ‚passende‘ Primersequenz in höherer Konzentration vorliegt. Um den Hintergrund an PCR-Produkten zu erniedrigen, die auf die Amplifikation von zwei degenerierten Primern zurückzuführen sind, werden am 5′-Ende biotinylierte Kassettenprimer eingesetzt. Dies erlaubt eine Anreicherung gewünschter Produkte via Bindung an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel (3.2.4.4).

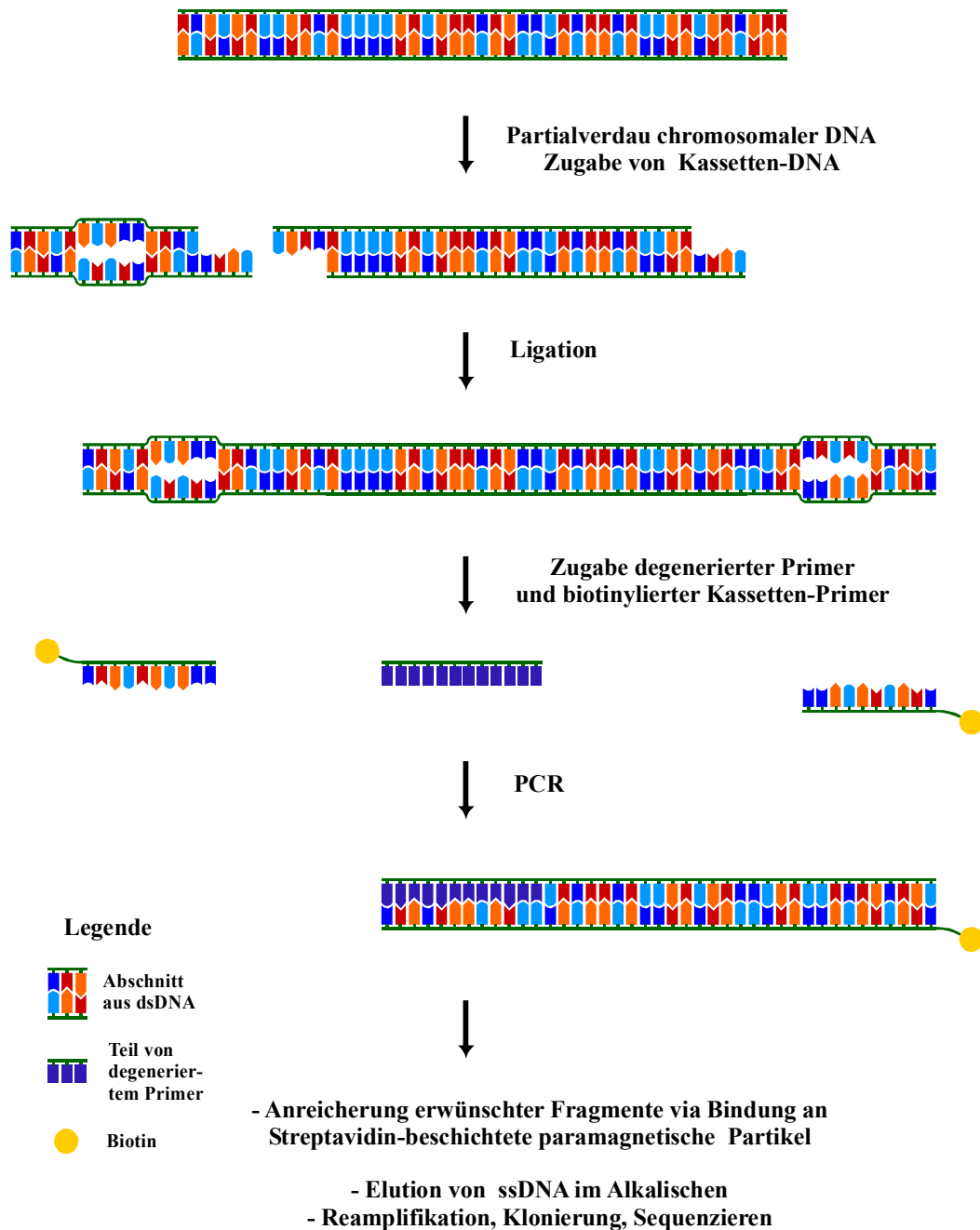


ABBILDUNG 6: Schematische Darstellung der Methode zur Identifikation von Genfragmenten bei Kenntnis nur einer konservierten Aminosäure-Blockes (siehe Text). Die Symbole sind in der Legende erläutert.

Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde in einem Modellexperiment gezeigt, in welchem ein Fragment aus dem *vsr*-Gen von *Escherichia coli* isoliert werden sollte.

Dazu wurden folgende degenerierte Primersätze anhand der in Abbildung 5 gezeigten Sequenzen abgeleitet:

	( <i>Bam</i> HI)	D/H	G/S	C	F	W	(H)	# Sequenzen
DG-Mix	AGA GGA TCC	GAY GGN TGY	TTY TGG	CA				32
HG-Mix	AGA GGA TCC	CAY GGN TGY	TTY TGG	CA				32
DS-Mix	AGA GGA TCC	GAY WSN TGY	TTY TGG	CA				128
HS-Mix	AGA GGA TCC	CAY WSN TGY	TTY TGG	CA				128

(Y: C oder T; N: A, C, G oder T)

Dann wurde chromosomale DNA aus *Escherichia coli* präpariert (3.2.4.7), einem Partialverdau mit *Bsp*143I unterzogen und mit Kassetten-DNA ligiert (2 µg partialverdauter DNA und 200 ng Kassetten-DNA). Die Kassetten bestanden aus zwei Oligonukleotiden, welche phosphoryliert und anschließend durch Erhitzen auf 80 °C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert wurden. Die Sequenzen der Kassettenoligonukleotide und des Kassettenprimers sind in Abbildung 7 gezeigt. Nun wurden Kassettenprimer und jeweils einer der vier

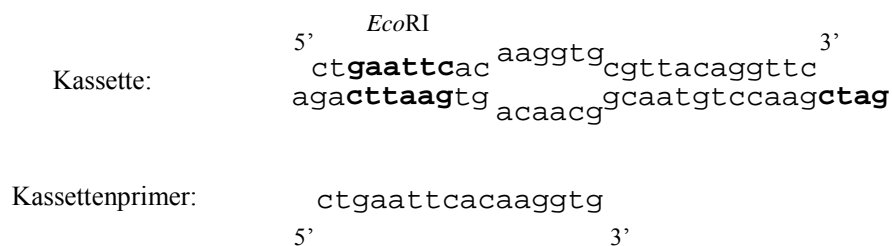


ABBILDUNG 7: Sequenz der Oligonukleotide der Kassettenkonstrukte sowie des Kassetten-Primers. Die Kassette beherbergt eine *Eco*RI-Schnittstelle für Klonierungszwecke. Der zentrale, nichtpaarende Bereich macht eine Elongation des Kassettenprimers im Zuge einer PCR erst möglich, wenn über diesen Bereich in einer vorigen Runde repliziert worden ist.

degenerierten Primersätze sowie eine Mischung aller vier in einer ‚touchdown‘-PCR (3.2.5) eingesetzt. Wie ein Vergleich der Spuren 1, 3, 5 und 7 (ein Primersatz) mit Spur 9 (Mischung aller vier Sätze) in Abbildung 8 zeigt, führt die Aufteilung auf mehrere degenerierte Primersätze zu einer betonteren Amplifikation einzelner Produkte als die Anwendung eines einzigen, alle Sequenzen enthaltenden Satzes. Weiterhin ist besonders in den Spuren 4 und 6 zu sehen, daß die alleinige Verwendung eines degenerierten Primersatzes eine Reihe unerwünschter Produkte

erzeugt, dem mit der folgenden Anreicherung *via* Bindung an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel und anschließender Reamplifikation begegnet werden soll. Eine PCR, in welcher nur der Kassetten-Primer eingesetzt wird, führt jedoch nicht zur Amplifikation bedeutender Mengen an DNA.

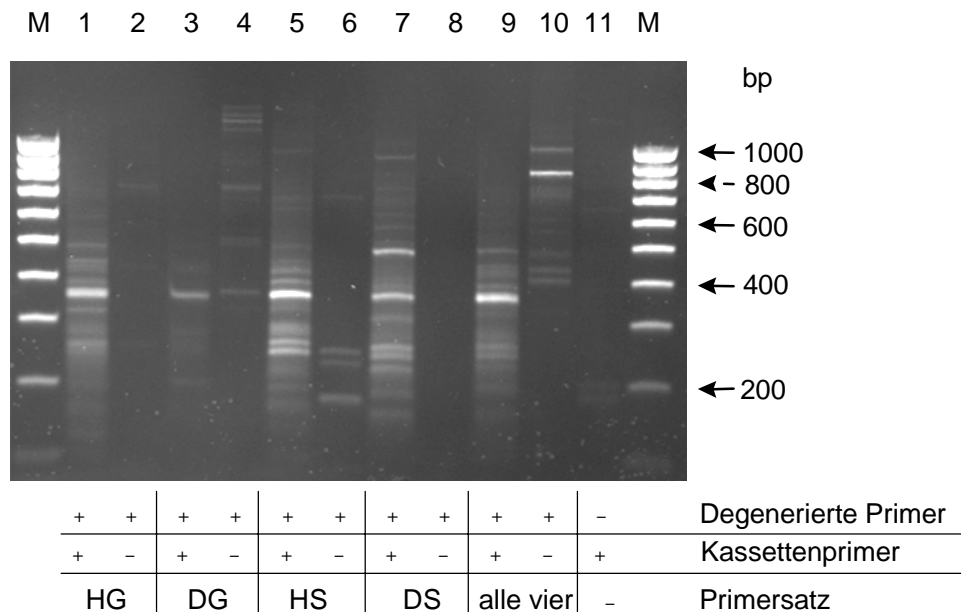


ABBILDUNG 8: Amplifikation unter Verwendung der vier degenerierten Primersätze sowie einer Mischung aller vier. Kontrollen unter Verwendung alleine der degenerierten Primersätze sowie alleine des Kassettenprimers sind aufgeschlüsselt. Die ‚annealing‘-Temperatur beim Start der ‚touchdown‘-PCR betrug 60 °C und wurde in den darauffolgenden Zyklen um 0.5 °C pro Zyklus gesenkt. Dann folgten 30 Zyklen mit einer ‚annealing‘-Temperatur von 55 °C. Die Elongation erfolgte hier bei 67°C. Den Reaktionen wurde Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt.

Eine Optimierung der PCR-Bedingungen wurde dann mit dem HG-Satz fortgeführt, welcher die codierende Sequenz des *vsr*-Gens aus *Escherichia coli* enthält. Da die Sequenz des *Escherichia coli* K12-Genoms bekannt ist, sind die Größen der hier zu erwartenden PCR-Fragmente mit 257 und 284 bp bekannt. Die ‚touchdown‘-PCR erfolgte dabei mit einem Gradienten der ‚annealing‘-Temperatur zwischen 60.4 und 68.9 °C und einer Abnahme der Temperatur um -0.5 °C pro Zyklus in den ersten zehn Zyklen, gefolgt von 30 Zyklen mit einer ‚annealing‘-Temperatur zwischen 55.5 und 64.0 °C. Die Elongation erfolgte bei 67 °C. Wie in Abbildung 9 gezeigt, werden in dieser ersten Amplifikation bei niedrigen ‚annealing‘-Temperaturen Fragmente der Größe 257 und 284 bp erzeugt. Die in Spur 1 gezeigten PCR-Produkte wurden mit Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln angereichert (3.2.4.4). Dann wurde eine Reamplifikation mit dem Primersatz HG sowie Kassettenprimer

durchgeführt. Wie in Abbildung 10 gezeigt, wurde damit eine deutliche Anreicherung der gesuchten Banden erreicht.

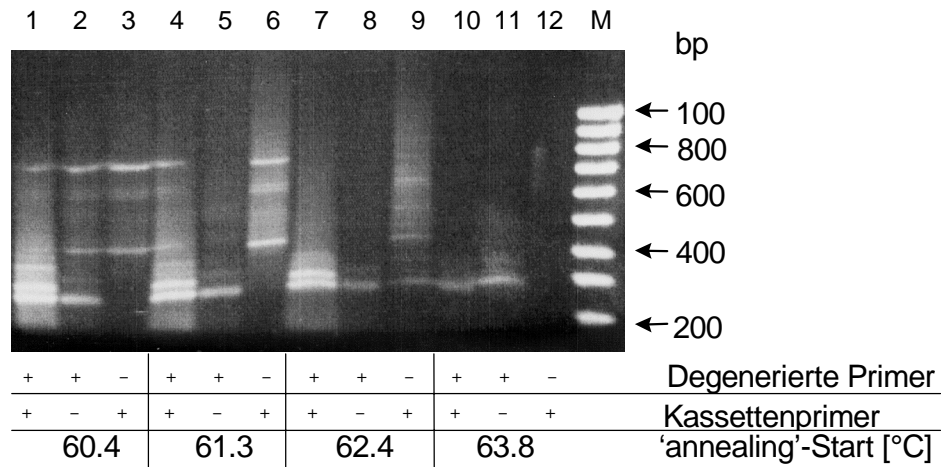


ABBILDUNG 9: PCR-Produkte unter Verwendung des HG-Satzes. Die Starttemperaturen des ‚annealing‘-Schrittes der ‚touchdown‘-PCR sowie Primerkombinationen sind angegeben.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde mit *EcoRI* und *BamHI* behandelt und in den Vektor pBluescript II SK(-) kloniert. Von den 6 sequenzierten Klonen enthielten 4 Klone Fragmente des *vsr*-Gens aus *Escherichia coli*. Damit war die generelle Anwendbarkeit dieser Methode gezeigt. Die oben beschriebenen Experimente wurden veröffentlicht (Laging *et al.*, 2000).

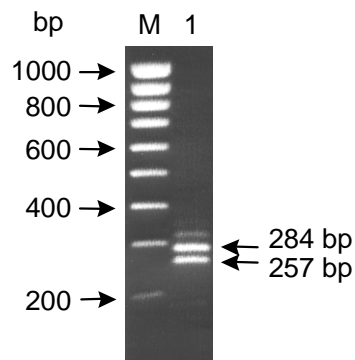


ABBILDUNG 10: Reamplifikation der angereicherten Produkte aus Spur 1, Abbildung 9. Die zu erwartenden Produkte der Größe 257 und 284 bp sind gekennzeichnet. Die ‚annealing‘-Temperatur betrug in allen 25 Zyklen 50 °C

## 4.2 Identifikation eines Fragmentes eines *vsr*-Homologen aus *Bacillus stearothermophilus*

Für die Suche nach einem *Vsr*-Homologen aus *Bacillus stearothermophilus* wurde im Wesentlichen vorgegangen wie im oben erwähnten Modellexperiment. Bei der Definition der degenerierten Primersätze DS und HS wurden jedoch jeweils zwei Subsätze erzeugt, um die Zahl der repräsentierten Sequenzen weiter zu verringern. Die Sequenzen der degenerierten Primersätze sind im Folgenden zusammengefaßt:

	( <i>Bam</i> HI)	D/H	G/S	C	F	W	(H)	# Sequenzen
DG-Mix	AGA GGA TCC	GAY	GGN	TGY	TTY	TGG	CA	32
HG-Mix	AGA GGA TCC	CAY	GGN	TGY	TTY	TGG	CA	32
DS1-Mix	AGA GGA TCC	GAY	TCN	TGY	TTY	TGG	CA	32
HS1-Mix	AGA GGA TCC	CAY	TCN	TGY	TTY	TGG	CA	32
DS2-Mix	AGA GGA TCC	GAY	AGY	TGY	TTY	TGG	CA	16
HS2-Mix	AGA GGA TCC	CAY	AGY	TGY	TTY	TGG	CA	16

(Y: C oder T; N: A, C, G oder T)

Chromosomale DNA von *Bacillus stearothermophilus* wurde präpariert (3.2.4.8), einem Partialverdau mit *Bsp*143I unterzogen und mit Kassetten-DNA ligiert. Anschließend wurde eine PCR unter Verwendung jeweils eines Satzes degenerierter Primer sowie des biotinylierten Kassetten-Primers durchgeführt. Die ‚touchdown‘-PCR erfolgte mit einer ‚annealing‘-Temperatur von 60 °C und –0.5 °C in den ersten zehn Zyklen, gefolgt von 35 Zyklen mit einer ‚annealing‘-Temperatur von 55 °C. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 11).

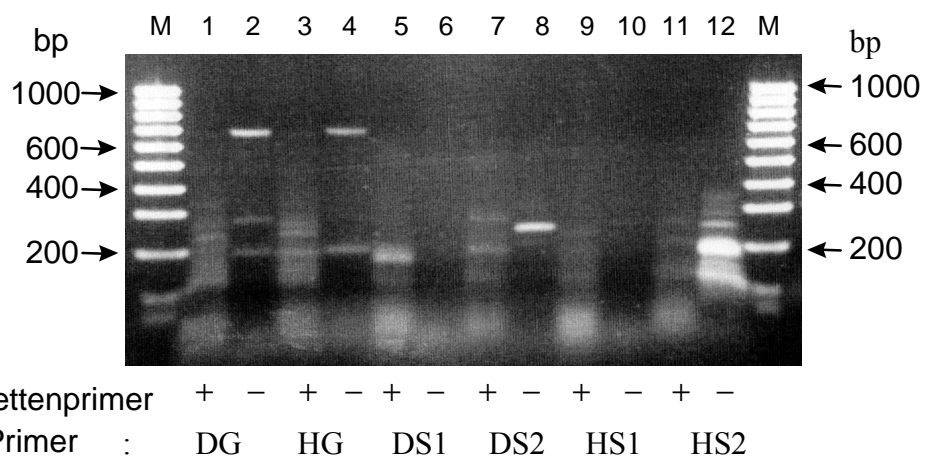


ABBILDUNG 11: Amplifikation unter Verwendung der sechs degenerierten Primersätze. Kontrollen unter Verwendung alleine der degenerierten Primersätze sind aufgeschlüsselt.



In den Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11, unter Verwendung von degeneriertem Primersatz und Kassettenprimer, sind eine Vielzahl von PCR-Produkten zu erkennen, welche zu einem großen Teil nicht mehr als distinkte Banden aufgelöst sind. Die in den Spuren 2,4,6,8,10 und 12 zu beobachtenden Fragmente wurden durch Amplifikation mit den degenerierten Primersätzen ohne Zugabe des Kassettenprimers erzeugt. Dieselben Fragmente sind in den entsprechenden Ansätzen mit Zugabe des Kassettenprimers ebenfalls zu beobachten, was die Notwendigkeit der folgenden Anreicherungs-schritte verdeutlicht. Die PCR-Produkte der Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11 wurden dann mittels Streptavidin-beschichteter paramagnetischer Partikel und Reamplifikation angereichert. Hierbei wurde eine ‚annealing‘-Temperatur von 50 °C mit 30 Zyklen gewählt. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 12).

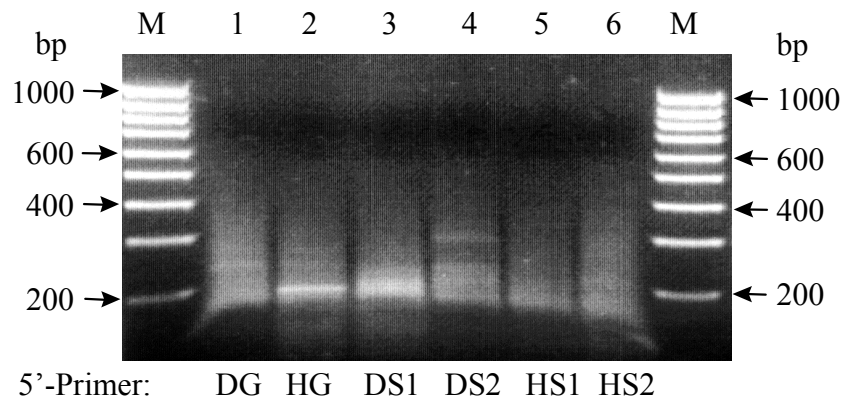


ABBILDUNG 12: Reamplifikation der angereicherten Produkte der PCR unter Verwendung der sechs degenerierten Primersätze und des Kassettenprimers aus Abbildung 11.

Der Effekt der Anreicherung ist hier nicht derart deutlich erkennbar wie im Falle des Modellexperimentes mit *Escherichia coli*-DNA, es ist jedoch ein Unterschied im Bandenmuster korrespondierender Ansätze vor und nach Anreicherung zu erkennen. Dies ist besonders der Fall für die Reaktionen mit den Primersätzen HG und HS2 (Abbildung 11, Spuren 3 und 11, und Abbildung 12, Spuren 2 und 6). Die kompletten Reamplifikationsansätze wurden nun mit *EcoRI* und *BamHI* behandelt und in ebenso geschnittenen Vektor pBluescript II SK(-) kloniert. Nach Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen wurden Transformanten einem ‚colony screening‘ mittels PCR unterzogen und ‚insert‘-tragende Klone für die Sequenzierung ausgewählt (3.2.5.3). Es wurden insgesamt 68 Klone sequenziert. Die Sequenzen der ‚inserts‘ wurden in Aminosäuresequenzen translatiert und nach Homologie zu bis

dato bekannten Vsr-Sequenzen gesucht. Die Ergebnisse sind folgender Tabelle zusammengefasst:

Degenerierter Primersatz	DG	HG	DS1	HS1	DS2	HS2
Anzahl der sequenzierten ‚inserts‘	17	18	16	6	11	-
Anzahl der einem Vsr-Homologen zugeordneten ‚inserts‘	-	-	3	1	-	-

Alle vier Sequenzen, welche einem Vsr-Homologen zugeordnet werden konnten, sind auf DNA-Ebene 25 bp lang (ohne Primersequenz) und konnten aufgrund signifikanter Homologie zur Aminosäuresequenz des Vsr-Homologen aus *Bacillus subtilis* erkannt werden. Die drei Sequenzen, welche auf Verwendung eines DS1-Primersatzes zurückgehen, sind identisch und entsprechen, wie sich später herausstellte, der tatsächlichen genomischen Sequenz (4.3). Die Sequenz, welche unter Verwendung des HS1-Primersatzes identifiziert wurde, unterscheidet sich im 5'-Bereich des Primers in zwei Basen von der genomischen Sequenz. Die geringe Abweichung von der ‚template‘-DNA macht die Amplifikation durch einen Primersatz, welcher nicht die auf Aminosäureebene beobachtete Sequenz enthält, verständlich (Abbildung 13)

(a) 5' GAT TCC TGC TTT TGG CAC GCA TGT GAA ATA CAT GGA CGG  
ATC

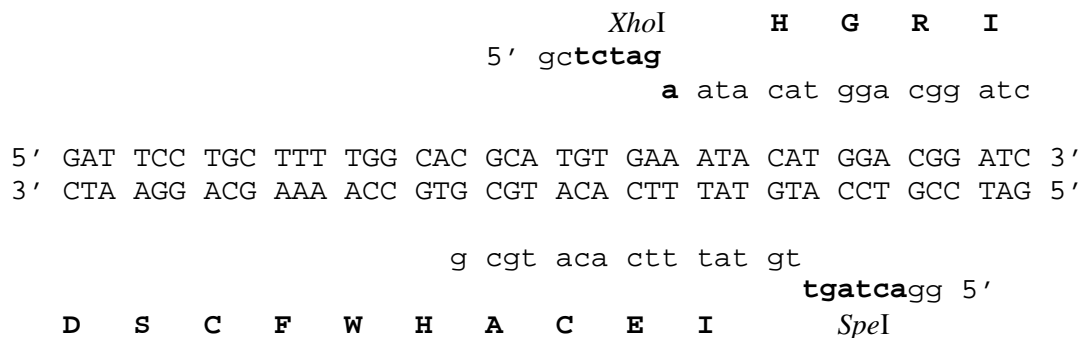
D S C F W H A C E I H G R I

(b) DS1: 5' GAT TCC TGC TTT TGG CA (c) *Bst*: DSCFWHACEIHGRI  
HS1: 5' CAT TCG TGC TTT TGG CA *Bsu*: DSCFWHFCPVHGRI

ABBILDUNG 13: (a) Nukleotid- und Aminosäuresequenz des mit Hilfe des DS1-Satzes identifizierten Fragmentes. (b) Vergleich der zur Amplifikation geführten Primer der Sätze DS1 und HS1. Unterschiede sind hellgrau unterlegt. (c) Vergleich der Aminosäuresequenz des mit Hilfe des DS1-Satzes identifizierten Fragmentes (*Bst*) mit der entsprechenden Sequenz aus *Bacillus subtilis* (*Bsu*) (inklusive primerkodierter Sequenz DSCFWH). Identische Aminosäuren sind dunkelgrau, ähnliche sind hellgrau unterlegt.

### 4.3 Sequenzierung des gesamten *vsr*-Gens aus *Bacillus stearothermophilus*

Um ausgehend von der 25 bp umfassenden Sequenz des identifizierten Fragmentes zu weiterer Sequenzinformation zu gelangen, wurden zwei Primer definiert. Diese sind komplementär zu Sequenzabschnitten des Fragmentes und werden im Zuge einer PCR in entgegengesetzte Richtung elongiert. Weiterhin sind keine Bereiche, die einer degenerierten Primersequenz entsprechen, enthalten (Abbildung 14).



**ABBILDUNG 14:** Lage der Primer 5'VstBst (oben; fügt *XhoI*-Sequenz an) und 3'-VsrBst (unten; fügt *SpeI*-Sequenz an). Die DNA-Sequenz der DS1-Fragmente ist beidsträngig angegeben. Primersequenzen in Kleinbuchstaben. Durch die Primer zusätzlich eingeführte Schnittstellen fett; Aminosäuresequenz in Großbuchstaben fett.

Diese wurden dann in einer ‚inverted PCR‘ eingesetzt (3.2.5.2). Als ‚template‘ diente chromosomale DNA aus *Bacillus stearothermophilus*, welche mit 19 verschiedenen Restriktionsendonukleasen in 19 Ansätzen komplett geschnitten und anschließend rezirkularisiert wurde (3.2.65). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen waren *AatII*, *Acc65II*, *BamHI*, *BglIII*, *Bsu15I*, *Eco91I*, *EcoRI*, *HindIII*, *MluI*, *MunI*, *NcoI*, *NdeI*, *NheI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *VspI*, *XbaI* und *XhoI*. Bei Verwendung des *MunI*- ‚templates‘ war nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine dominante Bande bei etwa 1.2 kbp zu erkennen. Dieses PCR-Produkt wurde aufgereinigt, über die primerinstruierten Schnittstellen *SpeI* und *XhoI* in den Vektor pBluescript II SK (-) kloniert und in einer Richtung sequenziert. Auf diese Weise wurde der für den C-Terminus des *Vsr*-Homologen kodierende Abschnitt des Gens erhalten. Weiterhin wurde über die *MunI*-Schnittstelle hinweggelesen, sodaß ebenfalls ein Sequenzabschnitt ‚upstream‘ des *vsr*-Gens bekannt war. Damit war es möglich, zwei Primer (5‘ und 3‘BstVsr-Seq) zu definieren, welche zur Amplifikation eines Fragmentes, auf welchem das komplette *vsr*-Gen liegt, dienten. Drei mit den Primern

5' und 3' BstVsr-Seq in unabhängigen Reaktionen erzeugte PCR-Produkte wurden sequenziert. Auf diese Weise konnte die Sequenz des gesamten *vsr*-Gens ermittelt werden. Das Gen aus *Bacillus stearothermophilus* kodiert für ein Protein mit 140 Aminosäuren, einer relativen Molmasse von  $M_r=16.5$  und einem berechneten isoelektrischen Punkt von  $pI=10.1$  (berechnet mit ‚Peptidesort‘, GCG-Programmpaket). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Vsr-Homologen aus *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* und *Bacillus subtilis* spiegelt die nahe Verwandtschaft der *Bacillus*-Spezies wieder. Beide *Bacillus*-Proteine weisen zudem eine signifikante Ähnlichkeit zum Homologen aus *Escherichia coli* auf (Abbildung 15)

	Bst-Bsu	Bst-Eco	Bsu-Eco
Ähnlichkeit [%]	64.9	50.8	45.9
Identität [%]	56.7	36.9	36.9

<i>Eco</i>	1	MADVHDKATR SKNMRAIATRDTAIEKRLASLLTGQGLAFRVQDASLPGRPD
<i>Bsu</i>	1	M.DKMSKESRSNVMKSI.KSVSQLENLVSALWNRGYRFRNRTKSLFGKPD
<i>Bst</i>	1	MADVLTTEEQRKRNMQAI.RSVSKLEEKIAKELWKRGI RFRNVKDLLGKPD
<i>Eco</i>	52	FVVDEYRCVIFTHGCFWHHHCYL.FKVPATRTEFWLEKIGKNVERDRDI
<i>Bsu</i>	50	LSIKKYKVVIFIDSCFWHF..CPVHGRI PKSN TDYWN AKYIKNKTRDEEVN
<i>Bst</i>	51	IAIKKYKVAVFIDSCFWHA..CEIHGRIPNTNTVFWVEKFRKNKRDECVN
<i>Eco</i>	102	SRLQELGWRVLI VWE CALRGREKLTDEALTERLEEWICGEGASAQIDTQGIHLLA
<i>Bsu</i>	99	TFYRENNWNILRVWEHEFKEDFDFAIDTIANFIEQSKRK~~~~~
<i>Bst</i>	100	NHYLDLGWSILRIWEHEVKADFNGVVDGIADFISSAKDSQS~~~~~

ABBILDUNG 15: oben: Vergleich der Vsr-Sequenzen aus *Bacillus stearothermophilus* (Bst), *Bacillus subtilis* (Bsu) und *Escherichia coli* (Eco). unten: ‚alignment‘ der drei Aminosäuresequenzen. Identische Aminosäuren sind hellgrau unterlegt.

Ein ‚alignment‘, in welchem alle Vsr-Homologen aufgeführt sind, die zum jetzigen Zeitpunkt bei einer Suche in der Proteindatenbank gefunden werden, ist in Abbildung 36 gezeigt.

Das Gen aus *Bacillus stearothermophilus* wurde ausgehend von chromosomaler DNA in einer PCR mit den Primern 5' BstVsr-Xba und 3' BstVsr-Xho amplifiziert. Dabei wurden primerinstruiert Schnittstellen eingeführt, sodaß das *vsr*-Gen über *Xba*I und *Xho*I in das Expressionsplasmid pET21d kloniert werden konnte. Weiterhin

wird es C-terminal mit einer vektorkodierten Hexahistidinsequenz fusioniert, somit ist eine Aufreinigung mittels ‚*immobilized metal affinity chromatography*‘ (IMAC) (3.3.5.2) möglich. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert.

#### 4.4 Expression und Aufreinigung der Vsr-Endonuklease aus *Bacillus stearothermophilus*

Im Rahmen seiner Diplomarbeit wurde von Eric Lindner das *vsr.Bst*-Gen mit C-terminaler Hexahistidin-Sequenz in den Vektor pASK75 eingebracht. Das Gen steht unter Kontrolle des tet-Promoter/Operators, eine Induktion ist somit durch Zugabe von Tetracyclin möglich. Als Expressionsstämme diente BMH71-18 *mutS*, der durch eine Insertion eines *tet*-Gens via Transposon-Mutagenese konstruiert worden war (W. Kramer) und somit eine Tetracyclin-Resistenz aufweist. Für einen Vergleich der Expression wurde das Plasmid pET21d-Vsr.*Bst* durch Transformation in den Stamm BL21 DE3 eingebracht. Expressionstests im 1 ml-Maßstab (3.3.3) zeigten eine gleiche Ausbeute mit beiden Konstrukten. Im Folgenden wurde ausgehend vom pASK-Konstrukt Vsr-Protein produziert.

Zur präparativen Gewinnung von Vsr.*Bst* wurden Zellen im 1l-Maßstab angezogen. Bei Erreichen einer O.D.<sub>600</sub> von 0.8 wurde durch Zugabe von Tetracyclin in einer Endkonzentration von 25 µg/ml induziert, nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen geerntet und die löslichen Proteine extrahiert (3.3.4). Die Aufreinigung von Vsr.*Bst* erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde eine Aufreinigung mittels IMAC (3.3.5.2) durchgeführt. Die verschiedenen Schritte dieser ersten Aufreinigung sind in Abbildung 16 dokumentiert.

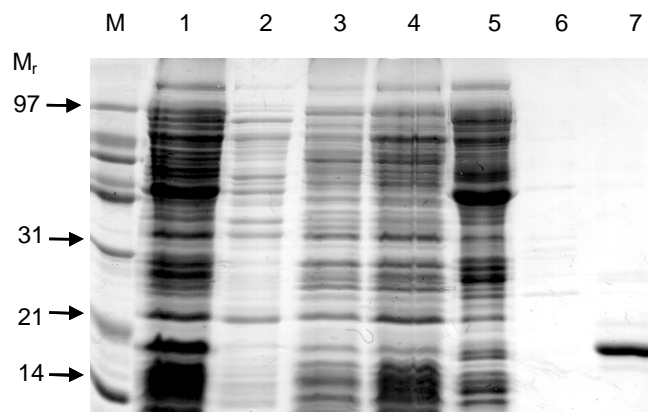


ABBILDUNG 16: Aufreinigung des Hexahistidin-Vsr aus *Bacillus stearothermophilus* via IMAC. Spur 1: Rohextrakt einer induzierten Expressionskultur. Spuren 2 und 3: Durchlauf nach Auftrag auf eine prääquilibrierte ‚Chelating Sepharose‘-Säule. Spuren 4 und 5: Waschschrirte mit jeweils 10 ml IMAC-Puffer A (ohne Imidazol). Spur 6: Waschschrirte mit 10 ml IMAC-Puffer, 100 mM Imidazol. Spur 7: Elution mit 12 ml IMAC-Puffer, 500 mM Imidazol. M: ‚Mid Range‘ Proteinmarker.

Im zweiten Schritt folgte eine Aufreinigung durch Bindung an Heparin-Matrix (Poros) an einer ‚Biocad Workstation‘ (3.3.5.3). Das Volumen der Elutionsfraktion der IMAC wurde zur Erniedrigung der Salzkonzentration vor Auftrag auf die Heparin-Säule mit HEPES-Puffer auf das Vierfache erhöht. Unmittelbar nach der Elution von der Heparin-Matrix wurden die Proben auf eine DTT-Konzentration von 5 mM eingestellt und gegen HEPES-Puffer, pH 7.5, welcher 400 mM NaCl sowie 5 mM DTT enthielt, dialysiert. Auf diese Weise wurden pro Liter Ausgangskultur 4 mg reinen Proteins gewonnen. Die Konzentration der Proteinlösung wurde auf 0.2 mg/ml eingestellt, mit sterilfiltriertem Glycerin versetzt (1:1) und aliquotiert bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Entnommene Aliquots konnten mehrere Wochen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

In Abbildung 17 sind ein Chromatogramm der Aufreinigung *via* Heparin-Säule sowie die Analyse der Fraktionen des Elutionspeaks durch SDS-PAGE gezeigt. Die Elution im Verlaufe eines linearen NaCl-Gradienten (etwa 6.5 bis 12 Minuten) zeigt, daß das Protein bei einer Leitfähigkeit von etwa 50 mS (also etwa 650 mM NaCl) von der Matrix gelöst wird. Dieser Wert liegt nur knapp über dem Wert während des Auftrages. Auffällig ist hier ein großer Peak bei Auftrag der Proteinlösung (auf der Zeitachse im Bereich 0 bis 5 Minuten). Eine Wiederholung der Aufreinigung unter erneutem Auftragen der Auftragspeak-Fraktionen führte zu einer Erhöhung der Ausbeute um etwa 1/3, der Auftragspeak bei dieser zweiten Aufreinigung war dann vernachlässigbar niedrig (Daten nicht gezeigt). Der Auftragspeak kann somit auf die schwache Bindung des Proteins bei der beim Auftrag vorliegenden Salzkonzentration zurückgeführt werden.

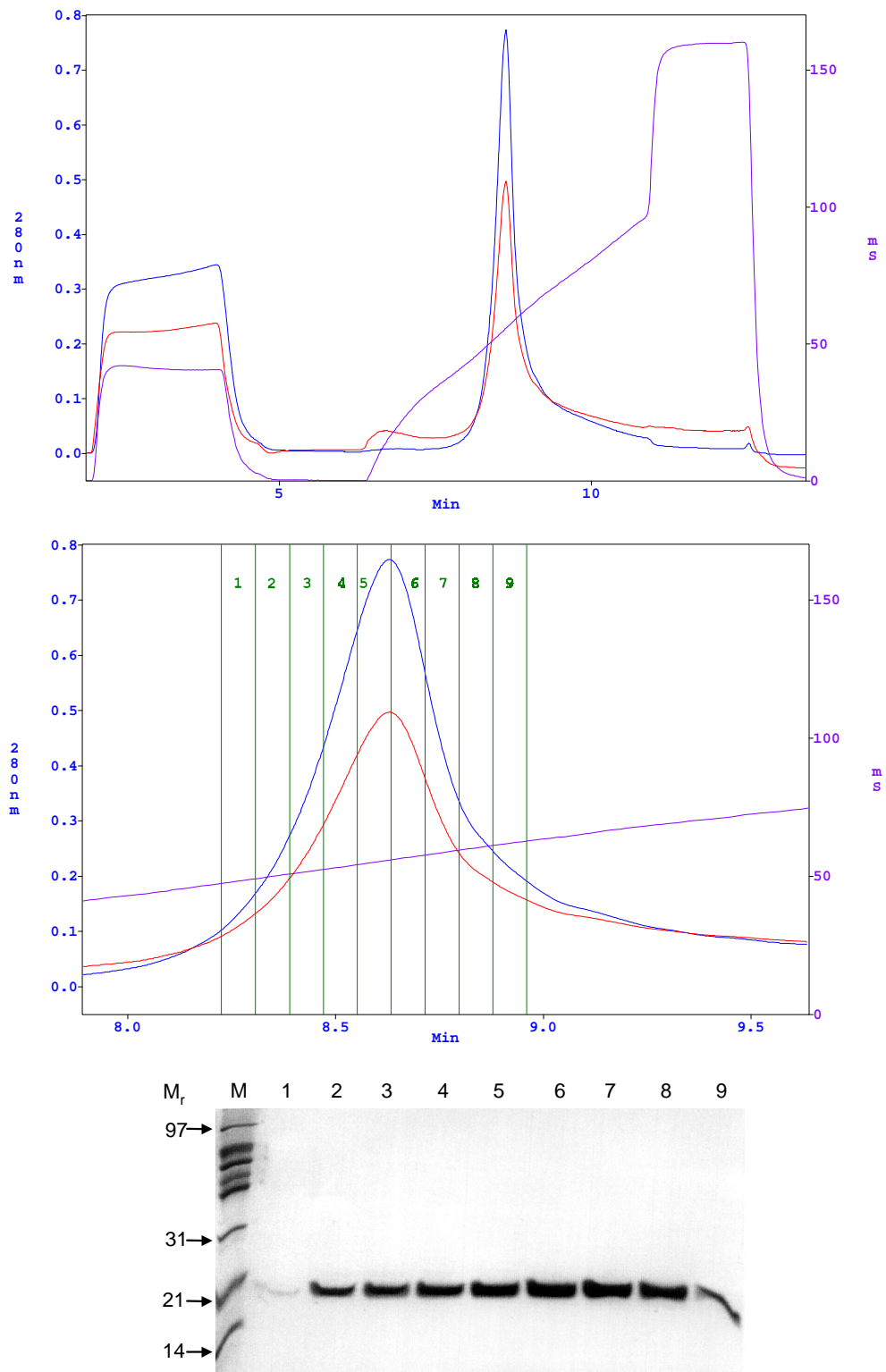


ABBILDUNG 17: Oben: Chromatogramm einer Aufreinigung von IMAC-gereinigtem Vsr-Protein aus *Bacillus stearothermophilus* via Affinitätschromatographie (Matrix: Heparin; Poros HE). Mitte: Ausschnitt aus obigem Chromatogramm. Elutionspeak sowie gesammelte Elutionsfraktionen. In beiden Chromatogrammen: blau: Absorbtion bei 280 nm (siehe Achsbeschriftung links); rot: Absorbtion bei 260 nm (dieselbe Skalierung wie 280 nm); violett: Leitfähigkeit in Millisievert (siehe Achsbeschriftung rechts; 77 mS entsprechen einer 1 M wässrigen NaCl-Lösung); zeitlicher Verlauf in Minuten angegeben, Flußrate: 25 ml/min. Unten: SDS-PAGE (15 % Acrylamid) der im mittleren Chromatogramm gezeigten Elutionsfraktionen 1 bis 9. M: Mid-Range Proteinmarker

#### 4.5 Untersuchungen zur Aktivität des Vsr-Homologen aus *Bacillus stearothermophilus*

Nach erfolgreicher Klonierung des Gens sowie Expression und Aufreinigung des Proteins sollte eine erste Überprüfung der Aktivität des Vsr-Homologen aus *Bacillus stearothermophilus* erfolgen. Bei der Auswahl eines Substrates für einen ersten Spalttest wurde eine Arbeit von Schumann *et al.* (1996) herangezogen, in welcher eine multispezifische DNA-Cytosin-Methyltransferase aus *Bacillus stearothermophilus* H3 beschrieben wurde. Diese methyliert ACGCGT (*Mlu*I), CCGCGG (*Sac*II), GCGCGC (*Bss*HII), PuGCGCPy (*Hae*II) sowie PuCCGGPy (*Cfr*10I). Die Autoren beobachteten, daß einige Positionen bevorzugt methyliert werden (hier fett) gedruckt. Restriktionsendonukleasen, welche entsprechende Zielsequenzen spalten, sind in Klammern angegeben.

Da in vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde, daß die Vsr-Endonuklease aus *Escherichia coli* eine gewisse Sequenzvariation zuläßt (Gläsner *et al.*, 1995; Lieb und Rehmat, 1995), sollte hier in einem ersten Test auf Spaltungsaktivität auch bei Abweichung von den Sequenzen, welche ein Homologes aus *Bacillus stearothermophilus* bevorzugt prozessieren mag, zumindest eine qualitative Aussage gemacht werden können. Das Vorkommen einer multispezifischen Methyltransferase ist ein Hinweis darauf, daß das Homologe zu Vsr eher noch größere Variationen in der Umgebung einer Fehlpaarung tolerieren könnte als das Enzym aus *Escherichia coli*.

Für einen Aktivitätstest sollte der von W. Gläsner für seine Untersuchungen an Vsr aus *Escherichia coli* entwickelte Endonuklease-,assay‘ verwendet werden (Gläsner *et al.*, 1992). Dabei wurde aus zwei synthetischen Oligonukleotiden ein Heteroduplex-Substrat hybridisiert, welches anschließend durch die Mismatch-spezifische Endonukleaseaktivität von Vsr in einem Strang 5‘ des Thymins einer T/G-Fehlpaarung gespalten wurde. Dieser Strang ist am 5‘-Ende fluoreszent markiert, so daß in einer denaturierenden elektrophoretischen Auftrennung mit einem A.L.F.-Sequenzierer das verkürzte Spaltprodukt vom Substrat der Ausgangslänge unterschieden werden kann. Diese Methode läßt weiterhin eine quantitative Betrachtung der Spaltung zu, was kinetische Untersuchungen der Katalyse ermöglicht ( 3.4.1, 3.4.2).



Aufgrund der Untersuchungen der T/G-spezifischen Glykosylase Mig.*Mth* von Y. Fondufe standen eine Reihe von Substraten für ein derartiges Experiment zur Verfügung. Es wurden zwei Substrate ausgewählt, welche im Kontext GGTCC eine T/G-Fehlpaarung (das fehlgepaarte Thymin ist unterstrichen) sowie im selben Kontext die entsprechende Homoduplex-DNA, also GGCCC, anbieten. Die oberen Stränge tragen am 5'-Ende eine Fluorescein-Markierung zur Detektion mit einem ‚A.L.F. Sequencer‘ (3.2.10). Die unteren Stränge für die Hybridisierung zum doppelsträngigen Substrat sind hier identisch:

Heteroduplex (39mer): 5' F-gggtacttggcttatctccga ggTcct taatctgtcgca 3'

Homoduplex (35mer): 5' F-acttggcttatctccga ggCcct taatctgtcgca 3'

Unterer Strang: 3' ccgaatagaggct ccGgga attagacagcgt 5'

Diese beiden Substrate wurden in einem Spalttest eingesetzt (3.4.1). Es wurden je 0.5 nM Substrat mit 570 nM des Vsr-Homologen aus *Bacillus stearotherophilus* für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden die Substrate unter denselben Bedingungen mit Mig.*Mth*, einer Mismatch-spezifischen Thymin-DNA-Glykosilase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Horst *et al.*, 1996; von Y. Fondufe zur Verfügung gestellt), inkubiert. Hierbei wurde nach der Spaltungsreaktion mit NaOH behandelt, um eine Spaltung der durch Mig.*Mth* erzeugten AP-, ‚site‘ zu bewirken. Eine Analyse auf einem A.L.F.-Sequenzierer (3.2.10) zeigte, daß bei einer Inkubation der heteroduplex-DNA mit dem Vsr-Homologen ein zusätzlicher Peak entsteht (Abbildung 18). Dieser wandert im Gel fast auf gleicher Höhe des Produktes der Spaltung durch Mig.*Mth* und ist in der Kontrolle (H<sub>2</sub>O statt Enzym) nicht zu sehen. Die Homoduplex wurde nicht gespalten (Abbildung 18).

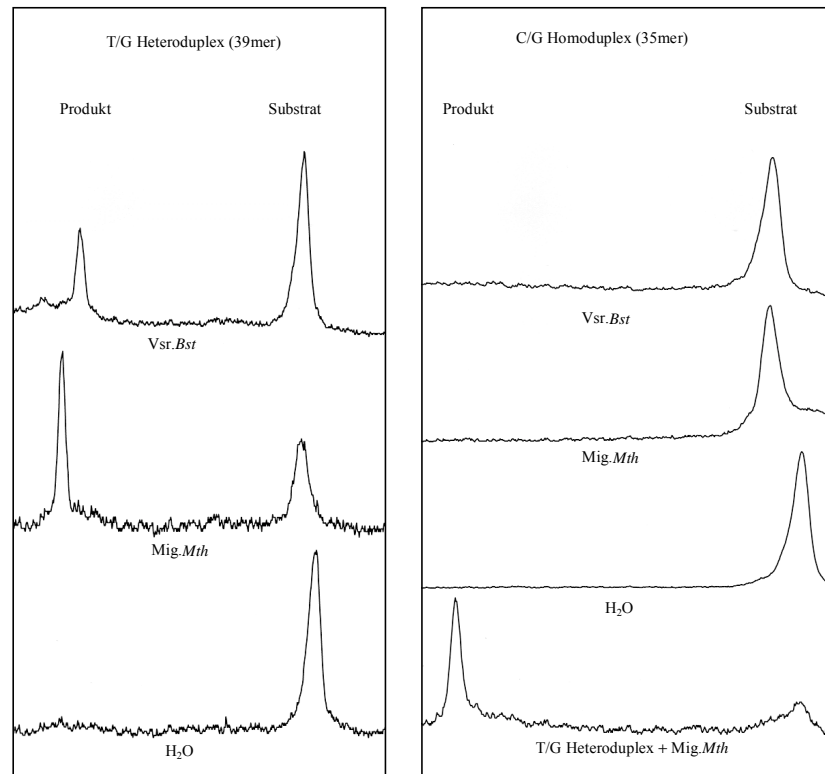


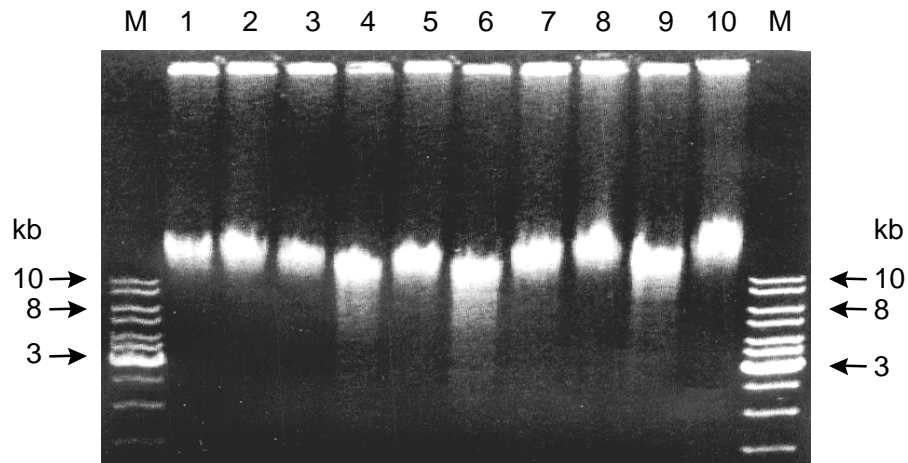
ABBILDUNG 18: Rohdaten einer Spaltung von Heteroduplex- und Homoduplex-DNA-Substraten mit *Vsr.Bst* und *Mig.Mth* sowie Kontrollbehandlung ohne Enzymzugabe. Zu erkennen sind Produkt- und Substratpeaks (näheres im Text).

Damit konnte gezeigt werden, daß das *Vsr*-Homologe, wie das Enzym aus *Escherichia coli*, eine Mismatch-spezifische Endonuklease-Aktivität aufweist. Das Homologe aus *Bacillus stearothermophilus* wurde daraufhin ***Vsr.Bst*** genannt. Das Produkt der Spaltung durch *Mig.Mth* und anschließende Spaltung der AP-,*site*' weist ein anderes Laufverhalten auf als das Produkt der Spaltung durch *Vsr.Bst*. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß nach der  $\beta$ -Eliminierungsreaktion an der von *Mig.Mth* erzeugten AP-,*site*' eine Phosphatgruppe am 3'-Ende des 5'-Produktes verbleibt. Diese führt zusätzliche negative Ladung im Produkt ein, welche eine beschleunigte Migration dieses Produktes im Verlauf der Elektrophorese bewirkt.

#### 4.6 Untersuchung des Methylierungsmusters in *Bacillus stearothermophilus*

Nachdem gezeigt werden konnte, daß das Vsr-Homologe aus *Bacillus stearothermophilus* eine Spaltung von DNA 5' einer T/G-Fehlpaarung bewirkt, sollte das Methylierungsmuster chromosomaler DNA (in Bezug auf 5-Methylcytosin) aus diesem Organismus überprüft werden. Dazu wurde chromosomale DNA mit verschiedenen C-methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen behandelt und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Nichtspaltung durch eine derartige Restriktionsendonuklease wurde als Methylierung der chromosomalen DNA am Cytosin im Sequenzkontext des eingesetzten Enzyms gedeutet. Welches Cytosin innerhalb dieser Sequenzen die Methylierung trägt kann allerdings nicht entschieden werden, da die Sensitivitäten der verwendeten Restriktionsendonukleasen nicht für alle Enzyme bekannt sind. Alle Enzyme wurden parallel einer Kontrolle durch Spaltung von Plasmid-DNA unterzogen und zeigten Aktivität (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 19 sind ein beispielhaftes Gel sowie die verwendeten Enzyme aufgeführt.

Eine Spaltung der DNA ist in den Spuren 4 (*NarI*), 6 (*MluI*) und 9 (*BamHI*, Kontrolle) zu erkennen. Eine schwache Spaltung ist in den Spuren 5 (*NotI*) und 7 (*SacII*) zu sehen. Keine Spaltung wird in den Spuren 1 (*AgeI*), 2 (*BssHIII*), 3 (*Cfr10I*) und 8 (*XhoI*) beobachtet. Die Spaltung durch *MluI* und *SacII* war aufgrund des Methylierungsmusters von *M.BssHIII* nicht erwartet worden. Weiterhin kann nicht erklärt werden, warum eine Inkubation mit *XhoI* (CTCGAG) keine Spaltung bewirkte. Die Nichtspaltung der Sequenzen ACCGGT (*AgeI*) und GCGCGC (*BssHIII*) wurden zur Planung der Untersuchungen des Substratspektrums von Vsr.*Bst* herangezogen, welche im folgenden Abschnitt beschrieben sind.



Spur	Enzym	Erkennungssequenz	Enzym	Erkennungssequenz
1	<i>AgeI</i>	ACCGGT	<i>PvuI</i>	CGATCG
2	<i>BssHII</i>	GCGCGC	<i>SalI</i>	GTCGAC
3	<i>Cfr10I</i>	rCCGGy	<i>SmaI</i>	CCCGGG
4	<i>NarI</i>	GGCGCC	<i>SnaBI</i>	TACGTA
5	<i>NotI</i>	GCGGCCGC	<i>Hin6I</i>	GCGC
6	<i>MluI</i>	ACGCGT	<i>HpaII</i>	CCGG
7	<i>SacII</i>	CCGCGG	<i>MspI</i>	CCGG
8	<i>XhoI</i>	CTCGAG	<i>Bsp143I</i>	(GATC)
9	<i>BamHI</i>	(GGATCC)	<i>EagI</i>	CGGCCG
	<i>AatII</i>	GACGTC	<i>Eco147I</i>	AGGCCT
	<i>ClaI</i>	ATCGAT	<i>HindIII</i>	AAGCTT
	<i>FspI</i>	TGCGCA	<i>PstI</i>	CTGCAG
10	(chromosomale DNA)		<i>XbaI</i>	TCTAGA

ABBILDUNG 19: Spalttests mit C-methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen und chromosomaler DNA aus *Bacillus stearothermophilus*. Unten: Verwendete Enzyme sowie zugehörige Erkennungssequenzen. Grau unterlegte Sequenzen wurden nicht gespalten. Oben: Agarosegel enzymbehandelter chromosomaler DNA. Die Aufschlüsselung der Spuren ist in der unteren Tabelle angegeben. Als Vergleich wurde unbehandelte chromosomale DNA in Spur 10 aufgetragen. M: 1 kb DNA Leiter

## 4.7 Untersuchungen zum Substratspektrum

### 4.7.1 Methylierungsmuster-abgeleitete Substrate

Im Folgenden sollte die Substratspezifität von *Vsr.Bst* untersucht werden. Dazu wurden Unterschiede im Umsatz verschiedener Substrate durch Bestimmung relativer Geschwindigkeitskonstanten mittels multipler Substratkinetiken (3.4.2, 3.4.3) quantifiziert. Es wurden vier Substrate bei 50 °C im Gemisch mit *Vsr.Bst* behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden aus der Reaktion Aliquots entnommen, die Reaktion abgestoppt und Substrat- und Produktmenge quantifiziert. Die Analyse erfolgte dabei mit Hilfe eines A.L.F.-Sequenzierautomaten. Die vier im Gemisch untersuchten Substrate unterschieden sich in der Länge der prozessierten oberen Stränge, sodaß eine Unterscheidung von Substraten und Produkten möglich war (3.4.2). Die Rohdaten einer derartigen Analyse mit einem A.L.F.-Sequenzierautomaten ist in Abbildung 20 gezeigt.

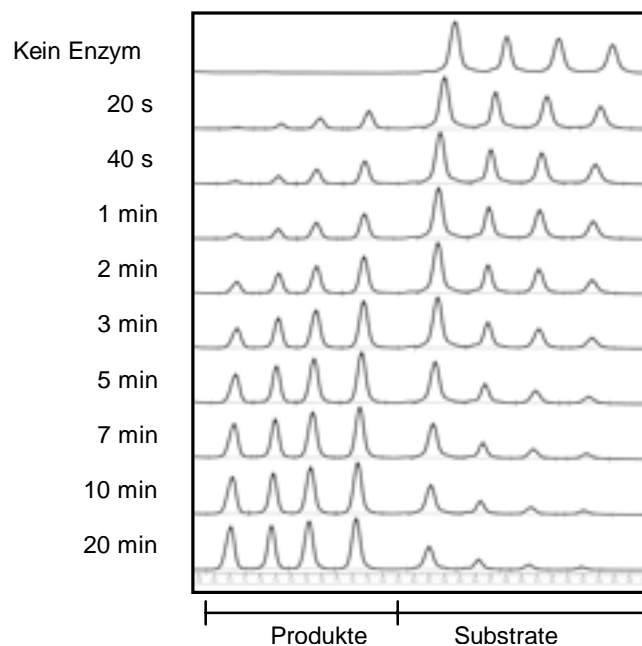


ABBILDUNG 20: Rohdaten einer Spaltungsreihe mit einem Gemisch der Substrate 1 bis 4. Die Peaks entsprechen Fragmenten der Größe 15, 19, 23 und 27 Basen (Produkte) und 31, 35, 39 und 43 Basen (Substrate)

Aus den Ergebnissen der Spalttests im vorigen Kapitel wurden sechs Substrate für eine erste Reihe von multiplen Substratkinetiken abgeleitet. In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der variablen Regionen gezeigt, welche in eine für alle Substrate gleiche Rahmensequenz eingebettet sind (siehe auch Abbildung 4.). Die T/G-

Fehlpaarung wird dabei jeweils mit dem großen T innerhalb der angegebenen Sequenz mit einem Guanin auf dem zugehörigen unteren Strang gebildet:

Substrat	1	2	3	4	5	6
Sequenz (oberer Strang)	cTcggg	aTcggg	ccTggg	acTggg	gTgcgc	gcgTgc
Länge [bp] (oberer Strang)	31	35	39	43	31	35

Die Substrate 1 bis 4 wurden aus der Sequenz ACCGGT (*AgeI*) abgeleitet. Die Substrate 1 und 2 stellen die Situation nach einer Desaminierung an einem äußeren, die Substrate 3 und 4 an einem inneren 5-Methylcytosin innerhalb dieser Sequenz dar. Die Kernsequenz CCGG wurde mit C/G-Basenpaaren (Substrate 1 und 3) und mit A/T-Basenpaaren (Substrate 2 und 4) umgeben. Die Substrate 5 und 6 stellen das Ergebnis einer Desaminierung an einem ersten (Substrat 5) und an einem zweiten (Substrat 6) 5-Methylcytosin innerhalb der Sequenz GCGCGC (*BssHII*) dar.

Für die Bestimmung multipler Substratkinetiken wurden in einem Gemisch die Substrate 1 bis 4 eingesetzt. In einem weiteren Experiment wurden die Substrate 3 bis 6 gemischt. Dadurch war eine Normierung der relativen Geschwindigkeitskonstanten aller sechs Substrate möglich. Die Peak-Flächen wurden mit Hilfe des Programmes ‚Fragment Manager‘ integriert und mit dem Programm ‚Sigma Plot‘ zur Berechnung relativer Geschwindigkeitskonstanten herangezogen.

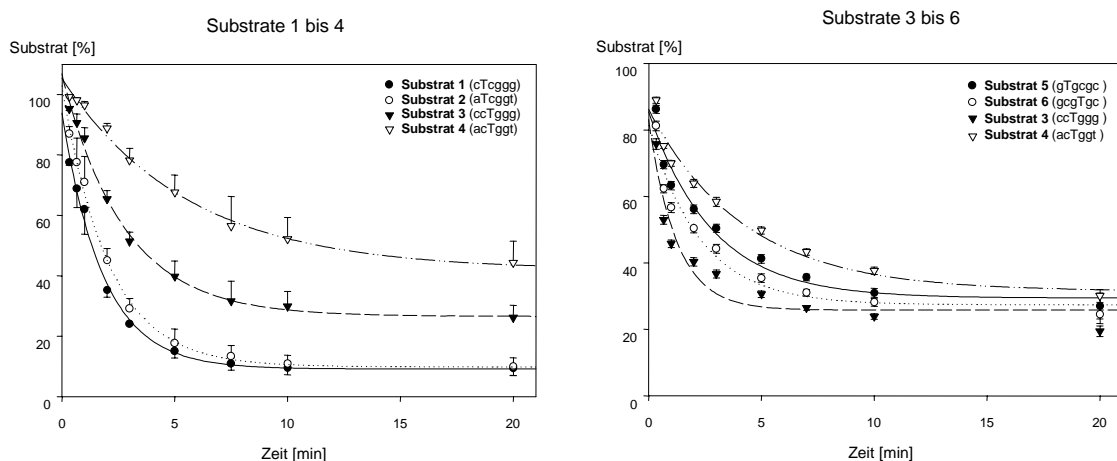


ABBILDUNG 21: Zeit-Umsatz-Kurven der Spaltung der Substrate 1 bis 4 (links) und 3 bis 6 (rechts).

In Abbildung 21 sind die zeitabhängige Abnahme der Substratmenge für beide oben erwähnten Substratgemische gezeigt. Ein Vergleich der beiden Kurven zeigt ein Problem auf, welches bei dieser Methode mit *Vsr.Bst* immer wieder beobachtet werden konnte: Ein sauberes Abstoppen der Reaktion nach Entnahme der Proben zu frühen Zeitpunkten gestaltete sich schwierig. Dieser Effekt wurde bei früheren Experimenten mit *Vsr* aus *Escherichia coli* nicht beobachtet. Der Grund kann in einer höheren Stabilität des *Vsr.Bst* liegen, das Abstoppen wird zudem durch die höhere Inkubationstemperatur (bei Experimenten mit *Vsr* aus *Escherichia coli* lag sie bei 37 °C) erschwert. Dies führt dazu, daß die zu einem oder mehreren (frühen) Zeitpunkten zugehörigen Meßwerte verfälscht werden. Die Substratmenge (in %) erscheint zum entsprechenden Zeitpunkt niedriger. Im Falle der obigen Kurve, welche die Umsetzung der Substrate 3 bis 6 dokumentiert, führt dies dazu, daß ein ‚fitting‘ nicht exakt alle Punkte der Kurve erfaßt. Da jedoch alle Substrate einer Reaktion gleichermaßen von diesem Effekt betroffen sind, ist es dennoch möglich, korrekte Konstanten zu berechnen. Die unterschiedlich langen 5'-Überhänge, welche für eine Unterscheidung der Substrate und Produkte vonnöten sind, haben keinen Einfluß auf die Prozessierung durch *Vsr.Bst*. Es wurden Substrat 1 als 31mer und 43mer sowie Substrat 2 als 35mer und 39mer gemischt und Zeit-Umsatzkurven erstellt.

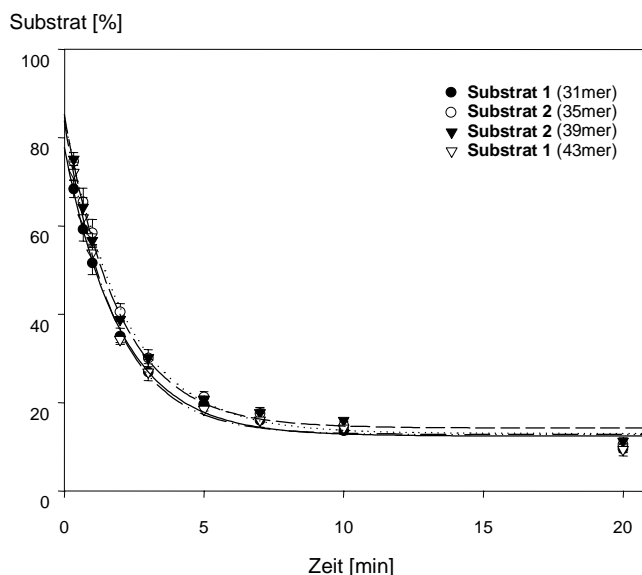


ABBILDUNG 22: Längenpermutation der 5'-Überhänge; Zeit-Umsatz-Kurven von Substrat 1 (cTcggg; 31mer und 43mer) und Substrat 2 (aTcggg; 35mer und 39mer) im Gemisch.

Unterschiedlich lange einzelsträngige 5'-Enden beeinflussen nicht die Spaltungskinetiken der Substrate, die errechneten relativen Geschwindigkeitskonstanten entsprachen den zuvor bestimmten innerhalb der Fehlergrenzen (Abbildung 22).

In Tabelle 1 sind die normierten relativen Geschwindigkeitskonstanten für alle sechs Substrate aufgeführt.

Rang	Substrat	Sequenz	relative Geschwindigkeitskonstante
1	1	cTcggg	1.00 ± 0.03
2	2	aTcggg	0.94 ± 0.03
3	3	ccTggg	0.54 ± 0.01
4	6	gcgTgc	0.36 ± 0.05
5	5	gTgcgc	0.34 ± 0.05
6	4	acTggg	0.29 ± 0.03

TABELLE 1: Relative Geschwindigkeitskonstanten für die Substrate 1 bis 6.

Die Substrate 1 und 3 sowie 2 und 4 unterscheiden sich jeweils durch die Position der T/G-Fehlpaarung innerhalb einer sonst identischen Sequenzumgebung. In beiden Fällen erfolgt die Prozessierung durch *Vsr.Bst* signifikant besser, wenn die T/G-Fehlpaarung an Position 3 innerhalb der hier variierten Hexanukleotidsequenz liegt: Substrat 1 wird um den Faktor 1.9 effektiver prozessiert als Substrat 3, Substrat 2 wird um den Faktor 3.2 effektiver prozessiert als Substrat 4. Die Substrate 5 und 6, bei welchen ebenfalls lediglich die Position der Fehlpaarung variiert wurde, werden etwa gleich effektiv prozessiert, dies jedoch um einen Faktor von etwa 3 langsamer als das ‚beste‘ Substrat 1.

Der Satz der untersuchten Substrate wurde nun um weitere sechs Sequenzen erweitert, was im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

#### 4.7.2 Erweiterung des Substratsatzes

Um ein genaueres Bild der Substratspezifität von *Vsr.Bst* zu erlangen, wurde der Satz der untersuchten Substrate erweitert. Bei den im vorigen Abschnitt untersuchten Substraten lag die T/G-Fehlpaarung im Kontext palindromischer Hexanukleotidsequenzen, welche aus den Methylierungsdaten aus Abschnitt 4.7 abgeleitet worden waren. Im Folgenden wurden sechs zusätzliche Substrate in die Untersuchungen einbezogen, die zum einen rationell durch Variation bisher betrachteter Substrate abgeleitet sind, zum anderen wurden zufällig erzeugte Sequenzen aufgenommen. Substrat 4 bietet eine T/G-Fehlpaarung im Kontext



acTggt, welche dahingehend abgewandelt wurde, daß die inneren vier Basenpaare quasi umgedreht wurden: Substrat 7 weist die innere Sequenz aggTct auf. Substrat 2 (aTcggg) wurde dahingehend modifiziert, daß die Guanine im oberen Strang gegen Cytosine ausgetauscht wurden, sodaß Substrat 8 die Sequenz aTccct anbietet. Eine weitere Variation von Substrat 2 stellt Substrat 9 dar, welches statt Guanine nun Adenine kodiert und somit die Sequenz aTcaat lautet. Weitere drei Substrate wurden zufällig (durch Würfeln) erzeugt. Es wurden zunächst 21 Hexanukleotidsequenzen erzeugt, wobei für jede Sequenz zunächst ausgewürfelt wurde, ob die T/G-Fehlpaarung an Position 2 oder 3 zu liegen kommt. Aus diesen 21 Sequenzen wurden dann drei zufällig ausgewürfelt (Substrate 10 bis 12). Alle neuen Substrate sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Substrat	7	8	9	10	11	12
Sequenz (oberer Strang)	tggTca	aTccct	aTcaat	tcTcta	taTtag	gaTagc
Länge [bp] (oberer Strang)	31	39	43	31	39	43

Analog zur Vorgehensweise im vorigen Abschnitt wurden nun multiple Substratkinetiken durchgeführt und relative Geschwindigkeitskonstanten berechnet. Dazu wurden die Substrate 7-9 sowie 10-12 jeweils im Gemisch untersucht, wobei zu Normierungszwecken je das 35mere Substrat 2 zugemischt wurde. Die Zeit-Umsatz-Kurven der Substrate 7 bis 12 sind in Abbildung 23 gezeigt

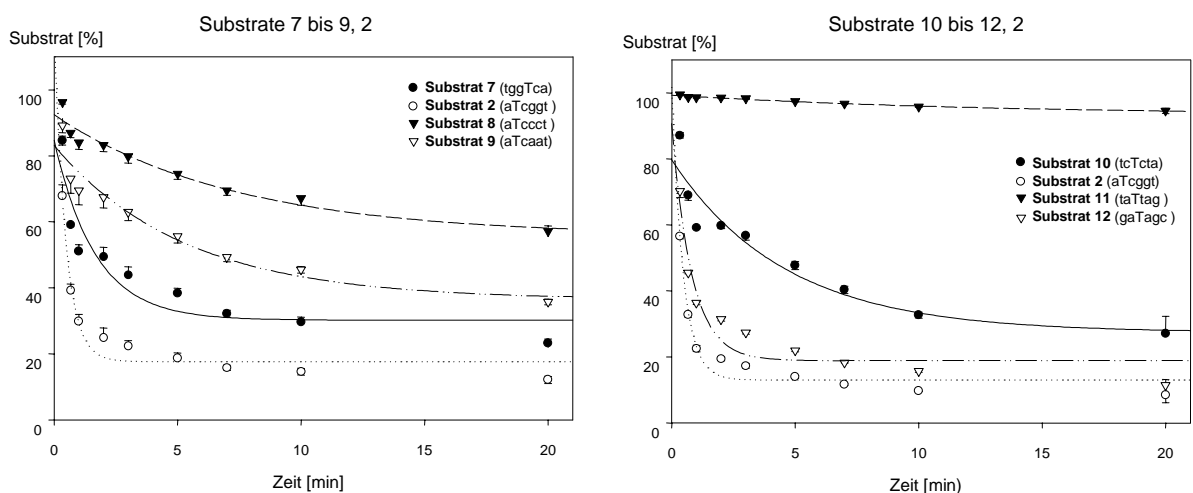


ABBILDUNG 23: Zeit-Umsatz-Kurven der Spaltung der Substrate 7 bis 9 (links) und 10 bis 12 (rechts). Zur Normierung wurde beiden Substratsätzen Substrat 2 zugesetzt.

Auch in diesen Spaltreihen ist das Problem des Abstoppens der Reaktionen zu frühen Zeitpunkten zu erkennen. Wie bereits in 4.7.1 diskutiert, ist eine Berechnung relativer Geschwindigkeitskonstanten dennoch möglich.

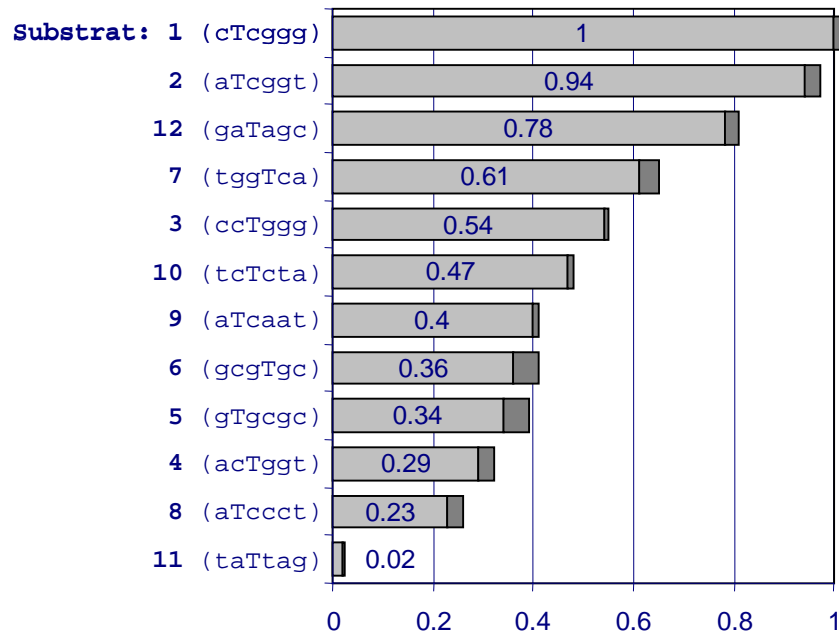


ABBILDUNG 24: Graphische Darstellung der relativen Geschwindigkeitskonstanten der 12 Substrate. Als Normierung wurde der Konstante des besten Substrates der Wert 1 zugewiesen. Die dunkelgrauen Balkenabschnitte geben den Fehler der Iteration bei einer Konfidenz von 95 % an.

Die relativen Geschwindigkeitskonstanten aller 12 untersuchten Substrate sind in Abbildung 24 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß *Vsr.Bst* in dieser *in vitro*-Untersuchung eine Variation der eine T/G-Fehlpaarung umgebenden Basen toleriert. Eine Präferenz für bestimmte Basen in direkter Nachbarschaft der T/G-Fehlpaarung ist nicht zu erkennen. Der Anteil an A/T-Basenpaaren scheint ebenfalls keinen allgemeinen Einfluß auf die Präferenz für bestimmte Substrate zu haben, wie die relativ effektive Spaltung von Substrat 12 (gaTagc; Rang 3) im Vergleich mit G/C-reichen Sequenzen zeigt. Auffällig ist lediglich, daß das einzige Substrat mit einem Thymin in direkter Nachbarschaft der Fehlpaarung (Substrat 11, taTtag) das mit Abstand am langsamsten prozessierte Substrat darstellt. Es wird 50fach langsamer gespalten als das beste Substrat und 10fach langsamer als das Substrat auf dem vorigen Rang. Dieses Ergebnis wurde mit einem neu geordnetem und aufgereinigtem Substrat bestätigt. Um den Nachbarschaftseffekt eines Thymins zu untersuchen, wurden drei weitere Substrate untersucht. Diese waren Substrat 13 (taTgag), bei welchem das Thymin in Substrat 12 gegen ein Guanin ausgetauscht wurde, weiterhin

Substrate 14 (cTtggg) und 15 (Ttcggg), welche Variationen des am effektivsten umgesetzten Substrates darstellen. Hier wurden 5' und 3' der Fehlpaarung Thymin eingeführt. Diese neuen Substrate sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Substrat	Sequenz (oberer Strang)	Länge [bp] (oberer Strang)
13	taTgag	31
14	cTtggg	39
15	Ttcggg	43

Relative Geschwindigkeiten wurden für ein Gemisch aus den Substraten 2 (als Referenz) und Substraten 13 bis 15 nicht errechnet, da die Signale der Produktpeaks der Spaltungen von Substraten 13 bis 15 gerade zu Beginn der Zeitreihe zu schwach waren. Alle drei Substrate wurden kaum prozessiert. Nach 20 Minuten konnten Substrat- und Produktpeaks quantifiziert werden. Das Referenzsubstrat 2 war nach 20 Minuten zu 82 % gespalten. Die Substrate 13, 14 und 15 waren (in dieser Reihenfolge) zu 0.2 %, 4.0 % und 2.3 % gespalten (Daten nicht gezeigt). Zum Vergleich: Das bisher am langsamsten umgesetzte Substrat 11 (taTtag) war nach 20 Minuten zu 5.4 % gespalten worden. Die hier untersuchten Substrate deuten darauf hin, daß ein Thymin in direkter Nachbarschaft des fehlgepaarten Thymins die Aktivität von *Vsr.Bst* stark herabsetzt. Die Sequenz taTgag scheint ebenfalls ein extrem schlechtes Substrat darzustellen. Bei diesem Substrat ist kein direkt benachbartes Thymin vorhanden. Kontakte des Proteins mit den die Fehlpaarung umgebenden Basen sowie die Struktur der Fehlpaarung selbst sind möglicherweise in diesem Sequenzkontext ungünstig für eine Spaltung durch *Vsr.Bst*. Die langsame Prozessierung einiger Substrate kann seine Ursache in der Bindung und/oder der Katalyse der Spaltung selbst haben. Die Trennung des Einflusses der Affinität zum Substrat von der Kinetik der Spaltung selbst ist mit diesen Experimenten nicht möglich.

Untersuchungen der Substratspezifität von *Vsr* aus *Escherichia coli* zeigten eine gewisse Toleranz gegenüber Variation in den die T/G-Fehlpaarung umgebenden Basen. Allerdings zeigen die von W. Gläsner ermittelten relativen

Geschwindigkeitskonstanten, daß Vsr aus *Escherichia coli* eine Änderung der die T/G-Fehlpaarung umgebende Sequenz weniger toleriert als Vsr.Bst. Die beiden Substrate, welche einer Desaminierung der *in vivo* gefundenen Methylierung entsprechen, waren dabei die am effektivsten durch Vsr prozessierten mit Konstanten von 1.0 (cT<sub>agg</sub>) und 0.68 (cT<sub>tgg</sub>). Bis auf ein weiteres Substrat (cT<sub>agc</sub>) wurden alle weiteren untersuchten Sequenzen deutlich langsamer gespalten als das beste Substrat. Die bestimmten Konstanten lagen hierbei alle unter 0.4. Von Lieb und Rehmat 1995 bestimmte relative Reparaturfrequenzen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Sie fanden weiterhin einige Sequenzen, die im Vergleich mit der am besten prozessierten deutlich schlechtere Substrate darstellten. Am deutlichsten wirkte sich ein Austausch an der zweiten Position 3' des Thymins aus, für die Sequenz cT<sub>agc</sub> wurde eine relative Frequenz von 0.005 bestimmt. Es bleibt festzuhalten, daß Vsr.Bst eine größere Toleranz gegenüber einer Variation der die T/G-Fehlpaarung umgebenden Basen aufweist. Sowohl für Vsr.Bst als auch für Vsr aus *Escherichia coli* werden jedoch Sequenzumgebungen gefunden, die sehr schlecht prozessiert werden. Die Art der Bindung und/oder Katalyse der beiden Enzyme scheint damit sehr ähnlich zu sein.

Von Gläsner *et al.* konnte 1995 gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen Reaktivität der Vsr-Endonuklease aus *Escherichia coli* und der Repräsentation der untersuchten Pentanukleotidsequenzen innerhalb des Genoms besteht. Derartige Sequenzen waren bis zu einem Faktor von 3.8fach unterrepräsentiert. *In vitro* gemessenen relativen Geschwindigkeitskonstanten scheinen danach die Substratpräferenz *in vivo* widerspiegeln zu können. Die Veränderung von Pentanukleotidhäufigkeiten durch Vsr kann durch eine mutagene Wirkung der Vsp-Reparatur im Zusammenspiel mit der MutHLS-Reparatur verursacht worden sein (1.3.3.3). Der Einfluß der Vsp-Reparatur auf die Komposition des Genomes von *Bacillus stearothermophilus* war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da das Genom von *Bacillus stearothermophilus* zum einen (noch) nicht komplett sequenziert ist. Der zurzeit sequenzierte Stamm *Bacillus stearothermophilus* ‚strain 10‘ (Bezeichnung Deutsche Stammsammlung: DSM 13240) läßt zudem keinen direkten Vergleich der Repräsentation von kurzen Sequenzabschnitten mit deren Präferenz als Substrate von Vsr.Bst aus dem Stamm H3 zu.

Hinweise auf eine aktivitätsabhängige Modulation des Genoms durch das *Escherichia coli*-Protein (1.3.3.3) zeigen, daß es für das Verständnis der Bedeutung

dieser Proteine für die Zelle nicht genügt, sich auf die Betrachtung einer Rolle in der Reparatur von Hydrolyseschäden an DNA zu beschränken. Die Beteiligung von Proteinen der postreplikativen Mismatch-Reparatur (MutS und MutL; 1.2) sowie mutagener Effekte bei Überexpression von Vsr deuten darauf hin, daß es sich bei der Wirkungsweise der Vsp-Reparatur um ein fein reguliertes System mit vielen Faktoren handelt, welches bis heute nicht völlig verstanden wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein MutL- und ein MutS-Homologes aus *Bacillus stearothermophilus* kloniert und aufgereinigt, um weitere Untersuchungen des Zusammenspiels zwischen Vsp- und Mismatch-Reparatur zu ermöglichen.

## 4.8 Untersuchung der Spaltaktivität mit anderen DNA-Substraten

### 4.8.1 Spaltung von U/G

Im Falle einiger T/G-Mismatch-Glykosylasen (Mig.*Mth*, TDG; 1.3.3.2) wurde beobachtet, daß diese Enzyme Desaminierungsschäden sowohl am 5-Methylcytosin als auch Cytosin amprozessierten. Die Desaminierung von Cytosin führt zu Uracil und erzeugt damit eine U/G-Fehlpaarung. Es wurde mittels multiplen Substratkinetiken gezeigt, daß die Spaltung von U/G-Fehlpaarungen durch Mig.*Mth* sogar um den Faktor 1.5 schneller erfolgt als die Spaltung von T/G-Fehlpaarungen (Fondufe, 2000). In Organismen, in welchen eine Uracil-DNA-Glykosilase existiert, ist eine signifikante Beteiligung dieser T/G-Mismatch-Glykosylasen wegen der hohen Prozessivität ersterer aber wahrscheinlich nur von untergeordneter Bedeutung. Im Falle des Vsr aus *Escherichia coli* wurde ebenfalls eine Spaltung von U/G-Fehlpaarungen sowohl *in vitro* (Gläsner *et al.*, 1992) als auch *in vivo* (Gabbara *et al.*, 1994) detektiert. Die *in vivo*-Untersuchungen zeigten jedoch eine deutlich effizientere Reparatur der untersuchten U/G-Substrate durch Uracil-N-Glykosilase. Die Hauptfunktion des Vsr-Proteins scheint damit in der Reparatur von T/G-Fehlpaarungen zu liegen. Um zu untersuchen, ob Vsr.*Bst* bei der Entfernung von Uracil aus DNA eine Rolle spielen könnte, wurde die Aktivität von Vsr.*Bst* gegenüber U/G-Substraten durch multiple Substratkinetiken quantifiziert. Dazu wurden Substrat 1 (cTcggg) und ein Substrat, welches im selben Sequenzkontext eine U/G-Fehlpaarung aufweist (cUcggg) im Gemisch mit Vsr.*Bst* behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

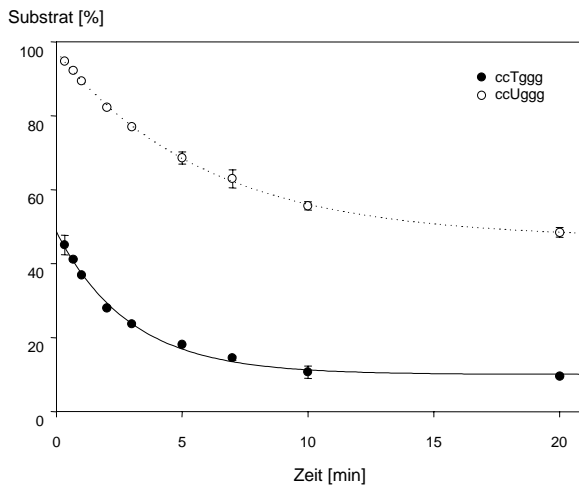


ABBILDUNG 25: Zeit-Umsatz-Kurve einer Spaltung an T/G- und U/G-Fehlpaarung im Gemisch.

Reparatur von Desaminierungsereignissen am 5-Methylcytosin ist. Die Entfernung von Uracil aus DNA wird wahrscheinlich von entsprechenden Glykosilasen durchgeführt.

#### 4.8.2 Spaltung an Thymin gepaart mit Adenin, Cytosin und Guanin

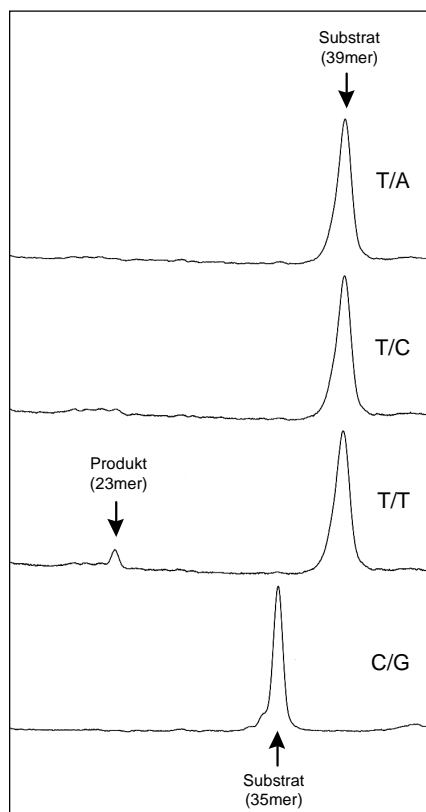


ABBILDUNG 26: Inkubation verschiedener Basenpaarungen mit *Vsr.Bst*. Substrat- und Produktpeaks sind markiert

Die relativen Geschwindigkeitskonstanten wurden mit  $k_{rel}(T/G)=1$  und  $k_{rel}(U/G)=0.4$  berechnet. Damit wird die T/G-Fehlpaarung um den Faktor 2.5 schneller prozessiert als die U/G-Fehlpaarung. Dies legt nahe, daß im Falle von *Vsr.Bst* davon ausgegangen werden kann, daß die Aufgabe dieses Enzyms in der Zelle die

Die Spaltung an Thyminen gegenüber anderen Basen wurde im Sequenzkontext ggTcct (oberer Strang, Oligonukleotid FUGxC) untersucht. Die unteren Stränge platzierten dabei gegenüber dem hier groß gedruckten Thymin des oberen Stranges jeweils ein Adenin (FUGxC-A), Cytosin (FUGxC-C) oder Thymin ((FUGxC-T)). Nach Inkubation (15 Minuten) der einzelnen Substrate mit *Vsr.Bst* (3.4.1) wurde auf einem A.L.F.-Sequenzierer gelelektrophoretisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Eine Spaltung wurde nur im Falle der T/T-Fehlpaarung beobachtet. Eine Auswertung der Integration der Flächen von Substrat- und Produktpeaks ergab, daß unter den

gewählten Bedingungen 30 % des T/G-Substrates (Abbildung 26) sowie 4 % des T/T-Substrates gespalten worden waren. Die Konsequenzen der hier *in vitro* gefundenen Aktivität gegenüber T/T-Fehlpaarungen *in vivo* lassen sich schwer abschätzen. Eine Spaltung von T/T-Fehlpaarungen wurde ebenfalls für Vsr aus *Escherichia coli* beobachtet. Die Konkurrenz zur Mismatch-Reparatur bei der Prozessierung solcher im Zuge der Replikation entstehenden Fehlpaarungen zu einer T/A-A/T-Transition führen. Die relativ langsame Prozessierung von T/T-Fehlpaarungen durch Vsr.Bst läßt jedoch vermuten, daß dieser Fall kaum von Bedeutung sein dürfte, da im Falle von *Escherichia coli* Substrate, welche um den Faktor 8 langsamer prozessiert wurden als das beste Substrat, zu keiner Verschiebung der Repräsentation der entsprechenden Pentanukleotide im Genom führten (Gläsner *et al.*, 1995). Eine Klärung dieser Frage ist jedoch experimentell nur schwer möglich.

#### 4.8.3 Überprüfung auf Spaltung des unteren Stranges

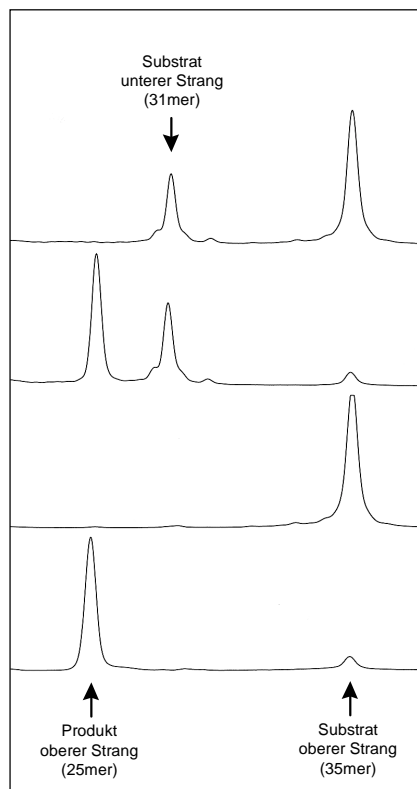


ABBILDUNG 27: Überprüfung auf Spaltung des unteren Stranges. Obere zwei Kurven: Substrat 1 (43mer) mit markiertem unterem Strang. Untere zwei Kurven: Dasselbe Substrat, unterer Strang unmarkiert

Die Reparatur von hydrolytischen Schäden an 5-Methylcytosin in *Escherichia coli* erfolgt durch Inzision 5' des Thymins der gebildeten T/G-Fehlpaarung. Dieser Schnitt auf einem der beiden DNA-Stränge wird dann weiter prozessiert. Somit sollte Vsr.Bst, einen ähnlichen Mechanismus der Reparatur vorausgesetzt, ebenfalls nur auf einem Strang einen Schnitt setzen. Um zu überprüfen, ob eine Spaltung am unteren Strang der hier gewählten Substrate im Bereich der Fehlpaarung erfolgt, wurde der obere fluoreszenzmarkierte Strang des Substrates 1 mit einem ebenfalls fluoreszenzmarkierten unteren Strang hybridisiert und dieses doppelt markierte Substrat in einem Spalttest mit Vsr.Bst eingesetzt. Die beobachteten DNA-

Spezies bei Analyse des behandelten Substrates sind damit 43meres und 31meres ungespaltenes Substrat sowie ein 25meres Spaltprodukt des oberen Stranges. Im Falle der Spaltung des unteren Stranges im Bereich der Fehlpaarung entsteht ein weiteres 18meres Produkt.

Wie in Abbildung 27 gezeigt, wird ein solches 18meres Produkt nicht gebildet. Das 43mere Oligonukleotid des oberen Stranges wird fast quantitativ gespalten, während das mögliche 31mere Substrat (unterer Strang) nicht gespalten wird. Die Inzision ist also, wie bei dem Homologen aus *Escherichia coli* beobachtet (Hennecke, 1991), strangspezifisch.

#### 4.9 Bestimmung kinetischer Konstanten

Das Vsr-Homologe ist ein katalytisch betrachtet vergleichsweise langsames Enzym. Die katalytischen Konstanten wurden mit  $v_{\max}=0.25 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $K_m = 0.27 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=0.44 \text{ min}^{-1}$  bestimmt. Die Vsp-Reparatur steht jedoch in Wechselwirkung mit der Mismatch-Reparatur und wird durch MutS und MutL stimuliert. Eine Erhöhung der Vsr-Aktivität in *Escherichia coli* durch Überexpression ist mutagen (Doiron, 1996), d. h. der Organismus besitzt zwei Reparaturmechanismen, die sich gegenseitig beeinflussen und aufeinander abgestimmt sind. Um eine Vorstellung von den Parametern der Vsp-Reparatur in *Bacillus stearotherophilus* zu erlangen, wurden kinetische Konstanten für Vsr.Bst bestimmt (3.4.4). Dazu wurde eine konstante Enzymkonzentration von  $0.57 \mu\text{M}$  mit Substratkonzentrationen von 3, 20, 50, 100 und 200 nM eingesetzt. Um eine Detektion mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzierautomaten zu ermöglichen, wurden konstante Mengen an Fluoresceinmarkiertem Substrat 2 mit variablen Mengen unmarkierten Substrates 2 gemischt. Die experimentellen Daten wurden als ‚Hanes Plot‘ dargestellt (Abbildung 28) und daraus kinetische Konstanten abgeleitet. Diese sind:  $K_M=0.27 \mu\text{M}$ ,  $v_{\max}=0.27 \mu\text{M}/\text{min}$  und eine Wechselzahl von  $v_{\max}=0.44 \text{ min}^{-1}$ .



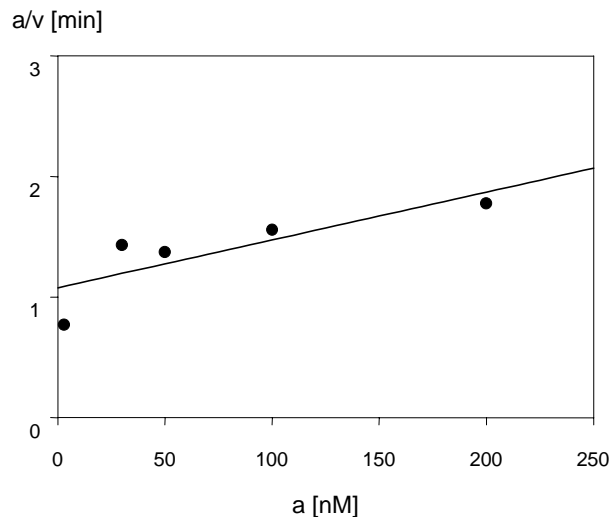


ABBILDUNG 28: ‚Hanes plot‘ zur Bestimmung der kinetischen Konstanten von Vsr.Bst (Erläuterungen im Text). Die Regressionsgerade wurde mit ‚Sigma Plot‘ berechnet. Schnittpunkt mit der y-Achse ist  $y_0=1.08$  min, die Steigung ist  $1/v=3.9680e^{-3}$  min $\cdot$ nM $^{-1}$

Damit ist Vsr.Bst ein ‚schnelleres‘ Enzym als Vsr aus *Escherichia coli*. Unter der Berücksichtigung der niedrigeren Reaktionstemperatur bei der Bestimmung der Konstanten, setzt Vsr aus *Escherichia coli* unter vergleichbaren Bedingungen maximal 0.16 Substratmoleküle pro Minute um. Mit einer maximalen Umsetzung von 2.3 Substratmolekülen pro Minute ist Vsr.Bst damit etwa 14mal schneller. Warum in *Bacillus stearothermophilus* ein schnelleres Vsr benötigt, könnte auf die im Vergleich zu *Escherichia coli* höheren Wachstumstemperatur zurückzuführen sein: Bei höheren Temperaturen finden in der Zelle deutlich mehr Desaminierungsprozesse an 5-Methylcytosin statt. Ein anderer möglicher Grund mag eine weniger starke oder gar keine Aktivierung von Vsr durch die Enzyme MutS und MutL der Mismatch-Reparatur sein.

Die kinetischen Daten wurden verwendet, um die aus Spalttests gewonnenen Ergebnisse zu verstehen. Die in multiplen Substratkinetiken eingesetzte Substratkonzentration betrug 2 nM, die Enzymkonzentration war 0.57  $\mu$ M. Es wurden nun mit Hilfe der bestimmten kinetischen Konstanten Substratumsatzkurven berechnet, die mit den experimentell bestimmten Daten verglichen wurden (3.4.5). Dazu wurde eine konstante Substratkonzentration von 2 nM gewählt und die Enzymkonzentration variiert. Ein Vergleich der berechneten Kurven mit einer

experimentell erzeugten Zeit-Umsatzkurve des Substrates 1 ist in Abbildung 29 gezeigt.

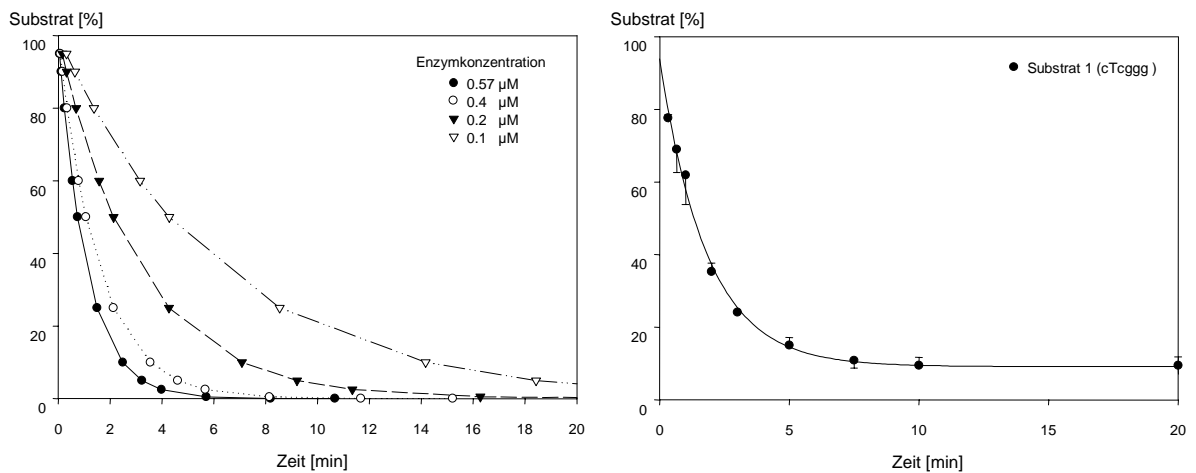


ABBILDUNG 29: Links: Berechnete Zeit-Umsatz-Kurven für vier Enzymkonzentrationen nach Integration der Michaelis-Menten-Gleichung. Die gewählte Substratkonzentration war 2 nM. Diese war die üblicherweise eingesetzte Gesamtsubstratkonzentration bei multiplen Substratkinetiken mit vier verschiedenen Substraten. Rechts: Zeit-Umsatz-Kurve für Substrat 1. Diese Kurve wurde aus Abbildung 21 entnommen. Die Enzymkonzentration war 0.57 µM, die Gesamtsubstratkonzentration war 2 nM.

Man erkennt, daß die experimentell erzeugten Daten von den rechnerisch erzeugten sich im Wesentlichen dadurch unterscheiden, daß im Experiment etwa 15 % des Substrates nicht umgesetzt werden, während laut Berechnungen eine komplette Umsetzung erfolgen sollte. In früheren Arbeiten mit Vsr aus *Escherichia coli* wurde dies ebenfalls beobachtet. Als eine der möglichen Erklärungen hierfür war die geringe verbleibende Substratkonzentration angebracht worden, nachdem eine Inaktivierung bzw. eine Zerstörung der Enzymaktivität im Verlaufe der Reaktion experimentell ausgeschlossen worden war. Die hier gezeigten Modellrechnungen widersprechen jedoch dieser Erklärung. Ein Aktivitätsverlust durch hitzebedingte Inaktivierung von Vsr.Bst wird unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet (siehe nächster Abschnitt). Man erkennt weiterhin, daß bereits eine vergleichsweise geringe Änderung der Enzymkonzentration den Reaktionsverlauf deutlich beeinflusst. Ein Vergleich der berechneten Daten mit der experimentell erzeugten Kurve zeigt, daß sowohl die Bestimmung der kinetischen Konstanten als auch die Enzymkonzentration exakt waren (wenn man von der Möglichkeit absehen mag, daß sich zwei Fehler hier kompensieren könnten). Eine Berechnung von Kurven für Variationen der Substratkonzentrationen (um den Faktor 5) zeigte, daß sich diese

kaum auf den Kurvenverlauf auswirkt, was aufgrund des hohen Enzymüberschusses nicht verwundert.

#### 4.10 Stabilität von Vsr.Bst

Die Stabilität des Enzyms wurde durch Präinkubation bei verschiedenen Temperaturen überprüft. Dazu wurde Vsr.Bst im Reaktionspuffer in 25  $\mu$ l Gesamtvolumen und mit Wachs überschichtet und bei unterschiedlichen Temperaturen (50, 70 und 90 °C) präinkubiert, ein Aliquot von 18  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l Substrat vermischt und anschließend für 20 Minuten bei 50 °C inkubiert.

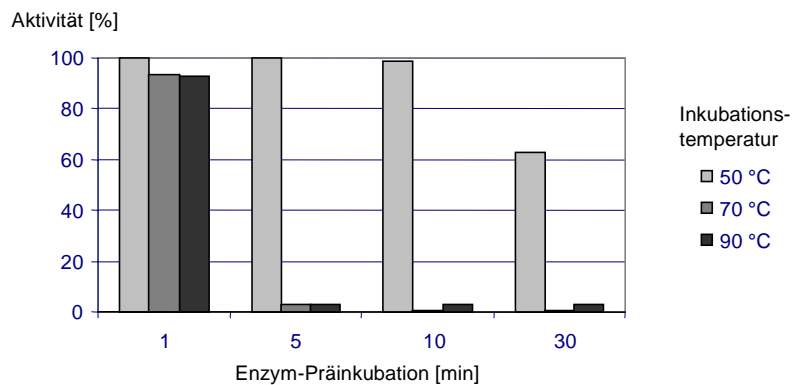


ABBILDUNG 30: Präinkubation von Vsr.Bst bei 50, 70 und 90 °C. Die Inkubationszeit ist angegeben. Die Aktivität bei Inkubation für eine Minute bei 50 °C wurde auf 100 % normiert und als Referenz für alle anderen Aktivitätsangaben verwendet.

Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, ist die Reaktivität bei Präinkubation für 10 Minuten bei 50 °C praktisch unbeeinträchtigt, unter diesen Bedingungen weist Vsr.Bst selbst nach einer Stunde noch 10 % Aktivität auf (nicht gezeigt). Bei höheren Temperaturen wird Vsr.Bst schnell inaktiviert. Nach einer Minute ist zwar sowohl nach Präinkubation bei 70 °C als auch bei 90 °C eine nur gering verminderte Aktivität zu beobachten, nach 5 Minuten Präinkubation ist Vsr.Bst bei beiden Temperaturen jedoch fast völlig inaktiviert. Da es bei den verwendeten 1.5 ml Reaktionsgefäßen selbst bei 25  $\mu$ l Volumen einige Sekunden dauert, bis sich der Inhalt auf 70 bzw. 90 °C erhitzt hat, müssen die Werte für eine Minute Inkubation etwas relativiert werden.

Diese Daten zeigen, daß Vsr.Bst unter den in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Reaktionsbedingungen (50 °C, 20 Minuten Inkubation) stabil ist. Nach 10 Minuten Inkubation bei 50 °C weist das Enzym noch nahezu 100 % Aktivität auf.

## 4.11 Sequenzumgebung des *vsr*-Gens aus *Bacillus stearothermophilus*

Einige putative *Vsr*-Homologe wurden als *open reading frames* in Nachbarschaft von Restriktions-Modifikations-Systemen gefunden. Unter diesem Hintergrund sollte die Sequenzumgebung des *vsr*-Gens aus *Bacillus stearothermophilus* H3 bestimmt werden. Dies sollte z.B. die Identifikation einer Methyltransferase ermöglichen, die Kenntnis deren Substratpräferenz eine wertvolle Zusatzinformation darstellen würde. Dazu wurde eine Kosmidbank chromosomaler DNA aus *Bacillus stearothermophilus* H3 erstellt. Kosmide, welche ein *vsr*-Gen tragen, wurden dann durch Kolonie-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde identifiziert. Anschließend wurde ein geeignetes Kosmid sequenziert.

### 4.11.1 Konstruktion einer Kosmid-Bank von *Bacillus stearothermophilus* H3

Zur Konstruktion einer genomischen Kosmidbank von *Bacillus stearothermophilus* H3 wurde zunächst hochmolekulare chromosomale DNA präpariert und diese einem Partialverdau mit *Bsp*143I unterzogen. Dazu wurden jeweils 150 µg DNA mit einer Enzym-Verdünnungsreihe versetzt und bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 0.5 M EDTA wurden die Proben auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und eine geeignete Probe zur Ligation mit Kosmidarmen eingesetzt. Nach Verpackung und Infektion von Zellen des Stammes BMH71-18 wurde eine Gesamtanzahl von  $10^5$  bei der Verpackung erzeugten infektiösen Partikeln bestimmt.

Bei einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 40 kbp und unter der Annahme, daß das Genom von *Bacillus stearothermophilus* H3 eine ähnliche Größe wie das Genom von *Bacillus subtilis* aufweist ( $4.2 \cdot 10^6$  Basen), so ist für eine 99 %ige Abdeckung des Genoms eine Anzahl von 481 Kolonien vonnöten. Bei optimaler Verteilung der Fragmente über das Genom sollten etwa 100 Kolonien das gesamte Genom abdecken können (3.2.11).

Nun wurden dreimal 96 Kolonien gepickt und parallel auf dYT Amp<sup>50</sup> Kan<sup>25</sup>-Agar abgelegt und ebensolches Flüssigmedium angeimpft (Mediums-Volumina von 100 µl). Die Flüssigkultur-Platten wurden über Nacht unter kräftigem Schütteln (250 rpm) bei 37 °C inkubiert, mit je 10 µl DMSO versetzt und bei -70 °C gelagert. Die

Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und wurden für eine Kolonie-Hybridisierung eingesetzt.

#### 4.11.2 Identifikation *vsr*-tragender Kosmide

Die Identifikation von *vsr*-tragenden Kosmiden erfolgte durch Kolonie-Hybridisierung (3.2.7) mit *vsr*-spezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden. Für die Herstellung der Sonden wurden die Primer 5'ΔN VsrBst und 3' VsrBst-Xho verwendet, als Template diente ein zuvor mit denselben Primern über chromosomale DNA aus *Bacillus stearothermophilus* H3 erzeugtes PCR-Produkt. Es war aufgefallen, daß die Kosmid-tragenden Klone unterschiedlich große Kolonien beim Wachstum auf Agarplatten zeigten. Bei der Übertragung auf Platten, welche für die Hybridisierung verwendet werden sollten, wurden getrennt je 96 große, mittlere und kleine Kolonien übertragen. Die Koloniegröße könnte mit den Kosmid-getragenen Genen zusammenhängen. Bei der Kolonie-Hybridisierung wurden dann drei Kosmid-tragende Kolonien identifiziert, welche das *vsr*-Gen tragen. Alle drei Klone stammten von der Agar-Platte, auf welcher Kolonien mittlerer Größe abgelegt worden waren.

DNA der drei *vsr*-tragenden Kosmide wurden mit Hilfe des Jetstar-Midi-Kits präpariert (3.2.4.10). Diese diente zunächst als Template für eine PCR mit *vsr*- und SuperCos1-spezifischen Primern. Ziel war es, Information über die Lage des *vsr*-Gens auf dem Kosmidfragment zu erhalten. Die SuperCos1-spezifischen Primer paaren 5' und 3' der MCS (,scos\_for' und ,scos\_rev'), die verwendeten *vsr*-spezifischen Primer waren 5'ΔN VsrBst und 3' VsrBst-Xho. Es wurden alle vier Primerkombinationen eingesetzt. Die Elongationszeit bei diesen PCR war 2 Minuten. Die Auftrennung auf einem Agarosegel zeigte mit allen drei Kosmid-DNAs PCR-Produkte bei Verwendung des Primers 5'ΔN VsrBst. Anhand der Größe der PCR-Produkte ließ sich abschätzen, daß die *vsr*-Gene auf den drei unterschiedlichen Kosmid-Fragmenten derart liegen, daß ,upstream' des Gens weitere 1000, 1500 bzw. 4500 Basen an genetischer Information aus *Bacillus stearothermophilus* H3 zu finden sind. Für eine Sequenzierung wurde das Kosmid ausgewählt, welches ,upstream' des *vsr*-Gens weitere 4.5 kbp Information liefern sollte.

### 4.11.3 Sequenzierung eines *vsr*-tragenden Kosmids

Zur Sequenzierung des ausgewählten Kosmides wurde eine Plasmidbibliothek erstellt (3.2.12). ‚Insert‘-tragende Kolonien wurden in je 100  $\mu$ l TB Cm<sup>25</sup> auf Mikrotiterplatten übertragen und über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Präparation von DNA und anschließende Sequenzierung wurden von S. Blume im Labor für Genomanalyse durchgeführt. Die anschließende Assemblierung von 476 Sequenzen wurde von T. Hartsch mit Hilfe des Programmes ‚Staden‘ vollzogen. Dabei wurden sieben zusammenhängende DNA-Abschnitte (‚contigs‘) erzeugt, die insgesamt 21.602 bp ausmachen. Das größte zusammenhängende ‚contig‘ mit einer Länge von 13.117 bp kodiert dabei für Sequenzen des SuperCos1-Vektors sowie des Plasmides pTZ19R- $\Delta$ *bla-cat*. Das ‚insert‘ scheint nach dieser Assemblierung lediglich eine Größe von 7.485 bp zu besitzen. Dies scheint in Anbetracht der Eigenschaften des verwendeten Verpackungsextraktes sehr klein. Der überwiegende Anteil der Einzelsequenzen deckt zudem den Bereich des die Vektorsequenzen kodierenden ‚contigs‘ ab. Die Sequenz des *vsr*-Gens findet sich auf einem ‚contig‘ von 2.280 bp wieder (Genbank-Zugangskode AJ318782). Dabei wurden keine bis dato unbekannt Sequenzen ‚upstream‘ des Gens identifiziert. ‚downstream‘ des *vsr*-Gens finden sich zwei offene Leserahmen, welche für Proteine unbekannter Funktion kodieren. Der erste Leserahmen liegt 173 bp ‚downstream‘ des *vsr*. Er kodiert für ein Protein von 135 Aminosäuren Länge, mit einem relativen Molekulargewicht von  $M_r=15.362$  und einem berechneten isoelektrischen Punkt von  $pI=4.8$ . Homologe zu diesem Protein wurden in der Datenbank unvollständig sequenzierter Genome, welche von TIGR zur Verfügung gestellt wird, gefunden. Dies sind Proteine aus *Sinorhizobium meliloti* (31 % Identität, 46 % Ähnlichkeit), *Mycobacterium tuberculosis* (21 % Identität, 35 % Ähnlichkeit) und *Mycobacterium bovis* (21 % Identität, 35 % Ähnlichkeit). Der zweite offene Leserahmen liegt 43 bp ‚downstream‘ des ersten. Er kodiert für ein Protein von 234 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von  $M_r=25.557$  und einem berechneten isoelektrischen Punkt von  $pI=6.5$ . Zu diesem Protein wurden keinerlei Homologe gefunden. DNA-Sequenzen, die für Restriktionsendonukleasen oder Methyltransferasen kodieren könnten, wurden nicht gefunden. Der Grund für die scheinbar geringe Größe des ‚inserts‘ und für die Überrepräsentation von Plasmid- und Kosmidarm-Sequenzen in der Plasmidbank des untersuchten Kosmids ist unbekannt. Mögliche

Erklärungen wären ein Verlust der ‚insert‘-DNA im Zuge der Kultivierung des Kosmid-tragenden Klones. Möglich wäre auch, daß die auf dem ‚insert‘ des Kosmides gelegenen Sequenzen aufgrund nicht weiter bekannten Gründen nur schwer klonierbar sind und deshalb in der Plasmidbibliothek des Gesamtkosmids entweder nicht vorhanden oder drastisch unterrepräsentiert sind.

#### **4.12 MutS- und MutL-Homologe aus *Bacillus stearothermophilus***

Es gibt klare Evidenzen für ein Zusammenspiel der Vsp-Reparatur und den Schlüsselenzymen der Mismatch-Reparatur, MutS und MutL (1.3.3.3). Von B. Fartmann wurden mit Hilfe degenerierter Primersätze Fragmente eines MutS- und eines MutL-Homologen in *Bacillus stearothermophilus* H3 gefunden. Durch ‚screening‘ einer  $\lambda$ -Phagenbibliothek mittels MutS- und MutL-spezifischer Sonden gelangte er zur Sequenz eines Abschnittes von 5298 Basenpaaren des Chromosoms von *Bacillus stearothermophilus* H3. Auf diesem DNA-Abschnitt finden sich die Gene für ein MutS- und ein MutL-Homolog wieder (siehe Anhang). Um *in vitro*-Untersuchungen des Einflusses von MutS und/oder MutL auf die Aktivität von Vsr.Bst zu ermöglichen, sollten das MutS- und das MutL-Homologe aus *Bacillus stearothermophilus* H3 produziert und aufgereinigt werden. Von W. Kramer wurde das Gen des MutL-Homologen in das Expressionsplasmid pET-21d(+) kloniert und so der Vektor pET-21d(+)-BstMutL erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Fusion mit einer Hexahistidinsequenz vorgenommen, um eine Aufreinigung mittels IMAC (3.3.5.2) zu ermöglichen. Ausgehend vom Vektor pET-21d(+)-BstMutL wurde der Vektor pET-21d(+)-BstMutL-H6 konstruiert (Abbildung 31). Die Klonierung von pET-21d(+)-BstMutL-H6 wurde durch Sequenzieren überprüft. Der Vektor wurde zur Expression in den Stamm BL21 DE3 eingebracht.





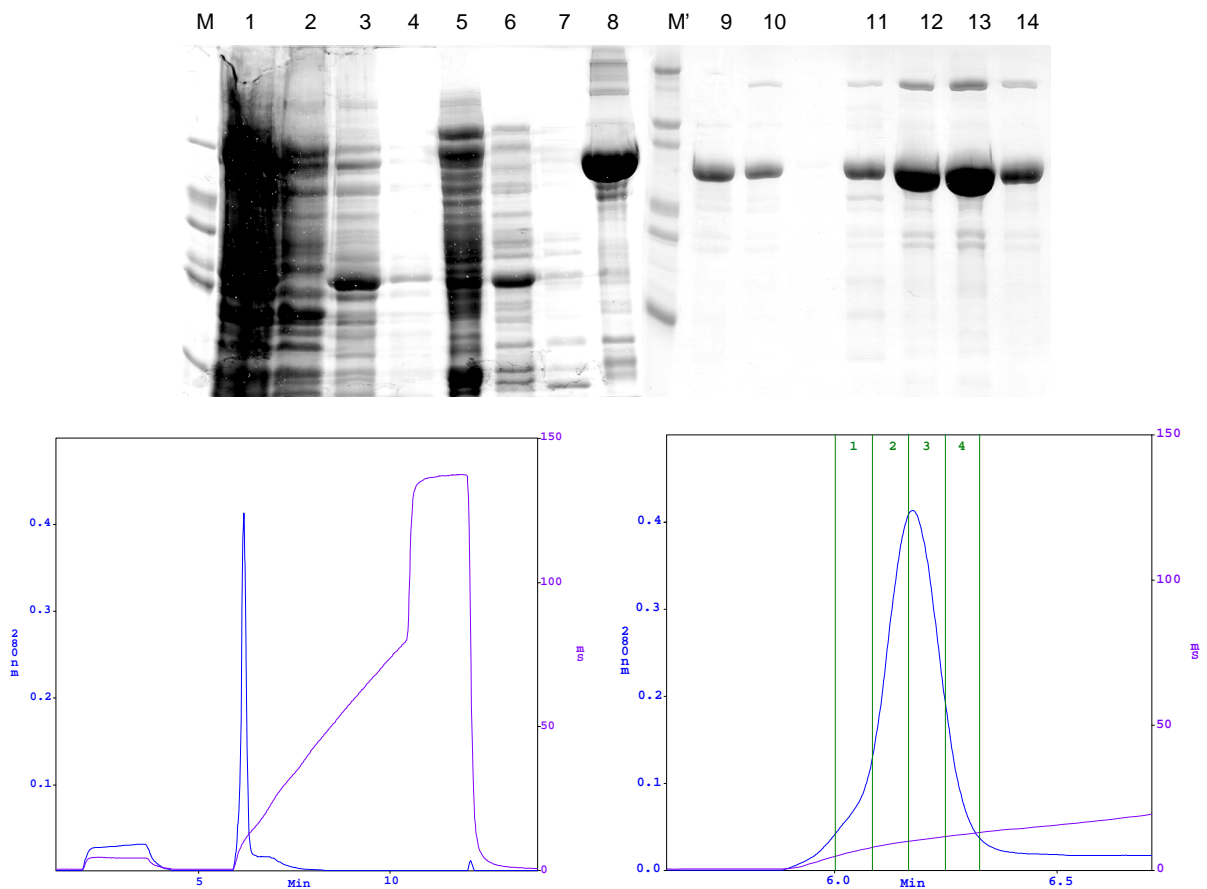


ABBILDUNG 32: Aufreinigung des Hexahistidin-MutL aus *Bacillus stearothermophilus* via IMAC und Heparin-Matrix. Oben: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte. Spur 1: Rohextrakt einer induzierten Expressionskultur. Spur 2: Durchlauf nach Auftrag auf eine prääquilibrierte ‚Chelating Sepharose‘-Säule. Spuren 3 bis 7: Waschschrte mit IMAC-Puffer A (ohne Imidazol, 10, 30, 50, 70 mM Imidazol). Spur 8: Elution mit IMAC-Puffer, 300 mM Imidazol. Spur 9: Probe nach Ammoniumsulfat-Fällung. Spur 10: Probe nach Dialyse. Spuren 11 bis 14: Fraktionen 1 bis 4 des Elutionspeaks der affinitätschromatographischen Aufreinigung mittels Heparin-Matrix. M: ‚Mid Range‘ Proteinmarker. M': ‚High Range‘ Proteinmarker. Unten: Chromatogramme der Absorption bei 280 nm (siehe Achsbeschriftung links); violett: Leitfähigkeit in Millisievert (siehe Achsbeschriftung rechts; 77 mS entsprechen einer 1 M wässrigen NaCl-Lösung); zeitlicher Verlauf in Minuten angegeben Flußrate: 25 ml/min.

Nach Zentrifugation (Sorvall RC5, 15.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde das Proteinpellet in 20 ml HEPES 100/5 mM DTT resuspendiert und über Nacht gegen 1 Liter HEPES 100/5 mM DTT dialysiert. Die Proteinlösung wurde im zweiten Schritt einer Aufreinigung durch Bindung an Heparin-Matrix (Poros) an einer ‚Biocad Workstation‘ unterzogen (3.3.5). Die Aufreinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen 2 und 3 wurden vereinigt, mit Glycerin versetzt (1:1, v/v) und bei –70 °C gelagert. Auf diese Weise konnten etwa 10 mg Protein pro Liter Ausgangskultur aufgereinigt werden. Eine Dokumentation der Aufreinigung sowie Analyse der relevanten Schritte mittels SDS-PAGE findet sich in Abbildung 32.

In Spur 8 ist eine Probe nach der Aufreinigung mittels IMAC aufgetragen. Ein Vergleich mit der Probe in Spur 9 zeigt einen Aufreinigungseffekt der Ammoniumsulfat-Fällung, auch wenn die Beurteilung wegen unterschiedlich aufgetragenen Mengen keine exakte Beurteilung zuläßt. Nach der Dialyse beobachtet man das Auftauchen einer Bande bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 170. Hierbei handelt es sich um MutL-Dimere. Die Tendenz, oxidativ Dimere zu bilden, wurde bei Aufreinigungen von MutL immer wieder beobachtet, und ließ sich trotz Reduktionsmitteln wie in diesem Falle DTT nicht völlig vermeiden. Unterhalb der prominenten Bande erkennt man in den Spuren 13 bis 16 weiterhin zwei Banden, die ebenfalls immer wieder bei Aufreinigungen beobachtet wurden. Diese beiden Banden sind nach der IMAC nicht in derselben Deutlichkeit ausgeprägt wie im letzten Aufreinigungsschritt. Sie kopurifizieren mit MutL. Bei Addition der Masse dieser beiden Spezies stellt man fest, daß sie möglicherweise auf eine Spaltung des MutL (z.B an einem Domänenübergang) zurückzuführen sein können.

#### 4.12.2 Klonierung des MutS-Homologen

Von B. Fartmann waren bei der Suche nach MutS- und MutL-Sequenzen nur  $\lambda$ -Klone gefunden worden, welche ein unvollständiges *mutS*-Gen kodieren. Daher bestand die Vermutung, daß dieses Gen, via Plasmid in *Escherichia coli* eingebracht, toxische Effekte zeigen könnte. Es wäre unter diesen Umständen denkbar, daß eine Koexpression mit MutL diesen Effekt vermindern könnte. Daher sollte zunächst ein Fragment kloniert werden, welches eine Koexpression von MutS und MutL ermöglicht. Dazu wurde ein *SacI-EcoRI*-Fragment chromosomaler DNA (4531 bp) in pET-21d(+) kloniert. Auf diesem liegen das komplette *mutL*-Gen sowie das *mutS*-Gen, bei welchem 552 Basen des 5'-Endes fehlen. Die fehlende 5'-Sequenz des *mutS*-Gens wurde ausgehend von chromosomaler DNA in einer PCR amplifiziert und über *XbaI* und *SacI* inkloniert, sodaß die komplette *mutS*-Sequenz hergestellt wurde. Auf diese Weise wurde der Vektor pET-21d(+)-BstMutSL erhalten (Abbildung 33).

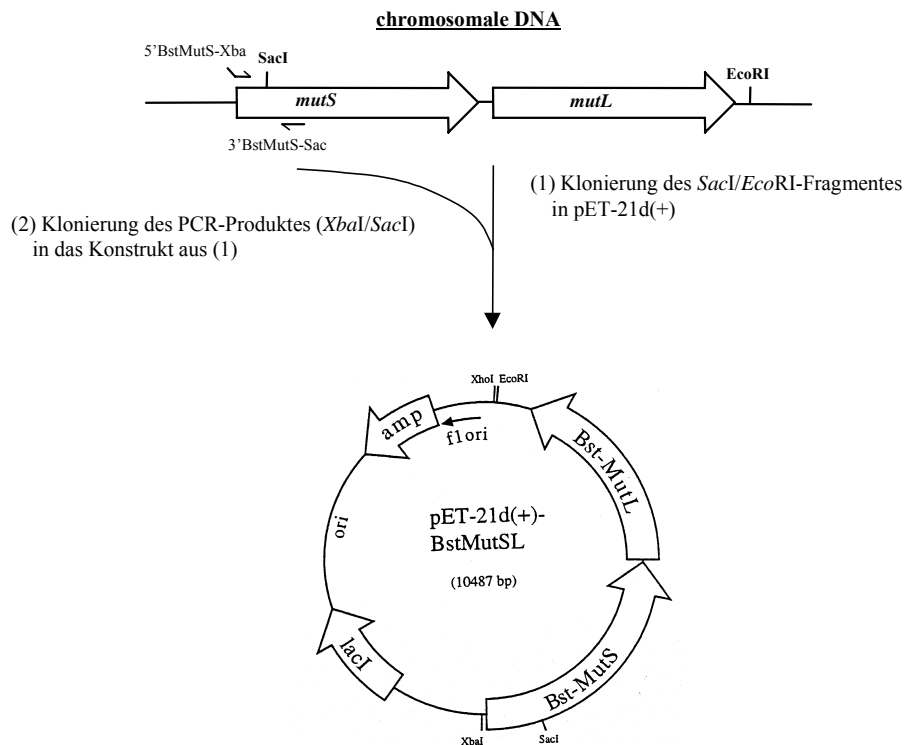


ABBILDUNG 33: Klonierung des Vektors pET-21d(+)-BstMutSL. In einem ersten Schritt wurde ein *SacI/EcoRI*-Fragment in pET-21d(+) eingebracht. Zur Klonierung des ein *SacI-EcoRI*-Fragments wurden 80 µg chromosomaler DNA mit *SacI* und *EcoRI* verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Bereich um 4.5 kbp wurde in fünf horizontalen dünnen Gelstreifen ausgeschnitten und die DNA dieser fünf Streifen getrennt aus dem Gel aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine quantitative PCR (Primer: 5' BstMutS-screen und 3' BstMutS-screen; drei PCR à 12, 15 und 18 Zyklen). Auf diese Weise konnte diejenige aus dem Gel gereinigten DNA-Probe identifiziert werden, welche am meisten des zu klonierenden Fragmentes enthielt. Diese Probe wurde zur Ligation mit *SacI*- und *EcoRI*-verdauter pET-21d(+)-DNA eingesetzt. Im zweiten Schritt wurde in dieses Konstrukt ein PCR-Produkt zur Komplettierung des 5'-Endes von *mutS* einkloniert. Dazu wurde am 5'-Ende des PCR-Produktes primerinstruiert eine *XbaI*-Schnittstelle generiert.

Ausgehend von diesem Expressionsplasmid pET21d-MutSL wurde ein weiteres Expressionsplasmid pET 21d BstMutS-H6 konstruiert, welches die Produktion eines Hexahistidin-fusionierten solitären MutS erlaubt. Dazu wurde das *mutL*-Gen sowie der 3'-Terminus des *mutS*-Gens aus dem Vektor pET-21d(+)-BstMutSL herausgeschnitten und durch Einklonieren eines PCR-erzeugten Fragment ersetzt. Dadurch wird die *mutS*-Sequenz wiederhergestellt und mit der Plasmid-codierten Hexahistidin-Sequenz fusioniert (Abbildung 34). Das auf diese Weise erzeugte Expressionsplasmid pET21d-BstMutS-H6 wurde durch Sequenzieren überprüft und in den Stamm BL21 (DE3) eingebracht.



Elutionsfraktion 3 wurden mit Glycerin versetzt (1:1, v/v) und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf diese Weise konnten etwa 5 mg Protein pro Liter Ausgangskultur aufgereinigt werden. Eine Dokumentation der Aufreinigung sowie Analyse der relevanten Schritte mittels SDS-PAGE findet sich in Abbildung 35.

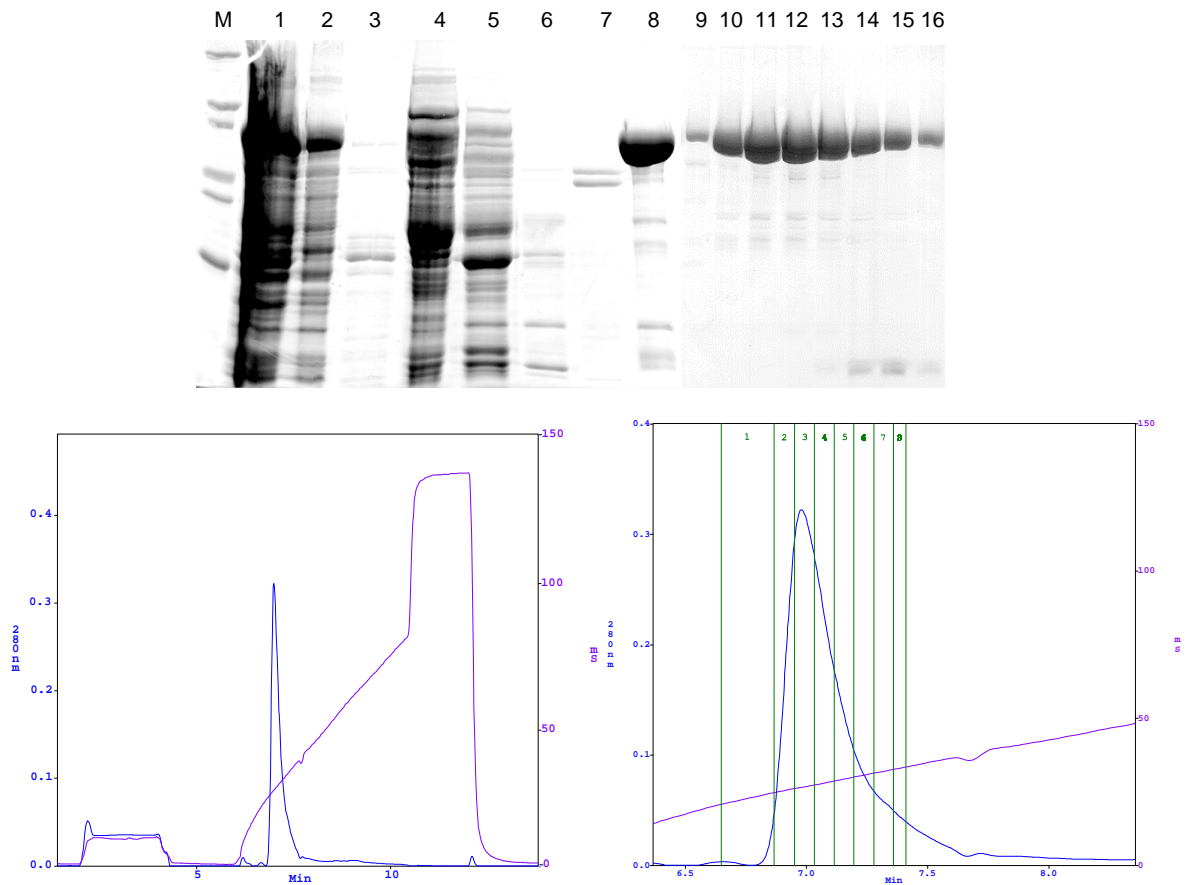


ABBILDUNG 35: Aufreinigung des Hexahistidin-MutS aus *Bacillus stearothermophilus* via IMAC und Anionenaustauscher-Chromatographie. Oben: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte. Spur 1: Rohextrakt einer induzierten Expressionskultur. Spur 2: Durchlauf nach Auftrag auf eine prääquilibrierte ‚Chelating Sepharose‘-Säule. Spuren 3 bis 7: Waschschrte mit IMAC-Puffer A (ohne Imidazol, 10, 30, 50, 70 mM Imidazol). Spur 8: Elution mit IMAC-Puffer, 300 mM Imidazol. Spuren 9 bis 16: Fraktionen 1 bis 8 des Elutionspeaks der Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (siehe unten rechts). Die Probe in Spur 11 wurde in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten verwendet (Fraktion 3 im unteren Chromatogramm). M: ‚High Range‘ Proteinmarker. Unten: Chromatogramme der Anionenaustauscher-Chromatographie; links: gesamter Lauf, rechts: Ausschnitt aus dem gesamten Lauf im Bereich des Elutionspeak. Blau: Absorbtion bei 280 nm (siehe Achsbeschriftung links); violett: Leitfähigkeit in Millisievert (siehe Achsbeschriftung rechts; 77 mS entsprechen einer 1 M wässrigen NaCl-Lösung); zeitlicher Verlauf in Minuten angegeben. Flußrate: 25 ml/min.

Ein Vergleich der Spur 8 (nach IMAC) mit den Spuren 10 bis 16, so erkennt man einen deutlichen Reinigungseffekt der Anionenaustauscher-Säule. In den Spuren 14 bis 16 erkennt man die Elution einer Verunreinigung im niedermolekularen Bereich, welche in den Spuren 9 bis 12 nicht zu finden ist. Wie auch im Falle der

Aufreinigung des MutL, ist hier die Kopurifikation zweier Banden der relativen Molmasse von etwa 45 und 55 zu beobachten. Auch hier ist eine Spaltung in zwei Domänen denkbar, addiert ergeben diese Banden in etwa die Masse des gesamten Moleküls.

#### **4.12.4 Überprüfung des Einflusses von MutL und MutS auf die Aktivität von Vsr.Bst**

Es wurde überprüft, ob mit dem hier verwendeten ‚assay‘ ein Einfluß auf die Aktivität von Vsr.Bst in Anwesenheit von MutL und/oder MutS beobachtet werden kann. Dazu wurden multiple Substratkinetiken durchgeführt. Als Substrate wurden Substrat 1 (cTcggg) sowie Substrat 8 (aTccct) gewählt. Substrat 1 wird von Vsr.Bst am besten ( $k_{rel}=1$ ), Substrat 8 ( $k_{rel}=0.23$ ) vergleichsweise langsam umgesetzt. Es wurden verschiedene Konzentrationen an Enzym, alle Kombinationen der drei Enzyme sowie Inkubation mit und ohne ATP untersucht. Dabei wurde keine Spaltung beobachtet wenn Vsr.Bst nicht zugegeben worden war. Im Falle der Zugabe von Vsr.Bst konnte in Anwesenheit von MutS und/oder MutL keine Veränderung der Reaktionskinetiken beobachtet werden.

Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten dafür, daß hier kein Effekt beobachtet wurde. Es wäre denkbar, daß MutL und MutS nicht aktiv waren. Um die Aktivität zu überprüfen wären z. B. Gelretardationsanalysen denkbar (Drotschmann *et al.*, 1998). Eine andere Möglichkeit wäre, daß es größerer Substrate bedarf, um einen stimulatorischen Effekt sehen zu können. Mit Substraten derselben Größenordnung konnte allerdings mit Vsr und MutL aus *Escherichia coli* eine Stimulation der Bindung von Vsr an Heteroduplex-DNA durch MutL gezeigt werden (Drotschmann, 1998). Schließlich besteht die Möglichkeit, daß Vsr.Bst durch MutS und MutL weder *in vitro* noch *in vivo* stimuliert wird. Um dies zu zeigen, müssen die oben angesprochenen Alternativen überprüft werden.

### 4.13 ‚Alignment‘ Vsr-Homologer, Betrachtungen zur Struktur von Vsr.Bst

In Abbildung 36 ist ein ‚alignment‘ aller Vsr-Homologen gezeigt, welche zur Zeit bei einer Suche in den Datenbanken komplett oder teilweise sequenzierter Organismen unter Verwendung des ‚blastn‘-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) gefunden werden. Die Sequenzen der zur Zeit in Sequenzierung befindlichen Organismen sind dabei teilweise nicht statistisch abgesichert und sind eventuell noch fehlerbehaftet. Die Struktur des um 20 Aminosäuren N-terminal verkürzten Vsr aus *Escherichia coli* sowie ein Alanin-‚scanning‘ konservierter Positionen (Tsutakawa *et al.*, 1999a) zeigten die Ähnlichkeit der Faltung von Vsr mit Typ II Restriktionsendonukleasen auf. Vsr weist eine Ein-Domänen-Faltung mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt auf, welches von drei  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die Struktur ist geprägt von einem Zinkatom, welches mit den Aminosäuren Cystein-66, Histidin-71, Cystein-73 sowie Cystein 117 koordiniert vorliegt. Ein konserviertes Aspartat an Position 51 ließ sich mit dem ersten Aspartat des katalytischen Motives von Typ II Restriktionsendonukleasen, DX(6-30)(D/E)XK, superpositionieren und ein Austausch gegen Alanin in Vsr führte zu einer katalytisch inaktiven Variante, welche noch Substrat binden konnte. Als an der Katalyse beteiligte Aminosäuren konnten weiterhin Glutamat-25, Histidin-69 und Aspartat-97 ausgemacht werden. Die Katalyse ist weiterhin Magnesium-abhängig, dessen genaue Lage jedoch hier nicht bestimmt werden konnte.

			*	*	*	*	+			
<i>Alu</i>	1	~~~~~MDAGQARPQHVP	HPGGSSAEASLRMSA	.ARRRDTAPEL	LRRELFSRGLR	YRV				
<i>Nae</i>	1	MSDKSSRAAARARAHASGTY	PAPLNAGRSRNMQA	.NRRSGTKPEA	ALRSALFKLGYR	YRK				
<i>Sen</i>	1	~~~~~MADVHDKATR	SKNMRAIATR	...IEKRLAGLLSAQGIT	FHT					
<i>Sty</i>	1	~~~~~MADVHDKATR	SKNMRAIATR	...IEKRLAGLLSAQGIT	FHT					
<i>Spa</i>	1	~~~~~MADVHDKATR	SKNMRAIATR	...IEKRLAGLLSAQGIT	FHT					
<i>Eco</i>	1	~~~~~MADVHDKATR	SKNMRAIATR	.TAIEKRLASLLTGQGLA	FRV					
<i>Kpn</i>	1	~~~~~MADVHDKATR	SKNMRAIATR	...IEKRIAALLTGAGFT	FVA					
<i>Ngo2</i>	1	~~~~~MTDIFTPSKRSFVMSK	IHSKE...PEVLVRKFLFSQ	GFR	YRK					
<i>Nme</i>	1	~~~~~MTDIFTPSKRSFVMSK	IHSKE...PEVLVRKFLFSQ	GFR	YRK					
<i>Det</i>	1	~~~~~MADRLSPAQR	SKVMSSIKGKD...AELAVRR	FLFRQGLR	YRT					
<i>Sme</i>	1	~~~~~MVDTLSPAQR	SERMSRIRNS...TEMALRRALHRL	GFR	FRV					
<i>Dvu</i>	1	~~~~~MADVDSATR	SRMMSGIKGRN.TKPERL	VR...YSAAGFR	FRL					
<i>Lpn</i>	1	~~~~~DMI	SKKQRSHIMSSIKGKN.TKPEI	IVR...FSRQGLR	FRL					
<i>Rsp1</i>	1	~~~~~MADTRSPEQR	RQIMRAVGTKN.TGP	ELIVRSLL...AHYR	YRL					
<i>Xor</i>	1	~~~~~MTDRLSPERR	RYLMQOVRSKN.TRPEKA	VRSLHLSIA	YRFR					
<i>Ccr</i>	1	~~~~~LSDYDKAKR	SAVMARVRSQD.TGP	...LERRLLTGLG	ARYL					
<i>Hpa</i>	1	~~~~~MDKLTPEQR	KKCMKASSKNKGTKPELLLAKYL	WALGLR	YRK					
<i>Ngo1</i>	1	~~~~~DKLTPEQR	KKCMQS...NKSTGPEL	VLAKAMWALGLR	YRK					
<i>Bst</i>	1	~~~~~MADVLTPEQR	RKNMQAT...RSVSKLEEK	TAKELWKR	GIRFR					
<i>Bsu</i>	1	~~~~~MDKMSKES	RNVKSI...KSVS	QLENL	VASALWNR	GYRFR				





Der Mechanismus der Erkennung von T/G-Fehlpaarungen konnte durch Kokristallisation des nativen Vsr aus *Escherichia coli* mit einem gebundenen 12meren DNA-Produkt und anschließende Aufklärung der Struktur beschrieben werden (Tsutakawa *et al.*, 1999b). Vsr bindet sein Substrat unter Interkalieren dreier aromatischer Seitenketten in der ‚major groove‘ auf der 3‘-Seite des fehlgepaarten Thymins durch Phenylalanin-67, Tryptophan-68 und Tryptophan-86. Diese sind in der Familie der Vsr-Homologen streng konserviert. Ein Interkalieren von 1 bis 4 Aminosäuren bei der Bindung von DNA unter einer Verbiegung von bis zu 70° wurde bei einer Reihe von Proteinen beobachtet, wurde aber bis dato nur von der Seite der ‚minor groove‘ aus beobachtet (Dickerson, 1998). Die Bindung durch Vsr verändert die geometrischen Parameter der DNA: Es kommt es zu einem Verbiegen der DNA um etwa 44°, der Abstand zum benachbarten Basenpaar erhöht sich um etwa 6 Å, Die DNA wird im Bereich der Fehlpaarung signifikant entwunden. Von der Seite der ‚minor groove‘ wird die DNA von einer N-terminalen  $\alpha$ -Helix, speziell dem streng konservierten Methionin-14 und weiterhin Isoleucin-17, kontaktiert. Die Bindung des Proteins wird durch ein Netzwerk von direkten und Wasser-vermittelten Kontakten unterstützt. Die Oberfläche des Proteins ist, auch in Bezug auf Ladung im Bereich des Phosphatrückgrades, exakt an die Bindung der DNA angepaßt. Etwa 20 % der gesamten Proteinoberfläche ist von der gebundenen DNA verdeckt. Die Mehrzahl der Interaktionen finden sich zum Phosphatrückgrat sowie den Basen in Nachbarschaft der Fehlpaarung. Die direkte Kontaktierung der Basen der T/G-Fehlpaarung selbst ist dabei nicht der entscheidende Faktor der Erkennung. Das Guanin wird von Methionin-14 auf Seite der ‚minor groove‘ sowie Lysin-89 auf Seite der ‚major groove‘ über Wasserstoffbrücken kontaktiert. Das Thymin wird lediglich auf der Seite der ‚major groove‘ von Asparagin-93 kontaktiert. Die Diskriminierung gegenüber einem Cytosin erfolgt hier sterisch: Auf der Seite der ‚minor groove‘ liegt Tyrosin-19 derart, daß das Cytosin einer Watson-Crick-Paarung mit Guanin an dieser Position ausgeschlossen wird. Die Oberfläche des Proteins läßt hier lediglich eine klassische T/G-‚wobble‘-Paarung zu, wie sie in der vorliegenden Struktur beobachtet wird. So scheint auch die Erkennung der T/G-Fehlpaarung im Wesentlichen eine Erkennung der Geometrie deren Struktur auf DNA-Ebene wiederzuspiegeln. Die ‚wobble‘-Basenpaarung erhöht den Abstand zum benachbarten Basenpaar 3‘ des fehlgepaarten Thymins und unterbricht die Stapelung der Basen (Hunter *et al.*, 1986, 1987). An dieser Stelle interkalieren die drei

aromatischen Seitenketten von Vsr. Diese Form der Erkennung steht im Einklang mit dem in der Einleitung vorgestellten Modell der Stimulation der Vsp-Reparatur durch MutS und MutL. Nach Erkennung der Fehlpaarung durch MutS und MutL kommt es zur Ausbildung einer DNA-Schleife und somit zu einer weiteren Verzerrung der Basenpaarstapelung kommen. Dies würde dann die Erkennung und Bindung durch Vsr unterstützen.



ABBILDUNG 37: Modell der Struktur von Vsr.Bst in Deckung mit der Struktur des Vsr aus *Escherichia coli* mit gebundenem DNA-Produkt. Die DNA wurde zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Pfeile markieren die Abweichungen der Hauptkettenverläufe.  $\alpha$ -Helices in grün,  $\beta$ -Faltblatt in cyan, Schleifen in rot. Das strukturelle Zinkatom ist violett dargestellt, die Magnesiumionen in orange, die Seitenkette des koordinierenden Aspartat-51 als raumfüllende Atome (Sauerstoffatome rot).

Die Struktur der Vsr-Endonuklease mit ihrem gebundenen Substrat wurde herangezogen, um mit Hilfe des Programmes ‚Swiss-Model‘ (Guex und Peitsch, 1997; Guex und Peitsch, 1999; Guex *et al.*, 1999) zu untersuchen, inwieweit sich diese für eine Modellierung der Struktur von Vsr.Bst eignet. Das errechnete und nach Abgleichen des automatisch erzeugten ‚alignments‘ manuell korrigierte Strukturmodell konnte mit der Struktur des Proteins aus *Escherichia coli* gut zur

Deckung gebracht werden. Eine Überprüfung der Eigenschaften der Modellstruktur mit dem Programm ‚WhatIf‘ (Vriend, 1990; Hooft, 1996) zeigte dabei einige Abweichungen von strukturellen Parametern, wie der Länge von Atombindungen, den erlaubten Bindungswinkeln der Seitenketten, auf. Dies sind klare Hinweise darauf, daß das erzeugte Modell weiterer Verfeinerungen bedarf und nicht überinterpretiert werden sollte. Auffällig ist jedoch, daß der Hauptkettenverlauf der beiden Homologen im Zuge der Berechnungen sehr gut zur Deckung gebracht wurde.

Es gibt nur zwei Bereiche, in denen der Hauptkettenverlauf sich unterscheidet (siehe Abbildung 37). Diese Bereiche erstrecken sich von den Aminosäuren 18 bis 21 und 71 bis 73 aus *Vsr.Bst*. Diese beiden Bereiche kontaktieren in der Struktur des *Escherichia coli*-Vsr die gebundene DNA von der Seite der ‚minor groove‘ (18 bis 21) und ‚major groove‘ (71 bis 73). In letzterem Bereich wird die größte Konservierung unter den Vsr-Homologen beobachtet, dieser wurde bei der Definition der degenerierten Primersätze (Abschnitte 4.1, 4.2) herangezogen. In diesem Bereich finden sich viele der zur Bindung und Katalyse essentiellen Aminosäuren wieder (Abbildung 36). Aus dieser Modellierung läßt sich ableiten, daß im Falle des *Vsr.Bst* im Bereich der Bindung der DNA eine vom Homologen aus *Escherichia coli* verschiedene lokale Struktur möglich ist. Dies passt zu der in der Struktur des *Escherichia coli*-Vsr beobachteten Bindung der DNA, bei welcher sich im Bereich der Erkennungssequenz des Proteins ein Netzwerk von Wechselwirkungen findet. Diese Erkennung der Sequenz der die Fehlpaarung umgebenden Basenpaare erforderte bei *Vsr.Bst* innerhalb eines ansonsten weitgehend identischen Faltungsmotives eine leicht abweichende Struktur im unmittelbaren Bereich des katalytischen Zentrums.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe ausgehend von nur einer konservierten Aminosäureregion einer Proteinfamilie mittels PCR Fragmente unbekannter Gene isoliert werden können, die für diesen Block codierende Sequenzen besitzen. Diese Methode wurde zur Identifizierung eines Gens aus *Bacillus stearothermophilus* H3 angewandt, welches ein Homologes der Vsr-Endonuklease aus *Escherichia coli* kodiert. Vsr-Endonuklease aus *Escherichia coli* initiiert die Reparatur von Schäden an 5-Methylcytosin. Die Desaminierung in dsDNA erzeugt eine T/G-Fehlpaarung, die durch Vsr strangspezifisch 5' des fehlgepaarten Thymins gespalten wird. 5-Methylcytosin wird in *Escherichia coli* durch die Dcm-Methyltransferase an der Position des inneren Cytosins in der Erkennungssequenz  $CC^A/TGG$  eingeführt. T/G-Fehlpaarungen, die innerhalb einer Sequenzumgebung liegen, welche auf Desaminierung an 5-Methylcytosin in diesem Kontext zurückgehen, werden von Vsr bevorzugt.

Das Gen aus *Bacillus stearothermophilus* wurde kloniert, das Genprodukt heterolog in *Escherichia coli* produziert und über eine zusätzlich angefügte C-terminale Hexahistidinsequenz aufgereinigt. Das Protein spaltet T/G-Fehlpaarungen 5' des Thymins. Die Spaltung ist Mismatch- und Strangspezifisch. Das Enzym zeigt damit eine der Vsr-Endonuklease aus *Escherichia coli* vergleichbare Aktivität und wurde als Vsr.Bst bezeichnet. Dies ist die erste Beschreibung einer Aktivität eines Vsr-Homologen.

Das Substratspektrum von Vsr.Bst wurde durch Messung relativer Geschwindigkeitskonstanten in multiplen Substratkinetiken durchgeführt. Die Untersuchung von 15 Substraten zeigte, daß Vsr.Bst im Vergleich mit Vsr aus *Escherichia coli* eine deutlich geringere Präferenz für den Sequenzkontext der T/G-Fehlpaarung aufweist. Vier der fünfzehn Substrate wurden sehr schlecht gespalten. Bei allen vier (und nur bei diesen) befand sich Thymin in direkter Nachbarschaft zu dem fehlgepaarten Thymin. Aus den verbleibenden elf Substraten konnte kein offensichtlicher Konsensus abgeleitet werden.

Vsr.*Bst* spaltet T/G-Fehlpaarungen um den Faktor 2.5 besser als U/G-Fehlpaarungen, welche durch Desaminierung eines Cytosins entstehen können. Vsr.*Bst* scheint also im Wesentlichen für die Reparatur von Desaminierungsschäden am 5-Methylcytosin verantwortlich zu sein.

Um eine Wechselwirkung zwischen Vsr.*Bst* und Enzymen der Mismatch-Reparatur *in vitro* untersuchen zu können, wurden ein MutL- und ein MutS-Homologes aus *Bacillus stearothermophilus* aufgereinigt. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten System konnte keine Stimulierung der Vsr.*Bst*-Aktivität durch MutL und/oder MutS beobachtet werden. Die Möglichkeit einer Steigerung der Vsr.*Bst*-Aktivität durch diese Proteine konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine Aussage hierzu erfordert weitere Untersuchungen.

Vsr.*Bst* konnte 10 Minuten bei 50 °C inkubiert werden, ohne daß ein merklicher Aktivitätsverlust auftrat. Nach 30 Minuten bei 50 °C zeigte Vsr.*Bst* immer noch über 60 % Aktivität. Die beobachtete Stabilität macht das Enzym interessant für diagnostische Methoden, wie beispielsweise der Detektion von punktspezifischen Mutationen.

Die kinetischen Daten von Vsr.*Bst* wurden am Beispiel eines schnell umgesetzten Substrates bestimmt. Mit  $K_M=0.27 \mu\text{M}$ ,  $v_{\text{max}}=0.25 \mu\text{M}/\text{min}^{-1}$  und einer Umsetzung von maximal 2.3 Substratmolekülen pro Minute ist Vsr.*Bst* ein vergleichsweise langsames Enzym. Verglichen mit Vsr aus *Escherichia coli* ist es etwa 14mal schneller. Da *Bacillus stearothermophilus* mit einem Wachstum bei höherer Temperatur auch höheren Desaminierungsraten begegnen muß, mag die Korrelation mit einer ebenfalls erhöhten Aktivität von Vsr.*Bst* kein Zufall sein.

## 6. Literaturliste

**Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R. und Fishel, R.** (1996). hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (24), 13629-34.

**Afeyan, N. B., Gordon, N. F., Mazsaroff, I., Varady, L., Fulton, S. P., Yang, Y. B. und Regnier, F. E.** (1990). Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: perfusion chromatography. *J Chromatogr* **519** (1), 1-29.

**Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B. und Issa, J. P.** (1998). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* **58** (23), 5489-94.

**Alani, E.** (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. *Mol Cell Biol* **16** (10), 5604-15.

**Allen, D. J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P. und Griffith, J. D.** (1997). MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *Embo J* **16** (14), 4467-76.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3), 403-10.

**Au, K. G., Welsh, K. und Modrich, P.** (1992). Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **267** (17), 12142-8.

**Ban, C. und Yang, W.** (1998). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95** (4), 541-52.

**Ban, C. und Yang, W.** (1998). Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *Embo J* **17** (5), 1526-34.

**Ban, C., Junop, M. und Yang, W.** (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* **97** (1), 85-97.

**Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M. und Issa, J. P.** (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* **72** 141-96.

**Bhagwat, A. S., Sohail, A. und Lieb, M.** (1988). A new gene involved in mismatch correction in *Escherichia coli*. *Gene* **74** (1), 155-6.

**Bhagwat, A. S. und McClelland, M.** (1992). DNA mismatch correction by Very Short Patch repair may have altered the abundance of oligonucleotides in the *E. coli* genome. *Nucleic Acids Res* **20** (7), 1663-8.

**Bird, A. P., Taggart, M. H., Nicholls, R. D. und Higgs, D. R.** (1987). Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene. *Embo J* **6** (4), 999-1004.

**Bird, A.** (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell* **70** (1), 5-8.

**Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A. und et al.** (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368** (6468), 258-61.

- Brown, T. C. und Jiricny, J.** (1987). A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell* **50** (6), 945-50.
- Chase, J. W. und Richardson, C. C.** (1974). Exonuclease VII of Escherichia coli. Purification and properties. *J Biol Chem* **249** (14), 4545-52.
- Chevet, E., Lemaitre, G. und Katinka, M. D.** (1995). Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* **23** (16), 3343-4.
- Clarke, L. A., Jordan, P. und Boavida, M. G.** (2000). Cell type specificity in alternative splicing of the human mismatch repair gene hMSH2. *Eur J Hum Genet* **8** (5), 347-52.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69** (8), 2110-4.
- Cooper, D. N. und Krawczak, M.** (1990). The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet* **85** (1), 55-74.
- Cooper, D. L., Lahue, R. S. und Modrich, P.** (1993). Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem* **268** (16), 11823-9.
- Cornish Bowden, A.** (1995). Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press (London), 1. Edition, ISBN 1-85578-072-0.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J. und Gilbert, W.** (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. *Nature* **274** (5673), 775-80.
- Culligan, K. M. und Hays, J. B.** (2000). Arabidopsis MutS homologs-AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a novel AtMSH7- form three distinct protein heterodimers with different specificities for mismatched DNA. *Plant Cell* **12** (6), 991-1002.
- Dao, V. und Modrich, P.** (1998). Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. *J Biol Chem* **273** (15), 9202-7.
- Dar, M. E. und Bhagwat, A. S.** (1993). Mechanism of expression of DNA repair gene vsr, an Escherichia coli gene that overlaps the DNA cytosine methylase gene, dcm. *Mol Microbiol* **9** (4), 823-33.
- Daugherty, B. L., DeMartino, J. A., Law, M. F., Kawka, D. W., Singer, II und Mark, G. E.** (1991). Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins. *Nucleic Acids Res* **19** (9), 2471-6.
- Dickerson, R. E.** (1998). DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality. *Nucleic Acids Res* **26** (8), 1906-26.
- Dimri, G. P., Rudd, K. E., Morgan, M. K., Bayat, H. und Ames, G. F.** (1992). Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in Escherichia coli and phylogenetic distribution among Escherichia coli strains and other enteric bacteria. *J Bacteriol* **174** (14), 4583-93.
- Doerfler, W.** (1991). Patterns of DNA methylation--evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372** (8), 557-64.
- Doiron, K. M., Viau, S., Koutroumanis, M. und Cupples, C. G.** (1996). Overexpression of vsr in Escherichia coli is mutagenic. *J Bacteriol* **178** (14), 4294-6.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. und Mattick, J. S.** (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19** (14), 4008.

- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16** (13), 6127-45.
- Drotschmann, K., Aronshtam, A., Fritz, H. J. und Marinus, M. G.** (1998). The *Escherichia coli* MutL protein stimulates binding of Vsr and MutS to heteroduplex DNA. *Nucleic Acids Res* **26** (4), 948-53.
- Drummond, J. T., Li, G. M., Longley, M. J. und Modrich, P.** (1995). Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells [see comments]. *Science* **268** (5219), 1909-12.
- Dzidic, S. und Radman, M.** (1989). Genetic requirements for hyper-recombination by very short patch mismatch repair: involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Mol Gen Genet* **217** (2-3), 254-6.
- Ehrlich, M., Zhang, X. Y. und Inamdar, N. M.** (1990). Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat Res* **238** (3), 277-86.
- Eigen, M.** (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58** (10), 465-523.
- Eigen, M.** (1971). Molecular self-organization and the early stages of evolution. *Q Rev Biophys* **4** (2), 149-212.
- Eigen, M.** (1987). New concepts for dealing with the evolution of nucleic acids. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52** 307-20.
- Esteller, M., Catusus, L., Matias-Guiu, X., Mutter, G. L., Prat, J., Baylin, S. B. und Herman, J. G.** (1999). hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis [see comments]. *Am J Pathol* **155** (5), 1767-72.
- Fang, W. H., Li, G. M., Longley, M., Holmes, J., Thilly, W. und Modrich, P.** (1993). Mismatch repair and genetic stability in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58** 597-603.
- Farooqui, A. A.** (1980). Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography. *J Chromatogr* **184** (3), 335-45.
- Fishel, R., Ewel, A. und Lescoe, M. K.** (1994). Purified human MSH2 protein binds to DNA containing mismatched nucleotides. *Cancer Res* **54** (21), 5539-42.
- Flores-Rozas, H. und Kolodner, R. D.** (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (21), 12404-9.
- Flores-Rozas, H., Clark, D. und Kolodner, R. D.** (2000). Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex [In Process Citation]. *Nat Genet* **26** (3), 375-8.
- Fondufe, Y. N.** (2000). Characterization and directed modification of the substrate selectivity of Mig.Mth, a DNA repair glycosylase from the thermophilic archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* THF. Cuvillier Verlag (Göttingen), ISBN 3-89712-969-8.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A. und Shaw, B. R.** (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* **29** (10), 2532-7.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A. und Shaw, B. R.** (1993). Cytosine deamination in mismatched base pairs. *Biochemistry* **32** (26), 6523-30.



- Friedberg, E. C.** (1985). Nucleotide excision repair of DNA in eukaryotes: comparisons between human cells and yeast. *Cancer Surv* **4** (3), 529-55.
- Fujii, H., Biel, M. A., Zhou, W., Weitzman, S. A., Baylin, S. B. und Gabrielson, E.** (1998). Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* **16** (16), 2159-64.
- Gallinari, P. und Jiricny, J.** (1996). A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. *Nature* **383** (6602), 735-8.
- Genschel, J., Littman, S. J., Drummond, J. T. und Modrich, P.** (1998). Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha [published erratum appears in *J Biol Chem* 1998 Oct 9;273(41):27034]. *J Biol Chem* **273** (31), 19895-901.
- Glasner, W., Merkl, R., Schmidt, S., Cech, D. und Fritz, H. J.** (1992). Fast quantitative assay of sequence-specific endonuclease activity based on DNA sequencer technology. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373** (12), 1223-5.
- Glasner, W., Merkl, R., Schellenberger, V. und Fritz, H. J.** (1995). Substrate preferences of Vsr DNA mismatch endonuclease and their consequences for the evolution of the Escherichia coli K-12 genome. *J Mol Biol* **245** (1), 1-7.
- Grilley, M., Griffith, J. und Modrich, P.** (1993). Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **268** (16), 11830-7.
- Gruenwald, I. und Lurie, A.** (1989). [Interstitial cystitis]. *Harefuah* **116** (9), 473-6.
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H. und Li, G. M.** (1998). ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res* **26** (5), 1173-8.
- Haber, L. T. und Walker, G. C.** (1991). Altering the conserved nucleotide binding motif in the Salmonella typhimurium MutS mismatch repair protein affects both its ATPase and mismatch binding activities. *Embo J* **10** (9), 2707-15.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. und Prakash, S.** (1997). Enhancement of MSH2-MSH3-mediated mismatch recognition by the yeast MLH1-PMS1 complex. *Curr Biol* **7** (10), 790-3.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166** (4), 557-80.
- Hanck, T., Schmidt, S. und Fritz, H. J.** (1993). Sequence-specific and mechanism-based crosslinking of Dcm DNA cytosine- C5 methyltransferase of E. coli K-12 to synthetic oligonucleotides containing 5-fluoro-2'-deoxycytidine. *Nucleic Acids Res* **21** (2), 303-9.
- Hangaishi, A., Ogawa, S., Mitani, K., Hosoya, N., Chiba, S., Yazaki, Y. und Hirai, H.** (1997). Mutations and loss of expression of a mismatch repair gene, hMLH1, in leukemia and lymphoma cell lines. *Blood* **89** (5), 1740-7.
- Hendrich, B. und Bird, A.** (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18** (11), 6538-47.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H. H., Jiricny, J. und Bird, A.** (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites [published erratum appears in *Nature* 2000 Mar 30;404(6777):525]. *Nature* **401** (6750), 301-4.
- Hengen, P. N.** (1997). Shearing DNA for genomic library construction. *Trends Biochem Sci* **22** (7), 273-4.

- Hennecke, F., Kolmar, H., Brundl, K. und Fritz, H. J.** (1991). The vsr gene product of *E. coli* K-12 is a strand- and sequence-specific DNA mismatch endonuclease. *Nature* **353** (6346), 776-8.
- Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. P., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A. und Baylin, S. B.** (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (12), 6870-5.
- Hollingsworth, N. M., Ponte, L. und Halsey, C.** (1995). MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev* **9** (14), 1728-39.
- Horst, J.-P.** (1996). Gentechnische Produktion und Charakterisierung von Mig.Mth, einem Enzym zur Reparatur hydrolytischer Schäden an DNA 5-Methylcytosinresten im thermophilen Archäon *Methanobacterium thermoautotrophicum* THF. Cuvillier Verlag (Göttingen), ISBN 3-89588-789-7.
- Horst, J. P. und Fritz, H. J.** (1996). Counteracting the mutagenic effect of hydrolytic deamination of DNA 5-methylcytosine residues at high temperature: DNA mismatch N-glycosylase Mig.Mth of the thermophilic archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* THF. *Embo J* **15** (19), 5459-69.
- Horton, R. M., Ho, S. N., Pullen, J. K., Hunt, H. D., Cai, Z. und Pease, L. R.** (1993). Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol* **217** 270-9.
- Hughes, M. J. und Jiricny, J.** (1992). The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. *J Biol Chem* **267** (33), 23876-82.
- Hunter, W. N., Kneale, G., Brown, T., Rabinovich, D. und Kennard, O.** (1986). Refined crystal structure of an octanucleotide duplex with G . T mismatched base-pairs. *J Mol Biol* **190** (4), 605-18.
- Hunter, W. N., Brown, T., Kneale, G., Anand, N. N., Rabinovich, D. und Kennard, O.** (1987). The structure of guanosine-thymidine mismatches in B-DNA at 2.5-Å resolution. *J Biol Chem* **262** (21), 9962-70.
- Impellizzeri, K. J., Anderson, B. und Burgers, P. M.** (1991). The spectrum of spontaneous mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* uracil-DNA-glycosylase mutant limits the function of this enzyme to cytosine deamination repair. *J Bacteriol* **173** (21), 6807-10.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96** (1), 23-8.
- Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E. und Baylin, S. B.** (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* **7** (4), 536-40.
- Jiricny, J., Su, S. S., Wood, S. G. und Modrich, P.** (1988). Mismatch-containing oligonucleotide duplexes bound by the *E. coli* mutS- encoded protein. *Nucleic Acids Res* **16** (16), 7843-53.
- Jiricny, J., Hughes, M., Corman, N. und Rudkin, B. B.** (1988). A human 200-kDa protein binds selectively to DNA fragments containing G.T mismatches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (23), 8860-4.
- Jones, M., Wagner, R. und Radman, M.** (1987). Mismatch repair and recombination in *E. coli*. *Cell* **50** (4), 621-6.
- Jones, M., Wagner, R. und Radman, M.** (1987). Mismatch repair of deaminated 5-methyl-cytosine. *J Mol Biol* **194** (1), 155-9.
- Jones, N. J. und Strike, P.** (1996). Recent research in DNA repair, mutation and recombination: a report of the DNA Repair Network meeting, held at City University, London on 18 December 1995. *Mutat Res* **364** (1), 13-23.

- Jones, P. A. und Laird, P. W.** (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* **21** (2), 163-7.
- Kane, M. F., Loda, M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J. M. und Kolodner, R.** (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* **57** (5), 808-11.
- Karran, P.** (1995). Appropriate partners make good matches [comment]. *Science* **268** (5219), 1857-8.
- Kass, S. U., Pruss, D. und Wolffe, A. P.** (1997). How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* **13** (11), 444-9.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J. und Cheng, X.** (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix [see comments]. *Cell* **76** (2), 357-69.
- Kolodner, R. D., Hall, N. R., Lipford, J., Kane, M. F., Morrison, P. T., Finan, P. J., Burn, J., Chapman, P., Earabino, C., Merchant, E. und et al.** (1995). Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for mlh1 mutations. *Cancer Res* **55** (2), 242-8.
- Kramer, B., Kramer, W. und Fritz, H. J.** (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38** (3), 879-87.
- Kramer, B., Kramer, W., Williamson, M. S. und Fogel, S.** (1989). Heteroduplex DNA correction in *Saccharomyces cerevisiae* is mismatch specific and requires functional PMS genes. *Mol Cell Biol* **9** (10), 4432-40.
- Kunkel, T. A., Silber, J. R. und Loeb, L. A.** (1982). The mutagenic effect of deoxynucleotide substrate imbalances during DNA synthesis with mammalian DNA polymerases. *Mutat Res* **94** (2), 413-9.
- Kunkel, T. A. und Bebenek, K.** (1988). Recent studies of the fidelity of DNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* **951** (1), 1-15.
- Kunkel, T. A.** (1992). DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **267** (26), 18251-4.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259), 680-5.
- Laging, M., Fartmann, B. und Kramer, W.** (2000). Isolation of segments of homologous genes with only one conserved amino acid region via PCR. *Nucleic Acids Res.* **15**;29(2):E8.
- Lahue, R. S., Au, K. G. und Modrich, P.** (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science* **245** (4914), 160-4.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M. und Stankova, J.** (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem* **219** (1), 164.
- Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M. und et al.** (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75** (6), 1215-25.
- Li, L., Bales, E. S., Peterson, C. A. und Legerski, R. J.** (1993). Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group C. *Nat Genet* **5** (4), 413-7.
- Li, G. M. und Modrich, P.** (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (6), 1950-4.

- Lieb, M.** (1981). A fine structure map of spontaneous and induced mutations in the lambda repressor gene, including insertions of IS elements. *Mol Gen Genet* **184** (3), 364-71.
- Lieb, M.** (1983). Specific mismatch correction in bacteriophage lambda crosses by very short patch repair. *Mol Gen Genet* **191** (1), 118-25.
- Lieb, M.** (1985). Recombination in the lambda repressor gene: evidence that very short patch (VSP) mismatch correction restores a specific sequence. *Mol Gen Genet* **199** (3), 465-70.
- Lieb, M., Allen, E. und Read, D.** (1986). Very short patch mismatch repair in phage lambda: repair sites and length of repair tracts. *Genetics* **114** (4), 1041-60.
- Lieb, M.** (1987). Bacterial genes mutL, mutS, and dcm participate in repair of mismatches at 5-methylcytosine sites. *J Bacteriol* **169** (11), 5241-6.
- Lieb, M. und Rehmat, S.** (1995). Very short patch repair of T:G mismatches in vivo: importance of context and accessory proteins [published erratum appears in J Bacteriol 1995 May;177(9):2606]. *J Bacteriol* **177** (3), 660-6.
- Lieb, M. und Bhagwat, A. S.** (1996). Very short patch repair: reducing the cost of cytosine methylation. *Mol Microbiol* **20** (3), 467-73.
- Lindahl, T. und Nyberg, B.** (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11** (19), 3610-8.
- Lindahl, T. und Nyberg, B.** (1974). Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **13** (16), 3405-10.
- Lindahl, T.** (1974). An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71** (9), 3649-53.
- Lindahl, T., Ljungquist, S., Siegert, W., Nyberg, B. und Sperens, B.** (1977). DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from Escherichia coli. *J Biol Chem* **252** (10), 3286-94.
- Lindahl, T.** (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA [see comments]. *Nature* **362** (6422), 709-15.
- Liu, B., Parsons, R. E., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., Lynch, H. T., Watson, P., Markowitz, S., Willson, J. K., Green, J., de la Chapelle, A. und et al.** (1994). hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* **54** (17), 4590-4.
- Loeb, L. A. und Kunkel, T. A.** (1982). Fidelity of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **51** 429-57.
- Lovett, S. T. und Kolodner, R. D.** (1989). Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the recJ gene of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (8), 2627-31.
- Luhr, B., Scheller, J., Meyer, P. und Kramer, W.** (1998). Analysis of in vivo correction of defined mismatches in the DNA mismatch repair mutants msh2, msh3 and msh6 of Saccharomyces cerevisiae. *Mol Gen Genet* **257** (3), 362-7.
- Lutsenko, E. und Bhagwat, A. S.** (1999). Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res* **437** (1), 11-20.
- Macintyre, G., Doiron, K. M. und Cupples, C. G.** (1997). The Vsr endonuclease of Escherichia coli: an efficient DNA repair enzyme and a potent mutagen. *J Bacteriol* **179** (19), 6048-52.
- Marinus, M. G. und Morris, N. R.** (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **114** (3), 1143-50.

- Marinus, M. G.** (1973). Location of DNA methylation genes on the Escherichia coli K-12 genetic map. *Mol Gen Genet* **127** (1), 47-55.
- Marinus, M. G.** (1976). Adenine methylation of Okazaki fragments in Escherichia coli. *J Bacteriol* **128** (3), 853-4.
- Marra, G., Iaccarino, I., Lettieri, T., Roscilli, G., Delmastro, P. und Jiricny, J.** (1998). Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (15), 8568-73.
- Marsischky, G. T., Filosi, N., Kane, M. F. und Kolodner, R.** (1996). Redundancy of Saccharomyces cerevisiae MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* **10** (4), 407-20.
- Merkel, R., Kroger, M., Rice, P. und Fritz, H. J.** (1992). Statistical evaluation and biological interpretation of non-random abundance in the E. coli K-12 genome of tetra- and pentanucleotide sequences related to VSP DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Res* **20** (7), 1657-62.
- Michaels, M. L., Tchou, J., Grollman, A. P. und Miller, J. H.** (1992). A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* **31** (45), 10964-8.
- Modrich, P.** (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* **25** 229-53.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155** 335-50.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. und Bird, A.** (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex [see comments]. *Nature* **393** (6683), 386-9.
- Neddermann, P. und Jiricny, J.** (1993). The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells. *J Biol Chem* **268** (28), 21218-24.
- Neddermann, P. und Jiricny, J.** (1994). Efficient removal of uracil from G.U mispairs by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (5), 1642-6.
- Nicolaidis, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y. F., Carter, K. C., Ruben, S. M., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M. und et al.** (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* **371** (6492), 75-80.
- Nolling, J., van Eeden, F. J., Eggen, R. I. und de Vos, W. M.** (1992). Modular organization of related Archaeal plasmids encoding different restriction-modification systems in Methanobacterium thermoformicum. *Nucleic Acids Res* **20** (24), 6501-7.
- Ochman, H., Gerber, A. S. und Hartl, D. L.** (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120** (3), 621-3.
- Orimo, H., Nakajima, E., Yamamoto, M., Ikejima, M., Emi, M. und Shimada, T.** (2000). Association between single nucleotide polymorphisms in the hMSH3 gene and sporadic colon cancer with microsatellite instability. *J Hum Genet* **45** (4), 228-30.
- Pace, T., Ponzi, M., Scotti, R. und Frontali, C.** (1995). Structure and superstructure of Plasmodium falciparum subtelomeric regions. *Mol Biochem Parasitol* **69** (2), 257-68.
- Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T. und Jiricny, J.** (1996). hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* **6** (9), 1181-4.

- Pang, Q., Prolla, T. A. und Liskay, R. M.** (1997). Functional domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1p and Pms1p DNA mismatch repair proteins and their relevance to human hereditary nonpolyposis colorectal cancer-associated mutations. *Mol Cell Biol* **17** (8), 4465-73.
- Panning, B. und Jaenisch, R.** (1996). DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* **10** (16), 1991-2002.
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D. und et al.** (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer [see comments]. *Science* **263** (5153), 1625-9.
- Parikh, S. S., Mol, C. D., Slupphaug, G., Bharati, S., Krokan, H. E. und Tainer, J. A.** (1998). Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA. *Embo J* **17** (17), 5214-26.
- Parker, B. O. und Marinus, M. G.** (1992). Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (5), 1730-4.
- Pitha, P. M., Huang, W. M. und Ts'o, P. O.** (1968). Physicochemical basis of the recognition process in nucleic acid interactions, IV. Costacking as the cause of mispairing and intercalation in nucleic acid interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61** (1), 332-9.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258** (5536), 598-9.
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. und Pearl, L. H.** (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90** (1), 65-75.
- Prolla, T. A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R. D. und Liskay, R. M.** (1994). MLH1, PMS1, and MSH2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast. *Science* **265** (5175), 1091-3.
- Radman, H. M.** (1981). Metastatic melanoma of the vulva. *Md State Med J* **30** (10), 60-1.
- Reenan, R. A. und Kolodner, R. D.** (1992). Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics* **132** (4), 963-73.
- Riggs, A. D. und Jones, P. A.** (1983). 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res* **40** 1-30.
- Ross-Macdonald, P. und Roeder, G. S.** (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* **79** (6), 1069-80.
- Ruiz, S. M., Letourneau, S. und Cupples, C. G.** (1993). Isolation and characterization of an *Escherichia coli* strain with a high frequency of C-to-T mutations at 5-methylcytosines. *J Bacteriol* **175** (16), 4985-9.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** (4839), 487-91.
- Sancar, A. und Hearst, J. E.** (1993). Molecular matchmakers. *Science* **259** (5100), 1415-20.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12), 5463-7.
- Sauer, R. T.** (1978). DNA sequence of the bacteriophage gamma cI gene. *Nature* **276** (5685), 301-2.

- Schellenberger, V., Tegge, W., Kloppel, K. D. und Frank, R.** (1992). Proteinase-catalyzed conversion of a substance P-precursor peptide. *Int J Pept Protein Res* **39** (5), 472-6.
- Schmutte, C., Yang, A. S., Nguyen, T. T., Beart, R. W. und Jones, P. A.** (1996). Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res* **56** (10), 2375-81.
- Schumann, J., Walter, J., Willert, J., Wild, C., Koch, D. und Trautner, T. A.** M.BssHIII, a multispecific cytosine-C5-DNA-methyltransferase with unusual target recognizing properties.
- Shapiro, L. J. und Mohandas, T.** (1983). DNA methylation and the control of gene expression on the human X chromosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47** (Pt 2), 631-7.
- Shen, W., Kamendulis, L. M., Ray, S. D. und Corcoran, G. B.** (1992). Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* **112** (1), 32-40.
- Shen, H. M. und Zhang, Q. F.** (1994). Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 1** 275-82.
- Smith, G. R.** (1994). Hotspots of homologous recombination. *Experientia* **50** (3), 234-41.
- Sohail, A., Lieb, M., Dar, M. und Bhagwat, A. S.** (1990). A gene required for very short patch repair in *Escherichia coli* is adjacent to the DNA cytosine methylase gene. *J Bacteriol* **172** (8), 4214-21.
- Stebbins, M. A., Schar, C. R., Peterson, C. B. und Sepaniak, M. J.** (1997). Temporal analysis of DNA restriction digests by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **697** (1-2), 181-8.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189** (1), 113-30.
- Su, S. S. und Modrich, P.** (1986). *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83** (14), 5057-61.
- Su, S. S., Lahue, R. S., Au, K. G. und Modrich, P.** (1988). Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro [published erratum appears in *J Biol Chem* 1988 Aug 5;263(22):11015]. *J Biol Chem* **263** (14), 6829-35.
- Su, S. S., Grilley, M., Thresher, R., Griffith, J. und Modrich, P.** (1989). Gap formation is associated with methyl-directed mismatch correction under conditions of restricted DNA synthesis. *Genome* **31** (1), 104-11.
- Sved, J. und Bird, A.** (1990). The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (12), 4692-6.
- Szyf, M., Meisels, E. und Razin, A.** (1986). Biological role of DNA methylation: sequence-specific single-strand breaks associated with hypomethylation of GATC sites in *Escherichia coli* DNA. *J Bacteriol* **168** (3), 1487-90.
- Tabor, S. und Richardson, C. C.** (1995). A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (14), 6339-43.
- Toyota, M. und Issa, J. P.** (1999). CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* **9** (5), 349-57.
- Triglia, T., Peterson, M. G. und Kemp, D. J.** (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* **16** (16), 8186.

- Tsutakawa, S. E., Jingami, H. und Morikawa, K.** (1999). Recognition of a TG mismatch: the crystal structure of very short patch repair endonuclease in complex with a DNA duplex. *Cell* **99** (6), 615-23.
- Tsutakawa, S. E., Muto, T., Kawate, T., Jingami, H., Kunishima, N., Ariyoshi, M., Kohda, D., Nakagawa, M. und Morikawa, K.** (1999). Crystallographic and functional studies of very short patch repair endonuclease. *Mol Cell* **3** (5), 621-8.
- Umar, A., Buermeyer, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M. und Kunkel, T. A.** (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87** (1), 65-73.
- Vanyushin, B. F., Belozersky, A. N., Kokurina, N. A. und Kadirova, D. X.** (1968). 5-methylcytosine and 6-methylamino-purine in bacterial DNA. *Nature* **218** (146), 1066-7.
- Vieira, J. und Messing, J.** (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19** (3), 259-68.
- Waters, T. R. und Swann, P. F.** (2000). Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites. *Mutat Res* **462** (2-3), 137-47.
- Welsh, K. M., Lu, A. L., Clark, S. und Modrich, P.** (1987). Isolation and characterization of the Escherichia coli mutH gene product. *J Biol Chem* **262** (32), 15624-9.
- Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A. und Dodson, G.** (1991). Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351** (6328), 624-9.
- Wong, R. S. und Passaro, E., Jr.** (1990). DNA technology. *Am J Surg* **159** (6), 610-4.
- Wyszynski, M., Gabbara, S. und Bhagwat, A. S.** (1994). Cytosine deaminations catalyzed by DNA cytosine methyltransferases are unlikely to be the major cause of mutational hot spots at sites of cytosine methylation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (4), 1574-8.
- Yamaguchi, M., Dao, V. und Modrich, P.** (1998). MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J Biol Chem* **273** (15), 9197-201.
- Yang, A. S., Shen, J. C., Zingg, J. M., Mi, S. und Jones, P. A.** (1995). HhaI and HpaII DNA methyltransferases bind DNA mismatches, methylate uracil and block DNA repair. *Nucleic Acids Res* **23** (8), 1380-7.
- Yon, J. und Fried, M.** (1989). Precise gene fusion by PCR. *Nucleic Acids Res* **17** (12), 4895.
- Zell, R. und Fritz, H. J.** (1987). DNA mismatch-repair in Escherichia coli counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *Embo J* **6** (6), 1809-15.



## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A.L.F.	<i>Automated Laser Fluorescent Sequencer</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-phosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (p-Toluidinsalz)
<i>bla</i>	Gen der $\beta$ -Lactamase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
<i>cat</i>	Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
Dcm	DNA-Cytosin-Methyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	2'-Desoxyribonukleosid-5'-trisphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure
IMAC	<i>Immobilized Metall Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
l	Liter
<i>lac</i>	Gen der $\beta$ -Galactosidase
M	molar
$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )
min	Minuten
ml	Milliliter
$M_r$	relatives Molekulargewicht
n	nano ( $10^{-9}$ )
NBT	Nitroblau-tetrazolium
$\text{OD}_x$	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung
p	pico ( $10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	" <i>polymerase chain reaction</i> " (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
rpm	" <i>rounds per minute</i> " (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Sodium-(Natrium-)dodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymin
t	Zeit
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
u	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
U	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
VSP	" <i>very short patch</i> "
<i>vsr</i>	Gen für die Vsr-Endonuklease
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
W	Watt
<i>x-gal</i>	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
8-oxo-G	7,8-dihydro-8-Oxoguanin

## 7.2 Nukleotidsequenz von MutS und MutL aus *Bacillus stearothermophilus*

Gezeigt ist die Sequenz eines 5298 bp-Fragmentes der chromosomalen DNA von *Bacillus stearothermophilus*. MutS wird von den Basen 167 bis 2743 kodiert, MutL von den Basen 2765 bis 4894.

```

1 .GCCGGCAAACAGCGATCTGAGGAAGGTATGGTGCCATTACGTCGGCAAAGCATAATCGC 60
61 CAGGATGAGCGCGATCTCTTGCAGCCATGCACGGGAAAGGTTCAACATACGGCTTTCCC 120
121 CGTGTATAATGGACGAACGAGAATGAAGCTAGGAGATAGGTTACAATGGCACAATATAC 180
                                     M A Q Y T
181 ACCGATGATTCAGCAGTATCTGGCGATCAAGCGTGACTATCCGGATACTTTCTTATTTTT 240
      P M I Q Q Y L A I K R D Y P D T F L F F
241 TCGCTTGGGCGATTTTTATGAAGTGTTTTTGAAGACGCAGTCGTGGCATCGCGTGAGCT 300
      R L G D F Y E L F F E D A V V A S R E L
301 GGAAATTACCTTGACAGGGCGCGAGGGCGGCGGAAGAAAAATCCCGATGTGCGGCGT 360
      E I T L T G R E G G G E E K I P M C G V
361 TCCTCATCACTCTGCTGATGCTTATATTGCCGAATTGCTGAAAAAAGGCTACAAGGTAGC 420
      P H H S A D A Y I A E L L K K G Y K V A
421 CGTCTGTGAACAAGTAGAAGATCCAAAGGAAGCGAAAGGAGTCGTCCGTCGGGAGGTCAC 480
      V C E Q V E D P K E A K G V V R R E V T
481 GAGGGTTATTA TACTCCCGGGACGATGATGGAGGGCAAATGGCTCTCCGACAAGGAAAACAA 540
      R V I T P G T M M E G K W L S D K E N N

```

541 TTACATGGTTGCGATTGCGCAAGCGGAGGGCAGCATGGGTGTCGCCGCTTGTGACATGAG 600  
Y M V A I A Q A E G S M G V A A C D M S

601 TACCGGCGAGATGTACGTAACCTCGCTGATTGGCAGACGAGAGGCAGCGCTGGATGAAGC 660  
T G E M Y V T S L I G R R E A A L D E A

661 GATGCAGTACCACCCAAGGAATTGGTGTATCCGGGTGGGCTGGAGAGCTCAAGTCAGA 720  
M Q Y H P K E L V L S G W A G E L K S D

721 TGTACTGTACATACATAGAGGACACTGAGCTGGACGGGCTTGCCGTCGACCGCAATA 780  
V P V T Y I E D T E L D G L A V D R Q Y

781 CGGCAACGACGCACGTGAGCTTGATCTCGCCATGCGCAAGGCAGTCAACACCCTGCTTCA 840  
G N D A R E L D L A M R K A V N T L L H

841 CTATATCGGCGTCACACAAAAGCGAAGCCTGTACACATGTTGTTGATCAAGCGCTATGA 900  
Y I G V T Q K R S L S H M L L I K R Y D

901 TGCCAAGCAGTACCTGCAGATGGACGGCTTTTCCCGCAGAAATCTGGAGCTGACCGAAAC 960  
A K Q Y L Q M D G F S R R N L E L T E T

961 GATACGGGACAAATCGAAGAAAGGCTCGCTGCTCTGGCTTCTGGATCGCACCGAAACAGC 1020  
I R D K S K K G S L L W L L D R T E T A

1021 GATGGGAGGCAGGCTGCTTCGCCGCTGGATTGAACGTCCGCTGGTAAACAAAAGTGAAC 1080  
M G G R L L R R W I E R P L V N K S E L

1081 TGAGGCCCGCTGGATGCCGTTTTGATTTGAAAGGGGACATGCTGCTTCGTTTCAGACTT 1140  
E A R L D A V S Y L K G D M L L R S D L

1141 GAGGAACTGTCTGGATCAAGTGTACGATTTGGAGCGTCTGGCAGGAAGGATCTCTTACGG 1200  
R N C L D Q V Y D L E R L A G R I S Y G

1201 CAATGCGAACGCTCGCGATCTGGTACAGCTTCGTCAATTCGCTGGAACGATACCGATGTT 1260  
N A N A R D L V Q L R H S L E T I P M L

1261 GAAGCGGCTGCTGCTGGAGACAGATGCACCGGTTTTGAAGGAATTGGCTGCGGGAATGGA 1320  
K R L L L E T D A P V L K E L A A G M D

1321 TGAGTGCAGACATCGTCACGTACTTGCAGGCTGCTCTCGTAGACGATCCGCTATTTTC 1380  
E C A D I V T Y L Q A A L V D D P P I S

1381 GGTACGGGAAGGCGGTTTTGATCCGGACCGGTTATGATGAGTATCTGGACAAGCTTCATAC 1440  
V R E G G L I R T G Y D E Y L D K L H T

1441 AGCGAGTTCGCGAGGGCAAGACGTGGATAGCCCAACTGGAGCAGACAGAGCGGGAAGCGAC 1500  
A S R E G K T W I A Q L E Q T E R E A T

1501 CGGGATTCGCTCGTTAAAAGTGGGATACAACAAGGCTTTTGGCTATTACATCGAGGTTTC 1560  
G I R S L K V G Y N K V F G Y Y I E V S

1561 ACGGGCGAATCTGGCTAACGTGCCAGCTGGCCGGTATGAACGAAAGCAAACATTGGCGAA 1620  
R A N L A N V P A G R Y E R K Q T L A N

1621 TGCGGAACGCTTCATCAGCCCGAATTAAGGAAAAGGAAGCGCTGATCCTGGAGGCGGA 1680  
A E R F I T P E L K E K E A L I L E A E

1681 AGAAAAGCTGATCGAGCTGGAGTATCAATTGTTTCGTCAGATTTCGCAATGAGGTAGCGGC 1740  
E K L I E L E Y Q L F V Q I R N E V A A

1741 TCATATCCCGCGCTTGCAGAGCCTTGGCGAGCGGGTGGCAGCGATCGACGTGCTGCAGGC 1800  
H I P R L Q S L A E R V A A I D V L Q A

1801 ATTCGCTACAGTAAGCGACGAACGCGGGTATGTACGTCCGGAGCTGGTCACAACGGGTGA 1860  
F A T V S D E R G Y V R P E L V T T G E

1861 ATGTGTCATTACAGATGGCAGACATCCTGTGGTAGAAGCCGCTCCTCGAACGGGAAAATA 1920  
C V I T D G R H P V V E A V L E R E K Y

1921 CGTCGCCAACGACGTTTCATATGAACCAGACAGATCGGCAGATTCTCCTCATTACCGGTCC 1980  
V A N D V H M N Q T D R Q I L L I T G P

1981 GAATATGGCCGGGAAAAGCACGTACATGCGCAAATGCGCTCTTGGTCGTCATGGCGCA 2040  
N M A G K S T Y M R Q I A L L V V M A Q

2041 AATCGGCTGCTTCGTGCGGCAAAAAGCAGCCCGTTGTCCTTGGTCGATCAGATTTTCAC 2100  
I G C F V P A K A A R L S L V D Q I F T

2101 GCGGATTGGCGCTGCCGACGATCTGGCCTCCGGGCATTCCACGTTTATGGTGAAATGCT 2160  
R I G A A D D L A S G H S T F M V E M L

2161 GGAAACCAGGCACGCTCTGCAAAAAGCAACGGCCCAAAGCTTGATCCTGCTCGATGAGAT 2220  
E T R H A L Q K A T A Q S L I L L D E I

2221 TGGACGAGGCACCTCTACCTATGACGGAATGGCTCTGGCACAGGCGGTAATTGAATACAT 2280  
G R G T S T Y D G M A L A Q A V I E Y I

2281 CAGACAAAAGATCGGTGCCAAAACGTTGTTCTCTACCCATTACCATGAGCTGACAGGTCT 2340  
R Q K I G A K T L F S T H Y H E L T G L

2341 GGAGGAATCGTTGACCGGAGTCGTCAATGTGAACGCAAGATGTGAAGAACGGCCGGAAA 2400  
E E S L T G V V N V N A R C E E R A G K

2401 GCTGTCTTTTTACACAAAATTGAGCCTGGCCGCGCAGACAAAAGCTACGGAATCCACGT 2460  
L L F L H K I E P G R A D K S Y G I H V

2461 CGCAGAGCTGGCCGAGATGCCCCAGCAGGTCATTGAACGTGCACGAGAAAATTTGGCGGG 2520  
A E L A E M P Q Q V I E R A R E I L A G

2521 ATTGGAGTGGCGGGCAGCAGGCGAGGTGATGTGCAAATGCCCTGGAAACGCTCTGGTC 2580  
L E S A G T T A G D V Q M S L E T L W S

2581 TGCTCCAGTGGCTGTGTACCGGAAGAACCAGAAATCCCTGTTGTCCGAGAGAGGAACA 2640  
A P V A A V R E E P K S L L S P E E E Q

2641 GGTGTGTCTGAGCTTCGCGAGCTGGACCTCAATCAGACGACGCGGATGGACGCCATGCT 2700  
V L S E L R E L D L N Q T T P M D A M L

2701 GAAGCTTTTCCATTGGAAACAGCAAATGAAAAAAGCAAGTAAACCAGTTCGAGGAGGAA 2760  
K L F H W K Q Q M K K S K \*

2761 ACCGATGGGGAACATACATGTGCTGGATGACAACCTGGCCAATATGATCGCCGAGGCGA 2820  
M G N I H V L D D N L A N M I A A G E

2821 AGTGGTAGAACGGCCCGCTTCCGTTGTGAAAGAACTGGTGAAAATGCAGTTGATGCAGG 2880  
V V E R P A S V V K E L V E N A V D A G

2881 GGCAAGCACAGTGGAAATCCATGTGGAAGAAGGCGCCTTTCCCTGATCCGTGTAGTCGA 2940  
A S T V E I H V E E G G L S L I R V V D

2941 CAACGGTCAAGGCATGGATCGGGAGGATTGCCGTCTCGCCTTTGAACGCCATGCGACGAG 3000  
N G Q G M D R E D C R L A F E R H A T S

3001 CAAAATACGACGATCCCCGAGATTTGTTCCGAATACGGACGCTTGGCTTTCCGCGAGAGGC 3060  
K I R S P R D L F R I R T L G F R G E A

3061 CTTGCCAGTATCGCGGCGGTTTCCCGGTGGAACGACGAGCACCAATCGAGCGGGCA 3120  
L P S I A A V S R V E L T S T Q S S G Q

3121 GGTAGGGACTCGGTTGATGATGGAGGGTGGAGCGATTGCAAGCATTAGCGAAATCGCAGC 3180  
V G T R L M M E G G A I A S I S E I A A

3181 TGTCAAAGGGACCGAGATCATTTGTCGCGACTTGTTTTACAACACGCCAGCCCGCTCAA 3240  
V K G T E I I V R D L F Y N T P A R L K

3241 GTATATGATATCGATTTCTACGGAGATTGGCCATATTTCCGATTACGTCAACCGTTTAGC 3300  
Y M I S I S T E I G H I S D Y V N R L A

3301 CCTGACATACCCTTCAGTGGCATTACGTTGTCTCATAACGAAAGATTTTGCTGCATAC 3360  
L T Y P S V A F T L S H N G K I L L H T

3361 ATCCGGGGATGGCAAGTTGCTGCACGTAATGGCTGCCATTTACGGTGTTCAGGTAGCCAA 3420  
S G D G K L L H V M A A I Y G V Q V A K

3421 GCTGTGCTGCCGATCAGCGGAGAGACGCTCGATTTCCGGTGGACCGGATTCATTTCCAA 3480  
L L L P I S G E T L D F R W T G F I S K

3481 AACGGAAGTAACCCGGGCAACCGGTCGTATCTGTCTACCCCTGTAAATGGTCGATACGT 3540  
T E V T R A N R S Y L S T L V N G R Y V

3541 ACGCCATTTCCGGTTGAACAACCGGATCATGAGCGGCTATCATAATTGCTTCCGATCGG 3600  
R H F G L N N A I M S G Y H T L L P I G

3601 CCGCTACCCGATCGTCCAGCTCCAGATCGAGATGGACCCGACTTTGCTGGATGTCAATGT 3660  
R Y P I V T L Q I E M D P T L L D V N V

3661 CCATCCAGCAAAGCTGGAGGTTTCGTTTTAGCAAGGAAGACGAGCTGTGCACGGCGATCGA 3720  
H P A K L E V R F S K E D E L C T A I E

3721 GCAATGCGTGAGGTCTACGCTGCGCCAGGGACTGGACATTGTGCGTCCGTTGACAGCAGA 3780  
Q C V R S T L R Q G L D I V R P L T A E

3781 GCGCAAGGCAAGGGTTATCGAGCAGGTGGTACAGCCGAGTTTGATCTGACGTGGTCAAA 3840  
R K A R V I E Q V V Q P Q F D L T W S K

3841 GCCTGCCGGTCAATCGAATGCAGACACTACAAAGCCATTTTCAGGCAGAAATACAGCAGCC 3900  
P A G Q S N A D T T K P F Q A E I Q Q P

3901 GCTTTCCAGTCCCGGCAGCTTCCATCCGAAATACAGGGAGCGAACGAAGAGATGCCGGC 3960  
L S S P G S F H P E I Q G A N E E M P A

3961 CGCTGAAGCGGTGAGCCTCGTTCGGGCGCATGATTGGCCCGTTCAAATACAGAGCAGGC 4020  
A E A V S L V R A H D L A R S N T E Q A

4021 TGTTGATGCCGAAAGCAGAAGCACAACGCTGTAAAAGAGGGCAGAGAGGAATACACAGC 4080  
V D A G K Q K H N A V K E G R E E Y T A

4081 GTGGCAAACGGCGGTATGGCTGCTAATACAGCACTAGCGCCGTTTCTCCGGGGGTGTC 4140  
W Q N G G M A A N T A L A A V S P G V S

4141 CACGGCGACCACAGCAAGTGGGATGATTTTGAAGGACCGACCTGGAAGTTCATCTTCC 4200  
T A T T A S G D D F E R T D L E V H L P

4201 CCGGGATGGATATGAAAAGGTCCCGAAGAACGTGGAGCGGAGAGCAGCTTGGATCCATA 4260  
R D G Y E K G P E E R G A E S S L D P Y

4261 CGGGGAAGATGTAGCTGTTGCGGAGAAAACGGAGACAGTGCAGCAATGTATCCCGTCGG 4320  
G E D V A V A E K T E T V P Q M Y P V G

4321 CCAAGTGCACGGTACGTACATTGTGGCTCAGAATGAGAATGGCATGTATTTGATTGACCA 4380  
Q V H G T Y I V A Q N E N G M Y L I D Q

4381 GCACGCTGCCAGGAACGTATCTTCTATGAGCATTTCATGCAGAAGCTGGCGGAGGAAAG 4440  
H A A Q E R I F Y E H F M Q K L A E E S

4441 TGTCGCAAGTCAGATGCTGTGTTTCCGCATACGGTTGAATTGACTGCCAGGAAGCGTT 4500  
V A S Q M L L F P H T V E L T A Q E A L

4501 GAAGCTGGACAAACGGCTCCCGCTGCTGCGCTCCTTTGGGCTTGAGATTGAGTCCTTCGG 4560  
K L D K R L P L L R S F G L E I E S F G

4561 CACAAAGACGTTTATCGTACGTGCACATCCTCACTGGTTCCCGAAGGAAGCGAGCTGGA 4620  
T K T F I V R A H P H W F P E G S E L E

4621 GGTAATCGAAGAGCTGATCCAATTTGTTCATGGAGGCCAGCGAGGCAGCACAGGCTGATAT 4680  
V I E E L I Q F V M E A S E A A Q A D I

4681 TCGCTCGATGAGGGAGAAGGCAGCGATACTCATGTCTGCAAAGCGTCGATCAAAGCGAA 4740  
R S M R E K A A I L M S C K A S I K A N

4741 TCGTTTCCTGACACACGCGGAGATGGAAAGCCTGCTAAGCCAACCTCGGGAAAGCTCCAG 4800  
R F L T H A E M E S L L S Q L R E S S S

4801 TCCATTACCTGTCCGCATGGCCGCCGATCATCATTCATTTCTCCAGTTATGATTTGGA 4860  
P F T C P H G R P I I I H F S S Y D L E

4861 GAAAATGTTCAAGCGGTTATGTAAGTTTCTAAGTGAAAAAGGGTCAAGGGCTGTCTGCA 4920  
K M F K R V M \*

4921 CAAGCCCTTGACCCTTTTTCATGTAACGGAAGATATGGTCGAATGTTGCGAATCGCAAGTC 4980  
4981 AGGACTCTGCTTTGGTACTTCAATGTACTTCAGCGTATGGCCAGACATATCCACTACCT 5040  
5041 TGAAGCAATAGCCGTCCTCCACGAGCTTGTGCGCGGTCTTGGCAGTGAATGCTTGGAGA 5100  
5101 GGACCAACCGCCGAGTGTATCGATGATATCGTCTGAAAGGTTGGTCCCGAGCAGGTCGTT 5160  
5161 TACTTCGCTGATGATAAGCTTCGCGCTTAAAAATATAGTGATTGTCTTTTCAGTTTGGCGAT 5220  
5221 ATCGGGTATCTCGTCAGCGTGAATTCGTCTCTGATTTCCCGACTATCTCTCCAAATGT 5280  
5281 CTTCAACGTAACCAATCC 5298

### 7.3 Lebenslauf

<b>Name:</b>	Martin Laging
<b>Anschrift:</b>	Levinstraße 10, 37079 Göttingen
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Geburtsdatum:</b>	31.5.1969
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schulbildung:</b>	1976 – 1980 Privatschule Buenos Aires 1980 – 1988 Gymnasium Scharnebeck
<b>Wehrdienst:</b>	1989-1990
<b>Hochschulbildung:</b>	1990/1991 Studium der Chemie, Konstanz 1991 – 1997 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen 1996 – 1997 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Genetik der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Dr. H.-J. Fritz 1997 –2000 Experimentelle Arbeiten als Stipendiat des Graduiertenkollegs „Chemische Aktivität von Mikroorganismen“ seit 6/2000 Wissenschaftlicher Angestellter am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen Abteilung Molekulare Genetik Leitung: Prof. Dr. Gallwitz