

Biochemische, molekularbiologische und
genetische Untersuchungen über
strukturelle Voraussetzungen für DNA U-Endonukleaseaktivität
in der ExoIII-Familie von DNA Reparaturenzymen

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

vorgelegt von
Svetlana Ber
aus Buguruslan (Russland)

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz

Korreferent: PD Dr. Wilfried Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 DNA-Schäden und deren Entstehung.....	5
1.1.1 Hydrolytische DNA-Schäden	5
1.2 Reparatur von DNA-Läsionen.....	7
1.2.1 UDG-Familien und deren phylogenetische Verbreitung.....	7
1.2.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER).....	10
1.2.3 Strang-Inzisions-Reparatur: VSP Reparatursystem	12
1.2.4 Initiation der DNA-U-Reparatur durch ein ExoIII-Homolog: Mth212.....	12
1.3 Aufgabenstellung.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Archaeelle Organismen	14
2.1.2 Bakterienstämme	14
2.1.3 Phagenstamm.....	15
2.1.4 Plasmide	15
2.1.5 Desoxyriboseoligonukleotide	19
2.1.6 Längenstandards	22
2.1.7 Enzyme	23
2.1.8 Chemikalien.....	23
2.1.9 Molekularbiologische Kits	24
2.1.10 Puffer und Lösungen	24
2.1.11 Medien	29
2.1.12 Geräte.....	31
2.1.13 Sonstige Materialien	32
2.1.14 Software.....	33
2.1.15 Datenbanken	34
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	44
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	47
3. Ergebnisse und Diskussion.....	51
3.1 Isolation und Charakterisierung des ExoIII-Homologs aus <i>Methanosarcina mazei</i>	51

3.1.1 Produktion und Reinigung von Mma3148	52
3.1.2 Enzymologische Charakterisierung von Mma3148	53
3.1.3 Aktivität von Mma3148 an einzelsträngiger DNA	57
3.2 Charakterisierung des TUDGA-Homologs aus <i>Methanosarcina mazei</i> (Mma.TUDGA)	59
3.2.1 Klonierung, Produktion und Reinigung von Mma.TUDGA	61
3.2.2 Enzymologische Charakterisierung von Mma.TUDGA	62
3.2.3 Temperaturstabilität der TUDGA-Homologen aus <i>Methanosarcina mazei</i> und <i>Thermus thermophilus</i>	64
3.3 Zusammenfassung der bis jetzt erzielten Ergebnisse	68
3.4 Ausstattung von Mma3148 mit einer U/G-Endonukleaseaktivität	68
3.4.1 Aufstellung einer Arbeitshypothese über die Ausstattung von Mma3148 mit einer U/G-Endonukleaseaktivität	69
3.4.2 Überprüfung der Arbeitshypothese	71
3.4.2.1 Herstellung, Produktion und Reinigung von Mma3148/A118M..	71
3.4.2.2 Herstellung, Produktion und Reinigung der Mma3148/A118M/M209Y Doppelmutante	72
3.4.2.3 Enzymologische Charakterisierung von Mma3148/A118M.....	74
3.4.2.4 Enzymologische Charakterisierung von Mma3148/A118M/M209Y	77
3.4.3 Diskussion	81
3.5 Strukturanalyse von Mma3148/A118M/M209Y	81
3.6 Genetische Untersuchung von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209.....	83
3.6.1 Überprüfung des Vorliegens von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209 in <i>E. coli</i> in funktionsfähiger Form	84
3.6.1.1 Überprüfung des BW25113 Δ <i>xthA</i> Stammes	84
3.6.1.2 Umklonierung der untersuchten Gene aus dem pET_B_001 Vektor (<i>xthA</i> , <i>mm3148</i> , <i>mm3148/A118M/M209Y</i>) in den pKK-223-3 Vektor	86
3.6.1.3 Testexpression von <i>E. coli</i> ExoIII, Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y	87
3.6.1.4 Komplementationsexperiment und Bestätigung des Vorliegens von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y in funktionsfähiger Form in <i>E. coli</i>	88

3.6.2 Versuch der Komplementation des U-Reparaturdefektes von <i>E. coli</i> Δ ung mit Mma3148/A118M/M209Y	89
3.6.2.1 Erklärung der verwendeten genetischen Assays	90
3.6.2.2 Herstellung eines M13-heteroduplex-DNA-Konstruktes mit U/G- und T/C-Fehlpaarung	91
3.6.2.3 Herstellung eines <i>E. coli</i> K12 NM522 Δ ung Stammes	94
3.6.2.4 U-DNA-Reparatur <i>in vivo</i>	96
3.6.3 Untersuchung der Toxizität bei der Überproduktion von <i>E. coli</i> ExoIII	98
3.6.3.1 Sequenzanalyse des pKK223-3/ <i>xthA</i> Konstrukts nach der Transformation in DH5 α und XL10 Stämme	98
3.6.3.2 Bestätigung der Toxizität von <i>E. coli</i> ExoIII.....	101
3.6.3.3 Genaue Untersuchung der Toxizität des <i>E. coli</i> ExoIII-Proteins ...	103
3.7 Untersuchung zur Aufklärung der U-Erkennung von Mth212.....	108
3.7.1 Herstellung, Produktion und Reinigung von Mth212/W205A, Mth212/W206A, Mth212/S207A, Mth212/Y208A und Mth212/R209A..	112
3.7.2 Enzymologische Charakterisierung von Mth212/W205A, Mth212/W206A, Mth212/S207A, Mth212/Y208A und Mth212/R209A	113
3.8 Zur Evolution der DNA-U-Reparatur bei den Archaeen.....	116
4. Zusammenfassung.....	125
5. Anhang.....	127
5.1 Die Originaldaten zur <i>in vivo</i> U-DNA-Reparatur Experiment.....	127
5.2 Sequenzanhang	129
5.2.1 Vektorsequenzen	129
5.2.1.1 Vektorsequenz M13mp20	129
5.2.1.2 Vektorsequenz pET-28a	129
5.2.1.3 Vektorsequenz pCR-Blunt II-TOPO	129
5.2.1.4 Vektorsequenz pET_B_001.....	129
5.2.1.5 Vektorsequenz pKK223-3	129
5.2.1.6 Vektorsequenz pREP4.....	129
5.2.2 Sequenzdaten Mma0486 im pET_B_001	129
5.2.3 Sequenzdaten M13mp20/Stop/NcoI.....	129
5.2.4 Sequenzdaten Mma3148 im pKK223-3	129
5.2.5 Sequenzdaten Mma3148/A118M/M209Y im pET_B_001.....	129
5.2.6 Sequenzdaten Mma3148/A118M/M209Y im pKK223-3	129

5.2.7 Sequenzdaten Mth212/W205A, Mth212/W206A, Mth212/S207A, Mth212/Y208A und Mth212/R209A	129
5.2.8 Sequenzdaten XthA im pKK223-3.....	129
5.2.9 Sequenzdaten XthA_D151N im pKK223-3	129
5.2.10 Sequenzdaten XthA_W212A im pKK223-3	129
5.2.11 Sequenzdaten XthA_W212A_D151N im pKK223-3	129
5.2.12 Sequenzdaten Mma3148 im pET_B_001	129
5.2.13 Sequenzdaten Ung im pKK223-3	129
6. Abkürzungsverzeichnis	130
7. Literaturverzeichnis	132
8. Danksagung	140
9. Lebenslauf	141

1. Einleitung

1.1 DNA-Schäden und deren Entstehung

DNA-Schäden können durch exogene und endogene Einflüsse entstehen. Exogene DNA-Schäden treten durch die Einwirkung von Strahlen (UV-, ionisierende, Röntgenstrahlung) und Chemikalien auf (Marnett and Burcham, 1993). Im lebenden System in Gegenwart von Sauerstoff führt z.B. ionisierende Strahlung zur Bildung der reaktiven Sauerstoff-Spezies, die ein breites Spektrum von DNA-Schäden einschließlich Oxidation von Basen, Einzelstrangbrüche, DNA-Protein cross-links hervorrufen können (Cadet, 1999; Marnett and Burcham, 1993; Shokolenko *et al.*, 2003). Endogene DNA-Schäden entstehen durch die Basenfehlpaarung während der Replikation und durch die Einwirkung der Nebenprodukte des normalen Metabolismus (zu denen ebenso die reaktive Sauerstoff-Spezies gehören), die zu den spontanen Alkylierung, Oxidation oder Hydrolyse führen (Barnes and Lindahl, 2004).

1.1.1 Hydrolytische DNA-Schäden

In allen lebenden Zelle liegt DNA in wässriger Umgebung vor, deshalb ist die DNA jeden Organismus der ständigen Gefahr der spontanen Hydrolyse ausgesetzt (Staszewski, 2006). Das Resultat der spontanen Hydrolyse der DNA ist der Verlust der Aminogruppen von Basen (Desaminierung) oder Basenverlust (Depurination/Deypyrimidination) (Marnett and Burcham, 1993).

Wenn die N-glykosylische Bindung zwischen der Base und der Desoxyribose hydrolysiert wird, entsteht eine abasische Stelle (AP-Stelle). Eine AP-Stelle kann zum Abbruch der DNA-Synthese (Sagher and Strauss, 1983) oder zum Einzelstrangbruch (Marnett and Burcham, 1993) führen.

In der DNA haben die vier Basen Adenin, Guanin, 5-Methylcytosin und Cytosin je eine exocyclische Amino-Gruppe. Der Verlust der Amino-Gruppen führt zur Umwandlung der betroffenen Basen jeweils zu Hypoxanthin, Xanthin, Thymin und Uracil (Friedberg, *et al* 1995). Desaminierung von Adenin und Guanin treten viel seltener im Vergleich zur Desaminierung von Cytosin auf, deshalb haben sie keine große biologische Bedeutung.

Die Häufigkeit der besprochenen endogenen DNA-Schäden ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Häufigkeit der endogenen DNA-Schäden.

Die Daten sind für die Säugertierzellen bei 37°C bestimmt. Die Zahlen beziehen sich auf die nicht unbedingt durch die Hydrolyse entstehende Schäden (Bernstein C, Bernstein H., 1991).

Schäden	Ereignis pro Zelle pro Tag
Depurination/Depyrimidination	12600
Einzelstrangbruch	55200
Cytosin-Desaminierung	192

Obwohl Cytosin-Desaminierung viel seltener auftritt als Basenverluste und Einzelstrangbrüche, ist sie von genetisch besonderer Relevanz, da das entstehende Uracil ein hohes mutagenes Potenzial hat (Wilson and Bohr, 2007).

Cytosin-Desaminierung

Resultat der Desaminierung von 5-Methylcytosin ist Thymin, was zu einer T/G-Fehlpaarung führt und nach einer Runde DNA-Replikation zu einer C/G→T/A-Transitionsmutation (Friedberg, *et al* 1995).

Die Desaminierung von Cytosin führt zur Entstehung der RNA-Base Uracil. Nach der DNA-Replikation bildet Uracil eine Basenpaar mit Adenin und falls diese nicht repariert wird, führt dies zur C/G zu T/A-Transitionsmutation (Barnes and Lindahl, 2004) (Abbildung 1).

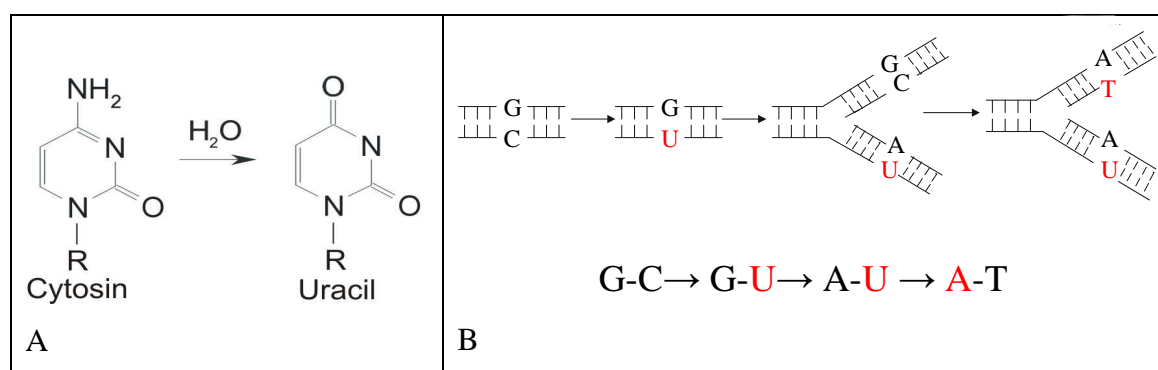


Abbildung 1: Desaminierung von Cytosin und Entstehung der Transition.

(A) Spontane Desaminierung von Cytosin durch Angriff von H₂O. (B) Schematische Darstellung der Entstehung von C/G→T/A Transitionsmutation.

1.2 Reparatur von DNA-U-Läsionen

Es wurden bis heute acht Klassen von Enzymen entdeckt, die die U-DNA-Reparatur initiieren. Die ersten fünf Klassen umfassen die generellen schadensspezifischen Uracil-DNA-Glykosylasen (UDG), die zur UDG-Superfamilie gehören. (Lindahl, 1974, Neddermann and Jiricny, 1993, Gallinari and Jiricny, 1996, Haushalter, 1999, Sandigursky and Franklin, 1999, Starkuviene and Fritz, 2002). Eine weitere Klasse bilden die nicht generellen Uracil-DNA-Glykosylasen der Mig-Familie, die Uracil nur in einem bestimmten Sequenzkontext erkennen und der „helix-hairpin-helix“ Superfamilie (HhH) angehören (Horst and Fritz, 1996, Yang *et al.*, 2000). Durch die Aktivität der Glykosylasen wird einer der am höchsten konservierten Reparaturmechanismen, die Basen-Exzisions-Reparatur (BER), eingeleitet (Memisogu and Samson, 2000).

Zu einer anderen Klasse gehört eine weitere nicht generelle U-Endonuklease, Vsr, die einen weniger verbreiteten Reparaturmechanismus (Strang-Inzision-Reparatur: VSP-Reparatursystem) initiieren kann. (Gabbara *et al.*, 1994). Zur letzten unlängst entdeckten Klasse gehört eine U-Endonuklease (Mth212), welche die generelle Reparatur von Uracilresten einleiten kann (Georg *et al.*, 2006; Schomacher *et al.*, 2009a).

1.2.1 UDG-Familien und deren phylogenetische Verbreitung

Uracil-DNA-Glykosylase wurden aufgrund der Kombination der Sequenzinformation, Strukturanalyse, sowie genetischen und biochemischen Studien in 6 Familien eingeteilt, die zwei Superfamilien (UDG- und „helix-hairpin-helix“ (HhH)) zugeordnet wurden (Cunningham, 1997; Kosaka, 2007; Pearl, 2000).

Der Familie 1 ist die erste beschriebene Uracil-DNA-Glykosylase *E. coli* UNG (Uracil-N-Glykosylase) zugeordnet (Lindahl, 1974). Das Enzym hydrolysiert die glykosidische Bindung zwischen Base und Ribose und entfernt die defekte Base in ssDNA und dsDNA (Pearl, 2000). Die Vertreter der Familie 1 sind die am besten untersuchten Enzyme der UDG-Superfamilie. Sie wurden bei fast allen bis lang untersuchten Eukaryoten und Bakterien entdeckt. Jedoch wurden keine UNG-Homologe im Genom von *Drosophila melanogaster* (mesophiler Eukaryot), Archaea (Aravind and Koonin, 2000), *Thermus thermophilus* (hyperthermophiles

Bakterium) (Starkuviene and Fritz, 2002) und *Thermotoga maritima* (hyperthermophiles Bakterium) (Sandigursky and Franklin, 1999) gefunden.

Das erste Enzym, das zur Familie 2 zugeordnet wurde, ist die humane Thymin-DNA-Glykosylase (human TDG). Dieses Enzym wurde zuerst als Thymin-DNA-Glykosylase mit Spezifität für T/G-Fehlpaarung charakterisiert (Neddermann and Jiricny, 1993). Anschließend wurde gezeigt, dass dieses Enzym eine stärkere Aktivität zur U/G-Fehlpaarung aufweist (Neddermann and Jiricny, 1994). Das Homolog von TDG wurde in *E. coli* entdeckt (*E. coli* MUG; *mismatch-specific uracil glycosylases*; Gallinari and Jiricny, 1996). Die Vertreter dieser Familie sind dsDNA spezifisch und haben ein breites Substratspektrum. Die Enzyme können ebenfalls 3, N^4 -Ethenocytosin entfernen (Pearl, 2000). Die Vertreter der Familie 2 sind weniger stark verbreitet und wurden bei Eukaryoten und Bakterien gefunden, aber nicht bei Archaea (Aravind and Koonin, 2000; Pearl, 2000).

Als erste Mitglieder der Familie 3 wurden UDGs aus *Xenopus laevis* und *Homo sapiens* (xSMUG1, hSMUG1 entsprechend) beschrieben (Haushalter, 1999). Die biochemische Charakterisierung ergab, dass diese Proteine für Uracil spezifisch sind und eine beträchtliche Selektivität für ssDNA aufweisen (Haushalter, 1999). Die Mitglieder der Familie 3 wurden bis heute fast ausschließlich bei Eukaryoten gefunden. Bei Bakterien wurden wenigen Vertreter lediglich über Sequenzverwandtschaft definiert. Die Mitglieder dieser Familie wurden nicht bei Archaea detektiert (Pettersen *et al.*, 2007; Aravind and Koonin, 2000; Pearl, 2000).

Die Vertreter der Familie 4 und 5 wurden in thermophilen Organismen gefunden und wurden deshalb TUDGA bzw. TUDGB genannt (T steht für thermostabil).

Das erste Enzym, das der Familie 4 zugeordnet wurde, ist TMUDG aus dem thermophilen Bakterium *Thermatoga maritima* (Sandigursky and Franklin, 1999). Die weiteren Vertreter dieser Familie wurden in thermophilen Archaeonen *Archaeoglobus fulgidus* (AFUDG; Sandigursky and Franklin, 2000), *Pyrobaculum aerophilum* (*Pa*-UDGA; Sartori *et al.*, 2001; Sartori *et al.*, 2003) und in einem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* (TTUDGA; Starkuviene and Fritz, 2002) entdeckt.

Das erste Mitglied der Familie 5 wurde ebenfalls im *Thermus thermophilus* gefunden (TTUDGB; Starkuviene and Fritz, 2002). Der weitere Vertreter dieser Familie wurde in einem thermophilen Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* detektiert (Pa-UDGB; Sartori *et al.*, 2002).

Alle untersuchten Vertreter der Familien 4-5 besitzen einen Eisen-Schwefel Cluster (Hinks *et al.*, 2002; Kosaka, 2007; Sandigursky and Franklin, 1999; Sandigursky and Franklin, 2000; Starkuviene and Fritz, 2002). Proteine der Familie 4 TUDGA sind in der Lage, Uracil aus ssDNA und dsDNA zu entfernen. Proteine der Familie 5 TUDGB sind doppelstrangspezifisch und prozessieren Uracil gegenüber Adenin langsamer als Vertreter der Familie 4 (Kosaka, 2007).

Es gibt weiterhin Archaeen, bei denen keine Vertreter der oben beschriebenen Familien entdeckt wurden, wie z.B. *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanocaldococcus jannaschii* (Georg *et al.*, 2006; Schomacher *et al.*, 2009b).

Die zuerst entdeckten Enzyme, die den Familien 1-5 zugeordnet wurden, andere später beschriebene weitere Vertreter der Familien 1-3 und alle bisher charakterisierten Mitglieder der Familien 4-5 sind in der Tabelle 8 (Seite 116) zusammengestellt.

Die fünf beschriebene Familien gehören zur Uracil-DNA-Glykosylasen Superfamilie (UDG) (Kosaka, 2007).

Die letzte bekannte Familie aufgrund der strukturellen Unterschied gehört zur „helix-hairpin-helix“ Superfamilie (HhH). Dieser Familie sind Mig.MthI (*mismatch-specific glycosylases*) aus *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Horst and Fritz, 1996), Pa-Mig aus *Pyrobaculum aerophilum* (Yang *et al.*, 2000), MBD4 aus *Homo sapiens* (Hendrich, 1999) zugeordnet. Die Enzyme prozessieren Uracil aus dsDNA (nicht aus ssDNA) und Thymin aus T/G-Fehlpaarungen, dies aber nur in bestimmten Sequenzkontexten (Hendrich, 1999; Horst and Fritz, 1996; Yang *et al.*, 2000). Die Enzyme der letzten Familie, die als nicht generelle DNA-U-Glukosylase charakterisiert sind, kommen in Eukaryoten und Archaeen vor (Horst and Fritz, 1996).

Zusätzlich gehören zu dieser „helix-hairpin-helix“-Superfamilie andere Glykosylasen, die die durch die Oxidation, Alkylierung oder unter anderen Umständen entstandene Schäden reparieren und unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen: MutY (erkennt Adenin gegenüber 8-oxoGuanin)(Guan, 1998), Ogg1 (entfernt das durch die Oxidation entstandene 8-oxoGuanin gegenüber Cytosin) (Nash, 1996), AlkA (entfernt die alkylierenden Basen von DNA) (Hollis, 2000), und EndoIII (entfernt modifizierte Thymin und Cytosin von DNA) (Thayer, 1995).

1.2.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Durch den Basen-Exzisions-Reparaturmechanismus können nicht nur die durch Hydrolyse, sondern auch durch die Oxidation und Alkylierung entstehende Schäden repariert werden. Die Basen-Exzisions-Reparatur wird durch die Aktivität der oben besprochenen Glykosylasen initiiert. In Abbildung 2 ist das Schema am Beispiel der Uracil-Exzisions-Reparatur dargestellt.

Das Enzym U-DNA-Glykosylase erkennt Uracil, löst die glykosidische Bindung zwischen Base und Ribose und entfernt die defekte Base, wodurch eine Apyrimidin-Stelle entsteht (AP-Stelle) (Kelley *et al.*, 2003). Die AP-Stelle kann anschließend von einem der zwei Wege prozessiert werden. Durch die Aktivität der AP-Endonuclease kann das Deoxyribose-Phosphat-Rückgrat auf der 5'-Seite neben der AP-Stelle geschnitten werden (Kelley *et al.*, 2003). Auf diese Weise entsteht auf der 5'-Seite eine 3'-OH-Gruppe und auf der 3'-Seite ein 5'-Deoxyribose-Phosphat-Rest (Kelley *et al.*, 2003). Alternativ kann die AP-Stelle durch AP-Lyaseaktivität einer DNA-Glykosylase geschnitten werden, was zur Entstehung einer ein-Nukleotidlücke mit 3'- und 5'-Phosphatenden führt (Marti and Fleck., 2004). Bevor die Reparatur abgeschlossen werden kann, muss die 3'-Phosphatgruppe entfernt werden. Die DNA-Glykosylase/Lyase sind nicht an der U-Exzision-Reparatur beteiligen z.B. MutY aus *E. coli* (Slupska *et al.*, 1996), deshalb ist dieser Schritt nicht in Abbildung 2 gekennzeichnet. Die folgende nach der Spaltung an einer AP-Stelle Reparatur kann durch den „short patch“ oder „long patch“ Reparaturweg erfolgen (Dianov and Lindahl, 1994; Dianov *et al.*, 2003). Während der „short patch“-Reparatur wird der Desoxyribose-Phosphat-Rest durch die Aktivität der Deoxyribosephosphodiesterase (dRPase) entfernt (Franklin and Lindahl, 1988). Eine

DNA-Polymerase inseriert ein Nukleotid an das 3'-OH-Ende. Danach wird das Deoxyribose-Phosphat-Rückgrat durch eine Ligase verschlossen.

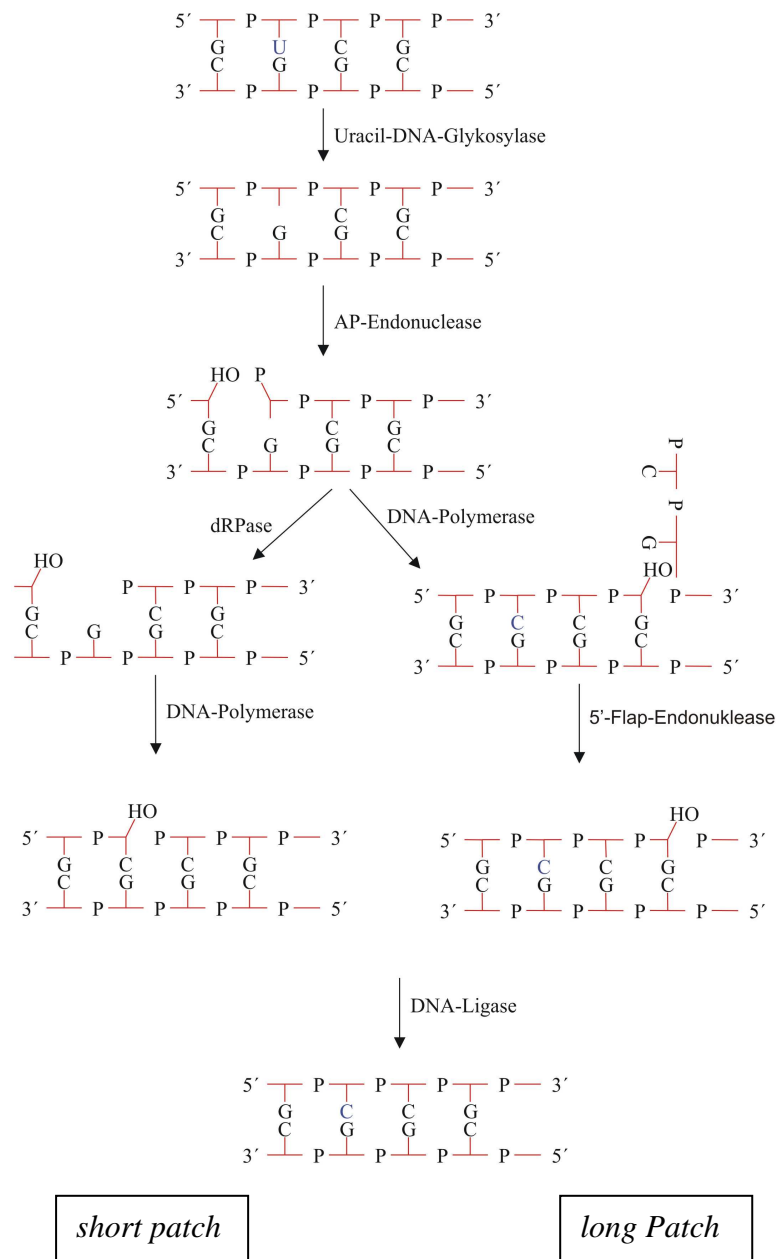


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Basen-Exzisions-Reparatur (nach Barnes and Lindahl, 2004).

Basen-Exzisions-Reparatur kann nach zwei alternative Mechanismen ausgeführt werden: *long patch* und *short patch*. Weitere Erklärung siehe Text. P:5'-Phosphat, U: Uridin, OH: 3'-OH-Ende, dRPase: -Desoxyribophosphodisterase.

Während der „long patch“-Reparatur wird eine DNA-Polymerase ein Nukleotid an das 3'-OH-Ende inserieren und dann ein DNA-Fragment von 2 bis 13 Nukleotiden synthetisieren, das das DNA-Fragment verdrängt (Podlutzky *et al*, 2001). Das

Resultat ist die Bildung eines 5'-Flap-Fragmentes, das durch die Aktivität einer 5'-Flap-Endonuklease entfernt wird. Danach verschließt Ligase den Strangbruch (Memisoglu and Samson, 2000).

1.2.3 Strang-Inzisions-Reparatur: VSP Reparatursystem

Ein anderes Beispiel der DNA-U-Reparatur ist das VSP (*very short patch*)-Reparatursystem. Dieses Reparatursystem wird durch die Aktivität einer U-Endonuklease initiiert (Hennecke *et al.*, 1991).

Der Hauptbestandteil des VSP-Reparatursystem ist das Vsr-Protein. Das Vsr-Protein wurde als Mismatch- und strangspezifische Endonuklease beschrieben, die Uracil und das Produkt von desaminiertem 5-Methyl-Cytosin nur in einem bestimmten Sequenzkontext prozessiert (Hennecke *et al.*, 1991; Lieb and Bhagwat, 1996). Das Protein spaltet die 5'-Phosphodiesterbindung am fehlerhaften Nukleotid und produziert 5'-Phosphat- und 3'-OH-Termini (Lieb and Bhagwat, 1996). Da die Aktivität von Vsr von einem Sequenzkontext abhängig ist, kann das Enzym die DNA-U-Reparatur nicht generell einleiten.

1.2.4 Initiation der DNA-U-Reparatur durch ein ExoIII-Homolog: Mth212

Die Initiation der generellen DNA-U-Reparatur in allen bis lang untersuchten Archaeen wurde bis einiger Zeit nur auf die Aktivität der Enzyme der Familien 4-5 (Kapitel 1.2.2) zurückgeführt. In einem thermophilen Archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus* wurden weder die Vertreter der Familien 1-3 noch der Familien 4-5 entdeckt (Georg *et al.*, 2006). Nach Fraktionierung der Zellmasse von diesem Organismus wurde ein ExoIII-Homolog Mth212 isoliert und biochemisch charakterisiert (Georg *et al.*, 2006). Mth212 besitzt alle Eigenschaften von ExoIII-Homologen und ist zusätzlich in der Lage, endonukleolytisch die Phosphodiesterbindung auf der 5'-Seite von Uridinrest unabhängig von gegenüberliegenden Nukleotid und Sequenzmotiv zu spalten (Georg *et al.*, 2006, Schomacher, 2007).

Damit wurde ein neuer alternativer Mechanismus für generelle DNA-U-Reparatur entdeckt, der durch die Aktivität von einem ExoIII-Homolog (Mth212) initiiert werden kann (Schomacher *et al.*, 2009a).

1.3 Aufgabenstellung

Nach der Entdeckung und Untersuchung von Mth212 (Georg *et al.*, 2006; Schomacher *et al.*, 2009a) sind noch mehrere Fragen strukturell-funktionaler und evolutiver Natur unbeantwortet geblieben. Welche strukturelle Besonderheit bestimmt die U-Endonukleaseaktivität eines ExoIII-Homologes? Wie sind die ExoIII-Homologe mit U-Endoaktivität phylogenetisch verbreitet? Ist diese Eigenartigkeit Folge der extremen Lebensbedingungen (z.B. der Temperatur)? Fand die Entwicklung des ExoIII-Homologs mit U-Endoaktivität parallel zur bekannten DNA-U-Reparatur Glykosylasen statt oder wurde dieser Reparaturweg früher entwickelt? Durch die Untersuchung eines ExoIII-Homologes aus einem mesophilen Archaeon, das ähnliche Eigenschaften wie Mth212 hat, kann der Klärung dieser Fragen näher gekommen werden. Mit einem Enzym aus einem mesophilen Organismus ergibt sich die Möglichkeit einer genetischen Studie im heterologen *E. coli*-Hintergrund. Eine genetische Untersuchung von Mth212 ist aus zwei Gründen nicht möglich:

1. Genetische Unzugänglichkeit von *Methanothermobacter thermautotrophicus* (wie fast von allen Vertreter der archaellen Domäne).
2. Hohes Temperaturoptimum der Enzyme.

Die Suche in der NCBI-Datenbank nach ein ExoIII-Homolog aus einem mesophilen Archaeon, das eine hohe Sequenzverwandtschaft mit Mth212 hat, ergab Mma3148 aus *Methanosarcina mazei* (Georg *et al.*, 2006). Mma3148 wird sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene ausführlich untersucht.

In Zusammenarbeit mit K. Lakomek (Abteilung Molekulare Strukturbiologie) wird die strukturelle Besonderheit von Mma3148 und Mth212 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Archaeelle Organismen

***Methanosarcina mazei* Gö1 (DSM-Nummer: 7222)**

(Egger *et al.*, 1992)

Der Stamm wurde von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme

***E. coli* DH5 α (Invitrogen)**

F⁻, Φ 80*lacZ* Δ M15, *recA1 endA1 hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*⁺) *supE4,4 thi-1 gyrA96* (Nal^R), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169

***E. coli* BW25113 Δ xthA (Kio-Collection, Japan)**

RrnB3 Δ *lacZ4787 hsdR514* Δ (*araBAD*)567 Δ (*rhaBAD*)568 *rph-1* Δ *xthA::kan*

***E. coli* BW25113 Δ xthA (diese Arbeit)**

(basierend auf *E. coli* BW25113 Δ xthA (Kio-Collection, Japan))

RrnB3 Δ *lacZ4787 hsdR514* Δ (*araBAD*)567 Δ (*rhaBAD*)568 *rph-1* Δ *xthA*

***E. coli* NM522 (Promega)**

SupE, thi Δ (*lac-proAB*), *hsd5* (*r*⁻, *m*⁻), [F['], *ProAB*; *LacI*^q Δ M15]

***E. coli* NM522 Δ ung (diese Arbeit)**

(basierend auf *E. coli* NM522 (Promega))

SupE, thi Δ (*lac-proAB*), *hsd5* (*r*⁻, *m*⁻), [F['], *ProAB*; *LacI*^q Δ M15], Δ *ung::kan*

***E. coli* BL-21_UX (L. Schomacher, 2007)**

(basierend von BL21-CodonPlus (DE3)-Ril strain (Stratagene))

B F ompT hsdS(*r_b*⁻ *m_b*⁻) *dcm*⁺ *Tet*^r *gal* λ (DE3) *end Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r] Δ *ung::kan*^r

***E. coli* XL10-Gold Kan^r ultracompetent cells (Stratagene)**

Tet^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$
 The [F⁻ *proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r) Tn5 (kan^r) Amy*]

***E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen)**

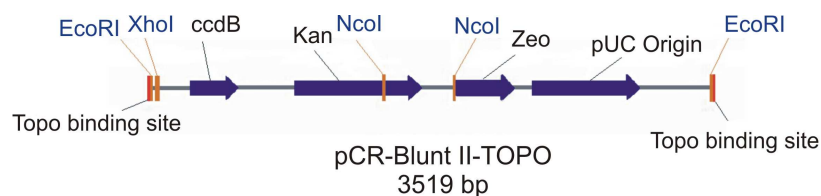
F⁻ *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-msrBC) \Phi80lacZAM15 \Delta lacX74 \text{ recA1 araD139 } \Delta(ara-leu)7697$
galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.3 Phagenstamm**P1 (DSM-Nummer: 5757)**

Der Phage wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

2.1.4 Plasmide**2.1.4.1 pCR[®]-Blunt II TOPO[®] (Invitrogen)**

Die Sequenz des Vektors ist im Anhang (5.2.1.3) angegeben.

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pCR-Blunt II-TOPO.

Die Pfeile zeigen die Transkriptions- oder Replikationsrichtungen. Zeo: Das Gen für die Vermittlung der Zeocinresistenz. Kan: Das Gen für die Vermittlung der Kanamycinresistenz. ccdB: Das Gen für den letalen Gyrase-Inhibitor. pUC Origin: Replikationsursprung des Vektors pUC. Die Klonierungsrestriktionsschnittstellen sind mit braunen Balken markiert und mit blauer Schrift gekennzeichnet. Rot sind zwei Termini gekennzeichnet, an denen eine Topoisomerase I aus dem Vaccinia-Virus kovalent gebunden ist. Das Schema wurde mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) erstellt.

2.1.4.2 pET_B_001 (Georg *et al.*, 2006)

pET_B_001 ist ein Derivat von pET-21d(+) (Novagen). Alle Restriktionsstellen wurden durch die Restriktionsstellen für *XhoI*, *NcoI* und *NotI* ersetzt. Die Sequenz des Vektors ist im Anhang (5.2.1.4) angegeben.

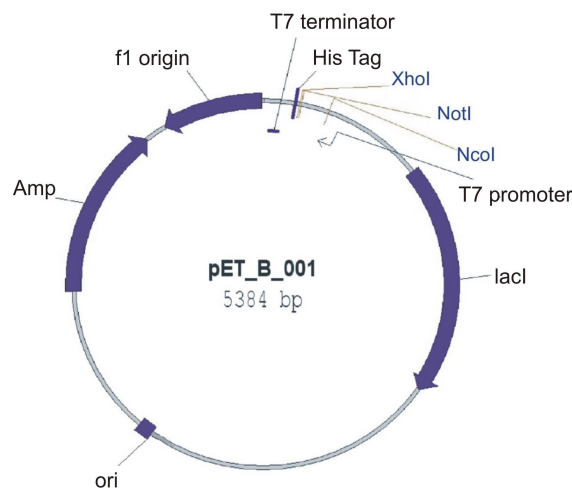


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pET_B_001.

Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen. Die Klonierungsrestriktionsschnittstellen sind mit braunen Balken markiert und mit blauer Schrift gekennzeichnet. Die Positionen des T7-Terminators und T7-promoters sind grau markiert. His-Tag (dunkel-blau): Hexahistidin. Ori: Der Replikationsursprung des Vektors. Amp: Das Gen für die Vermittlung der Ampicillinresistenz. lacI: Das Gen für den lac-Repressor. f1-origin: Der Replikationsursprung des Phagen f1. Das Schema wurde mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) erstellt.

2.1.4.3 pCP20 (Cherepanov and Wackernagel, 1995)

Der Vektor pCP20 ist 9,4 kbp groß, trägt zwei Kassetten für die Vermittlung der Ampicillinresistenz und Chloramphenicolresistenz. Der Vektor ist mit der temperatursensitiven Replikation für die temporale Produktion der Flap-Rekombinase ausgestattet.

2.1.4.4 pREP4 (QIAGEN)

Die Sequenz des Vektors ist im Anhang (5.2.1.6) angegeben.

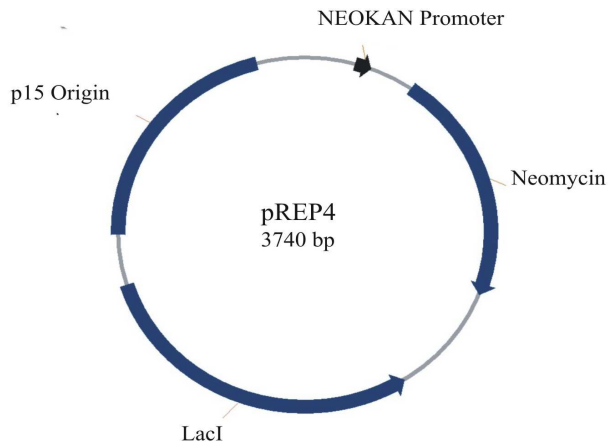


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pREP4.

Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen. Neomycin: Das Gen für die Vermittlung der Neomycin-Kanamycinresistenz. LacI: Das Gen für den lac-Repressor. p15 origin: Der Replikationsursprung des Vektors. Das Schema wurde mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) erstellt.

2.1.4.5 pET-28a(+) (Novagen)

Die Sequenz des Vektors ist im Anhang (5.2.1.2) angegeben.

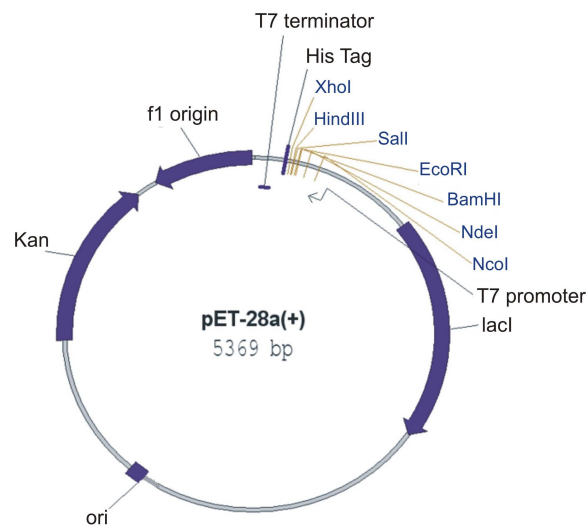


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pET-28a(+).

Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen. Die Klonierungsrestriktionsschnittstellen sind mit braunen Balken markiert und mit blauer Schrift gekennzeichnet. Die Positionen des T7-Terminators und T7-promoters sind grau markiert. His-Tag (dunkel-blau): Hexahistidin. Ori: Der Replikationsursprung des Vektors. Kan: Das Gen für die Vermittlung der Kanamycinresistenz. lacI: Das Gen für den lac-Repressor. f1 origin: Der Replikationsursprung des Phagen f1. Das Schema wurde mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) erstellt.

2.1.4.6 pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech)

Die Sequenz des Vektors ist im Anhang (5.2.1.5) angegeben.

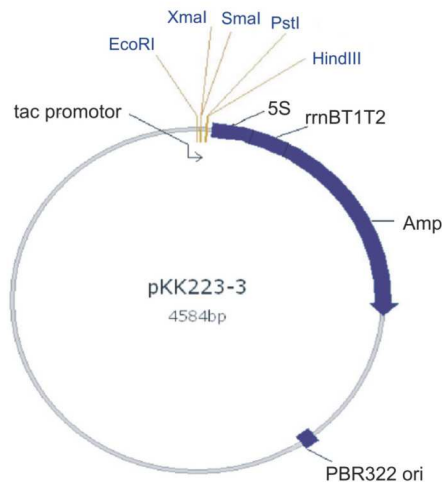


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pKK223-3.

Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen. Die Klonierungsrestriktionsschnittstellen sind mit braunen Balken markiert und mit blauer Schrift gekennzeichnet. Die Position des tac-promoters ist grau markiert. pBR322 Ori: Der Replikationsursprung des Vektors. AmpR: Das Gen für die Vermittlung der Ampicillinresistenz. 5s: rRNA Region. rrnBT1T2: Terminator. Das Schema wurde mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) erstellt.

2.1.4.7 M13mp20

M13mp20 ist ein Derivat des M13mp19. M13mp20 trägt zusätzlich eine *EcoRI*-Schnittstelle in der Klonierungsrestriktionsschnittstelle. Die Sequenz des Vektors ist im Anhang (5.2.1.1) angegeben.

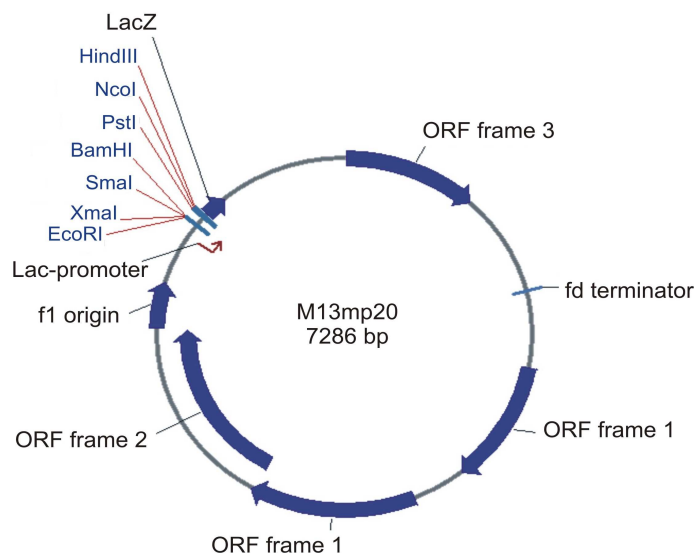


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors M13mp20.

Die Pfeile zeigen die Transkriptions- oder Replikationsrichtungen. Die Klonierungsrestriktionsschnittstellen sind mit blauen Balken markiert und mit blauer Schrift gekennzeichnet. Die Position des Lac-Promoters ist dunkel-braun markiert. f1 origin: Der Replikationsursprung des Phagen f1. fd terminator: Terminator des Phagen fd. Das Schema wurde mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) erstellt.

2.1.5 Desoxyriboseoligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma PURIMEX (Greibenstein) bzw. SIGMA (München) synthetisiert.

2.1.5.1 PCR-Primer

Primer für *Quick Change Mutagenesis*:

Mma3148_M209Y_LO: 5' CCTGGTGGTCATACAGAACCGGCGCACGC 3'

Mma3148_M209Y_UP: 5' GCGTGCGCCGGTTCTGTATGACCACCAGG 3'

Mma3148_D152N_LO: 5' CTGTGGGAACGTGAATACAGCCC 3'

Mma3148_D152N_UP: 5' GGGCTGTATTCACGTTCCCACAG 3'

XthA_D151N_For: 5'CCGGTACTGATTATGGGCAATATGAATATCAGCCC 3'

XthA_D151N_Rev: 5'GGGCTGATATTCATATTGCCATAATCAGTACCGG 3'

XthA_W212A_For: 5'CAAACAGCAGATCGTTTCTCAGCGTTTGATTACCGCTC 3'

XthA_W212A_Rev: 5'GAGCGGTAATCAAACGCTGAGAAACGATCTGCTGTTTG 3'

M13mp20 Stop_Rev: 5'CAGTGCCAAGCTTCCATGCTATATCGCATGCC 3'

M13mp20 Stop_For: 5'GGCATGCGATATAGCATGGAAGCTTGGCACTG 3'

M13mp20 NcoI_Rev: 5'GATTAAGTTGGGTAACGCCATGGTTTTCCAG 3'

M13mp20 NcoI_For: 5'CTGGGAAAACCATGGCGTTACCCAACCTTAATC 3'

Mth212_R209A_Rev: 5' CTCACGGGCCCTTGTCGCGTAGCTCCACC 3'

Mth212_R209A_For: 5' GGTGGAGCTACGCGACAAGGGCCCCGTGAG 3'

Mth212_Y208A_Rev: 5' CGGGCCCTTGTCCTCGCGCTCCACCATGTG 3'

Mth212_Y208A_For: 5' CACATGGTGGAGCGCGAGGACAAGGGCCCCG 3'

Mth212_S207A_Rev: 5' CGGGCCCTTGTCCTGTACGCCACCATGTGTAC 3'

Mth212_S207A_For: 5' GTACACATGGTGGGCGTACAGGACAAGGGCCCCG 3'

Mth212_W206A_Rev: 5' GTCCTGTAGCTCGCCCATGTGTACTGTCCGGGG 3'

Mth212_W206A_For: 5' CCCC GGACAGTACACATGGGCGAGCTACAGGAC 3'

Mth212_W205A_Rev: 5' GTCCTGTAGCTCCACGCTGTGTACTGTCCGGGG 3'

Mth212_W205A_For: 5' CCCC GGACAGTACACAGCGTGGAGCTACAGGAC 3'

Primer für die Konstruktion des M13mp20-heteroduplex Konstruktes (M13-mut-SB):

5'(PHOS)CATGGTTTTCCUAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAG
CTTCCATGCTCTATCGCATGCCTGCA 3'

Primer für die Amplifikation des *open reading frams* MM0486 aus *M. mazei* Gö1:

MM0486_For: 5' GGCATATGGATGCAGAGGAAGAGGAA3'

MM0486_Rev: 5' CTAAGCTTTTACTGCCAGAGCTCCCTG3'

Primer für die Umklonierung von *Mma3148* und *Mma3148/A118M/M209Y* aus den pET_B_001-Vektor in den pKK223-3-Vektor:

pKK MM3148_For: 5' AGAGAATTCATGGCGGAACACTATAACCTT 3'

pKK MM3148_Rev: 5' TGGCTGCAGTTAAAACCTCCAGTTCCAGCCC 3'

Primer für die Umklonierung des *xthA* Gens aus dem pET_B_001-Vektor in den pKK223-3-Vektor:

pKK_Xth_For: 5' TGGCAGAATTCATGAAATTTGTCTCTTTTA 3'

pKK_Xth_Rev: 5' GGAAGCTTTTAGCGGCGGAAGGTCGCCCAG 3'

Primer für die Umklonierung des *ung* Gens aus dem pET_B_001-Vektor in den pKK223-3-Vektor:

pKK_ung_For: 5' GTCCCGGGAAGAAGGAGATATACCATGGCT 3'

pKK_ung_Rev: 5' TGCTGCAGTTACTCACTCTCTGCCGGTAAT 3'

2.1.5.2 Primer für die DNA-Sequenzanalyse

pKK_For_2: 5' TTTTATCAGACCGCTTCTGC 3'

pKK_Rev_2: 5' CGGTTCTGGCAAATATTCTG3'

PET_S1_LO: 5' CAGCAGCCAACTCAGCTT 3'

PET_S1_UP: 5' ATAGGGGAATTGTGAGCG 3'

M13_Rev: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

M13_For: 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'

M13_II_Rev: 5' CTCACTCATTAGGCACCCC 3'

M13_II_For: 5' CACTCCAGCCAGCTTTC 3'

2.1.5.3 Primer zur Verifikation der *ung*-Deletion in *E. coli* NM522

KAN_SEN: 5' CGGTGCCCTGAATGAACTGC 3'

KAN_ANT: 5' CGGCCACAGTCGATGAATCC 3'

UNG_AUS_SEN: 5' CATCAACTTATGCGGGTGTG 3'

UNG_AUS_ANT: 5' GCTGAATATCTCTGTCGCAA 3'

2.1.5.4 Primer zur Verifikation der *xthA*-Deletion in *E. coli* BW25113Δ*xthA* (Kio-Collection, Japan)

XTH_AUS_SEN: 5' CAACAGGCGGTAAGCAACGG 3'

XTH_AUS_ANT: 5' CAAAGGACGGCAGGCAACAA 3'

2.1.5.5 Desoxyriboseoligonukleotide für die enzymatischen Aktivitätsassays

40_Prince_G: 5' CCCACAGCTGCGCAGGGCAGGTAAGCCAAGTACCCTACGT3'

40_Prince_C: 5' CCCACAGCTGCCCAGGGCAGGTAAGCCAAGTACCCTAGCT3'

40_Prince_A: 5' CCCACAGCTGCACAGGGCAGGTAAGCCAAGTACCCTAGCT3'

40_Prince_T: 5' CCCACAGCTGCTCAGGGCAGGTAAGCCAAGTACCCTAGCT3'

35_Prince_G: 5' CTGCGCCACAGCTGCGCAGGGCAGGTAAGCCAAG3'

35_Prince_A: 5' CTGCGCCACAGCTGCACAGGGCAGGTAAGCCAAG3'

40_U_RIB: 5'(F) d[GGGTACTTGGCTTACCTGCCCTGUGCAGCTGTGGGC]_r[GCAG]₃'

40_Prince_AP: 5'(F) GGGTACTTGGCTTACCTGCCCTGAPGCAGCTGTGGGCGCAG3'

40_Prince_U: 5'(F) GGGTACTTGGCTTACCTGCCCTGUGCAGCTGTGGGCGCAG3'

40_Prince_T: 5'(F) GGGTACTTGGCTTACCTGCCCTGTGTCAGCTGTGGGCGCAG3'

40_Prince_C: 5'(F) GGGTACTTGGCTTACCTGCCCTGCGCAGCTGTGGGCGCAG3'

2.1.6 Längenstandards

2.1.6.1 DNA-Marker

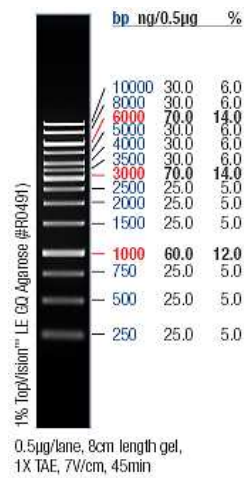


Abbildung 9: 1kb DNA-Ladder (Fermentas).

Die Abbildung stammt von Fermentas (Burlington, Ontario).

2.1.6.2 Protein-Marker

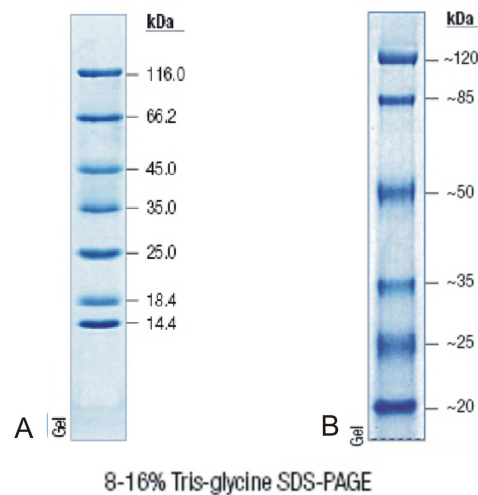


Abbildung 10: Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

A: Unstained Protein Molecular Weight Marker. B: Prestained Protein Molecular Weight Marker.

Die Abbildung stammt von Fermentas (Burlington, Ontario).

2.1.7 Enzyme

New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA): Restriktionsendonukleasen, *Tag*-DNA-Polymerase.

Fermentas (Burlington, Ontario): T4-DNA-Ligase, *Pfu*-DNA-Polymerase (heterolog produziert), Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*), Restriktionsendonukleasen.

Boehringer (Mannheim): Ribonuklease A (Rnase A).

2.1.8 Chemikalien

AGS GmbH (Heidelberg): Qualex Gold Agarose.

AppliChem (Darmstadt): Coomassie Brilliant Blue R-250, Bisacrylamid 4K-Lösung 2%, Acrylamid 4K-Lösung 30%, Ampicylin Natrium Salz, Chloramphenicol, Dithiothreitol (DTT), Methanol, Nickel (II)-Chlorid.

Invitex (Berlin): dNTP (2'-Desoxynucleosidtriphosphate).

Fluka (Neu-Ulm): Bromphenolblau, Glycerin 87%, β -Mercaptoethanol, Formamid, Glutation (reduziert).

Fermentas (Burlington, Ontario): Isopropil- β -D-thio-Galactopyranosid (IPTG).

MJ Research (Waltham, MA.): Chill out® Flüssigwachs.

Merck (Darmstadt): Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Formaldehyd, Calciumchlorid-Dehydrat.

Oxiod, Cambridge (Großbritannien): Trypton, Yeast Extract, Agar Bacteriological.

Phosphatpuffer:	20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 mM MgCl_2 0,1 $\mu\text{g/ml}$ BSA
E1-Puffer (JetStar):	Tris/HCl (50 mM), EDTA pH 8 (10 mM) RnaseA (100 $\mu\text{g/ml}$)
E2-Puffer (JetStar):	NaOH (200 mM) 1 % SDS
E3-Puffer (JetStar):	Kaliumacetat, pH 5,5 (3,2 mM)
E4-Puffer (JetStar):	NaCl (600 mM) Natriumacetat (100 mM) Triton X-100/Essigsäure, pH 5,0 (0,15 %)
E5-Puffer (JetStar):	NaCl (800 mM), Natriumacetat/Essigsäure, pH 5,0 (100 mM)
E6-Puffer (JetStar):	NaCl (1,25 mM), Tris/HCl, pH 8,5 (100 mM)
Färbelösung für SDS-PAGE: (Coomassie-Blau)	Lösung A: Coomassie R-250 in Methanol (0,7 %) Lösung B: Essigsäure (20 %)
HOECHST-PUFFER:	Harnstoff (8 M) Tris-Base (200 mM) DTT (200 mM) SDS (2 %)

Phenol, TE-gesättigt:	Phenol (259 g), NaOH (1M, 7,5 ml) H ₂ O (65 ml) Tris/HCL pH 7,5 (1 M, 3 ml) 8-Hydroxychinolin (250 mg)
10%SDS:	10 g SDS in 100 ml H ₂ O aufnehmen
1xSSC-Puffer:	NaCl (150 mM) tri-Natriumcitrat (15 mM)
Sucrosefarbmarker:	Sucrose (60 %) Bromphenolblau (0,1 %) Xylencyanol FF (0,1 %)
50x TAE-Puffer:	Tris/Acetat (2 M) EDTA (50 mM)
10x TBE-Puffer:	Tris/Borat (0,89 M) EDTA (25 mM)
EDTA-Lösung:	EDTA/NaOH pH 8,0 (0,5 M)
TE-Puffer:	Tris/HCl pH8,0 (10 mM) EDTA (0,5 mM) sterilfiltriert
ExoV-Assay Puffer:	66,7 mM Glycin, pH 9,8, 30 mM MgCl ₂ , 8,3 mM β-Merkaptoethanol, 0,5 mM ATP
<i>E. coli</i> ExoIII-Assay Puffer:	66 mM Tris-HCl, 0,66 mM MgCl ₂ , pH 8,0 (Fermentas, Burlington, Ontario)

ApeI-Assay Puffer: 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM
(New England Biolabs magnesium acetate, 1 mM DTT, pH 7,9
Ipswich, MA)

Puffer und Lösungen für die Arbeit mit P1-Bakteriophage:

MC-Puffer MgSO₄ (0,1 M)

CaCl₂ (5 mM)

Na-citrat-Lösung Na-citrat (1 M)

MgSO₄-Lösung MgSO₄ (1 M)

CaCl₂-Lösung CaCl₂ (1 M)

Puffer für die Herstellung von hetertoduplex DNA:

KT-Puffer KCl (187,5 mM)

Tris/HCl pH 7,5 (12,5 mM)

Lösungen für den Succharosegradient:

10 % Succharoselösung: Tris/HCl pH 8,0 (100 mM)

EDTA (10 mM)

NaCl (100 mM)

Sucrose (10 %)

30 % Succharoselösung: Tris/HCl pH 8,0 (100 mM)

EDTA (10 mM)

NaCl (100 mM)

Sucrose (30 %)

40% Succharoselösung: Tris/HCl pH 8,0 (100 mM)

EDTA (10 mM)

NaCl (100 mM)

Sucrose (40 %)

Puffer für die Isolierung von M13 ssDNA:

Y1:	NaCl (3 M) PEG6000 (30 % w/v)
Y2:	Tris/HCl, pH 8,0 (100 mM) EDTA (25 mM)
Y3:	SDS (4 %, w/v)
Y4:	CH ₃ COOK, pH 5,5 (3 M), pH wurde mit Essigsäure eingestellt.

Puffer für die Heparinaffinitätschromatographie:

HEPES-Puffer:	HEPES/KOH, pH 7,6 (20 mM und 200 mM) β-Mercapthoethanol (2 mM) sterilfiltriert
NaCl-Lösung:	NaCl (3 M), sterilfiltriert

Puffer für die Gelfiltration:

Tris-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM KCl
--------------	--------------------------------------

Puffer für die IMAC-Chromatographie:

IMAC-Puffer:	HEPES/KOH, pH 7,6 (25 mM) NaCl (0,5 M)
IMAC-Elutionspuffer:	30 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM Imidazol in IMAC-Puffer

LB-Agar:	Trypton (10 g) Hefeextrakt (5 g) NaCL (10 g) Agar (15 g) H ₂ O (1 l)
dYT-Medium:	Trypton (16 g) Hefeextrakt (10 g) NaCl (5 g) H ₂ O (1 l)
dYT-Agar:	Trypton (16 g) Hefeextrakt (10 g) NaCL (5 g) Agar (15 g) H ₂ O (1 l)
dYT-Weichagar:	Trypton (16 g) Hefeextrakt (10 g) NaCL (5 g) Agar (6,5 g) H ₂ O (1 l)
R-Weichagar:	Trypton (10 g) Hefeextrakt (1 g) NaCL (8 g) Agar (8 g) H ₂ O (1 l)

Nach dem Autoklavieren 2ml 1M CaCl₂ und 5ml 20% Glukose zugeben. Die Lösungen wurden durch Sterilfiltration sterilisiert.

R-Agar: Trypton (10 g)
 Hefeextrakt (1g)
 NaCl (8 g)
 Agar (12 g)
 H₂O (1 l)

Nach dem Autoklavieren 2 ml 1M CaCl₂ und 5 ml 20 % Glukose zugeben. Die Lösungen wurden durch Sterilfiltration sterilisiert.

2.1.12 Geräte

GE Healthcare (Uppsala, Schweden): Automated Laser luorescence, DNA-Sequencer
(A.L.F.)

W. C. Heraeus GmbH (Hanau): Brutschrank

Constant Systems Ltd (Northant, England): Constant Cell Disruption System

BioRad (München): Gene Pulser[®] und Pulser Control

Werkstatt Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen:
Metallblockthermostate

Millipore (Eschborn): Milli-Q[®] Water Purification System

Schütt Labortechnik (Göttingen): pH-Meter 526

Gilson (Bad Cambeg): Pipetman[®] Modelle P1000, P200, P20

MWG Biotech (Ebersberg): Thermocycler Primus 96^{Plus}

Infors AG, Bottmingen (Schweiz): Rundschüttler

Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan): UV-VIS Spektrophotometer UV1601

Herolad (Wiesloch): UVT2035 UV-Leuchttisch

Heinemann (Schwäb.Gmünd): Sonifer W-250

Sartorius (Göttingen): Universal L 420 P Feinwaage;
Universal U 4800 P Feinwaage;
Sterilfiltrieraufsätze

Applied Biosystems (Foster City, CA): Vision Workstation, BioCad[®] Family

Bender&Hobein AG (Zürich,Schweiz): Vortex Genie 2[™]

Kendro (Lagenselbold): Centrikon T-1055;
Sorval[®] RC5C (Rotor SS34)

Hettich (Tuttlingen): Rotanta/RPC
Roto Silenta/RP
Mikroliter
Mikro Rapid/K

2.1.13 Sonstige Materialien

Greiner (Nürtingen): Petrischalen

Boizym (Hess.-Oldendorf): PCR-Cups

Merck (Darmstadt): pH-Indikatorstäbchen

American National Can. (Chicago, USA): Parafilm

Braun Melsungen AG (Melsungen): Meliseptol (Desinfektionsmittel)

Greiner & Söhne (Nürtingen): Reaktionsgefäße (15 ml)

Applied Biosystems (Foster City, CA): Heparin Säule Poros[®] HE 20

Bayha GmbH (Tuttlingen): Skalpell-Klingen

Vivascience[®] (Hannover): Ultrafiltrationsröhrchen Vivaspin

Sartorius (Göttingen): Sterilfiltratieraufsätze

Bode Chemie (Hamburg): Baktolin 5.5 (Desinfektionsmittel)

Sarstedt (Nümbrecht): Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2 ml, 50 ml);
Pipettenspitzen

Hellma (Mühlheim/Bade): Präzisionsquarzküvetten

Brand (Wertheim): Glaspipetten

Schott (Mainz): Glasgefäßen
Kolben
Reagenzgläser

Perumo[®] Syringe (Leuven, Belgien): Einmalspritzen

GE Healthcare (Uppsala, Schweden): Glasplatten für SDS-Gele
Gelfiltrationssäule HiLoad 16/60
Superdex 75 und Superdex 200
Aluminiumoxidplatten für SDS-Gele

2.1.14 Software

ALF-Manager Version 3.02(1995), GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

BOXSHADE Version 3.21 (K. Hofman und M. Baron, Schweden)
(www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

Chromas[©] Version 1.45 (32 bit) Mc Carthy

CorelDRAW[®]X3 Version 12.0, Corel Corporation

Fragment Manager	Version 1.2 (1995) GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Protein Molecular Weight	Service der Bioinformatics Organisation Inc (www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html)
PyMOL™	Version 0.97 (2004) DeLano Scientific LLC (San Carlo, USA)
Vision Workstation Perfusion Chromatography	Version 2.0, Applied Biosystems (Foster City, CA)
SigmaPlot	Version 6.0, SPSS Inc. (Chicago, IL)
Microsoft® Office Word	Version 2007, Microsoft GmbH (Unterschleißheim)
RNAfold	Webinterface basierend auf ViennaRNA-1.5 (www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/RNAfold.html)
Multiple sequence alignment by Florence Corpet	(http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/)

2.1.15 Datenbanken

NCBI-Datenbanken für Protein-, Nukleotid- und Genomsequenzen

www.ncbi.nlm.nih.gov/

PDB-Datenbank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

2.2 Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. DNA-Extraktion mit Ethanol und Ammoniumacetat

Über die Ethanolfällung wird die DNA konzentriert und von Proteinen, Oligonukleotiden und Salz abgetrennt.

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt. Ein Volumenanteil der DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumenanteil 7M Ammoniumacetat und 3 Volumenanteil 96%-igem Ethanol gemischt. Die Mischung wird ca. 2 h oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Wenn die Konzentration der DNA hoch ist, fällt DNA nach 30 min. aus. Der Ansatz wurde 10-15 min. (4°C , 15000 rpm) zentrifugiert (Mikro Rapid/k, Hettich). Das Pellet wurde danach mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Dafür wurde der Überstand abgezogen, 20 μl von 70%-igem Ethanol zugegeben, gemischt und noch mal ca.15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Das ausgetrocknete Pellet wurde im 30 μl Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.2 DNA-Extraktion mit Phenol und Chloroform

Die Phenol/Chloroform Extraktion dient zur Reinigung der DNA-Lösung von Proteinen. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol gemischt, kräftig gevortext und 5 min. bei Raumtemperatur (10000 rpm) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die wässrige Phase wurde dann mit Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und gevortext. Die Lösung wurde noch mal 5 min. zentrifugiert, die wässrige Phase wieder abgenommen und mit einem Volumen Chloroform gemischt, noch einmal kräftig gevortext und zentrifugiert. Die obere wässrige Phase und untere organische Phase wurden getrennt. Um die Spuren von Phenol zu entfernen, wurde die DNA in der wässrigen Phase mit Ethanol und Ammoniumacetat, wie in Methode 2.2.1.1 beschrieben, gefällt.

2.2.1.3. Midipräparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid DNA im präparativen Maßstab wurde *JetStar* Kit verwendet. 50 ml Übernachtkultur wurden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 min., 4000rpm). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 5 ml E1-Puffer resuspendiert und 4 ml E2-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 5 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden 4 ml E3-Puffer zugemischt und die Probe vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde wieder 10 min zentrifugiert (Raumtemperatur, 4000rpm). Die *JetStar*-Säule wurde mit 10ml E5-Puffer äquilibriert und auf die äquilibrierte Säule wurde der klare Überstand gegeben. Die Säule wurde 2 mal mit 10 ml E5-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit 5 ml E6-Puffer eluiert. Die DNA wurde anschließend mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde bei 4°C 30 min abzentrifugiert (15000rpm). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und im Wasser oder in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.4. Minipräparation von Plasmid-DNA

2 ml Übernachtkultur wurden abzentrifugiert (1 min., 10000rpm, bei Raumtemperatur). Das Pellet wurde in 150 µl E1-Puffer resuspendiert, 150 µl E2-Puffer dazugegeben und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden der Mischung 150 µl E3-Puffer zugegeben, 10 min. bei 4°C inkubiert und erneut bei 4°C, 10 min., 10000rpm abzentrifugiert. Das Plasmid wurde mit Phenol und Chloroform, wie in Methode 2.2.1.2 beschrieben, extrahiert und mit Ethanol (Methode 2.2.1.1) gefällt.

2.2.1.5 Präparation chromosomaler DNA

Für die Amplifikation des gewünschten Genes muss die genomische DNA extrahiert werden.

2 ml Übernachtkultur wurden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 min, 15000 rpm) und das Pellet in 500µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform (2.2.1.2) extrahiert und mit Ethanol gefällt (2.2.1.1). Die DNA wurde in 40µl TE-Puffer versetzt. Die Konzentration der DNA wurde bestimmt (2.2.1.12).

2.2.1.6 Präparation von M13 ssDNA

Für die Isolierung von M13 ssDNA im präparativen Maßstab wurden *JetStar* Säule verwendet. 50 ml Übernachtskultur wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 min., 4000rpm). Der Überstand wurde mit 10 ml eiskaltem Y1 Puffer gemischt und 1h auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde dann abzentrifugiert (10 min 4000rpm, 4°C) und das Pellet in 3 ml Y2 Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 3 ml Y3 Puffer gemischt und 20 min bei 70°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden zur der Suspension 3 ml Y4 Puffer zugegeben und das Pellet wurde abzentrifugiert (10 min, RT, 13000rpm). Die *JetStar*-Säule wurde mit 10ml E4-Puffer äquilibriert und auf die äquilibrierte Säule wurde der klare Überstand gegeben. Die Säule wurde 2 mal mit 10 ml E5-Puffer gewaschen und die DNA wurde mit 5 ml E6-Puffer eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (4°C, 30 min. 15000rpm). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in Wasser oder in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.7 Reinigung des PCR-Produktes aus dem Gel mit Nukleo TrapKit

Zur Reinigung des PCR-Produktes von Primern, dNTPs und Nebenprodukten wurde die DNA aus dem Gel extrahiert.

Die PCR-Ansätze wurden vereinigt, mit Ethanol gefällt (2.2.1.1), in 30 µl H₂O aufgenommen und ins 1%-ge Agarosegel aufgetragen.

Mit dem Skalpell wurde das DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und das Gewicht des Gels bestimmt. Für jedes 100 mg Gel wurden 300mg NT1-Puffer zugeben. Vor dem Gebrauch wurde die NucleoTrap-Suspension bis in eine homogene Suspension gevortext und 10µl wurden zum Gel im NT1-Puffer zugemischt. Die Mischung wurde bei 50°C 5-10min. inkubiert, bis das Gel komplett aufgelöst war, und dann 1 min. mit 10000rpm (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen. Das Pellet wurde in 500µl NT2-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 500 µl NT3-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde wieder zentrifugiert und der Überstand erneut abgezogen. Der Waschschrift wurde wiederholt. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet. 30 µl Wasser wurden zugegeben, gevortext und 10-15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der DNA wurde bestimmt (2.2.1.12).

2.2.1.8 Reinigung des PCR-Produktes aus dem Gel mit PrepEase™ Gel Extraction Kit

Das DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Gewicht des Gelfragmentes bestimmt. Für jede 100mg Agarose wurden 200µl NT Puffer zugegeben und bei 50°C 5 min., bis das Gel vollständig aufgelöst war, inkubiert. Die Probe wurde in eine PrepEasy™ Clean-Up Säule überführt und eine Minute bei 11000rpm. zentrifugiert. Die Probe wurde dann mit 600µl mit NT3-Puffer bei denselben Bedingungen gewaschen. Um den Rest des NT3-Puffers zu entfernen wurde die Säule erneut zentrifugiert. Die DNA wurde mit 30µl H₂O eluiert.

2.2.1.9 Reinigung der DNA-Fragmente über einen Saccharosegradienten

Mittels des Saccharosedichtegradienten werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt.

In ein Zentrifugenröhrchen wurden 500µl 40%-ige Saccharoselösung pipettiert. Daraufhin wurden mit einem Gradientenmischer 30%-ige und 10%-ige-Saccharoselösungen aufgetropft. Die gespaltene DNA wurde auf den Gradienten pipettiert und mit Paraffin überschichtet. Der Gradient wurde 21 h. bei 15°C mit 30000rpm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen angestochen und die Lösung in 500µl Aliquots ausgetropft. 10µl jedes Aliquots wurden über einer Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.1.11). Die enthaltenen gewünschten DNA-Fragmente-Fractionen wurden vereinigt und mit Ethanol gefällt (2.2.1.1).

2.2.1.10 Quick Change Mutagenesis (Stratagene)

Mit Hilfe dieser Methode kann man einzelne Nukleotiden verändern, deletieren oder einfügen. Es werden zuerst zwei komplementäre PCR-Primer definiert, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Ausgangs-dsDNA dient als Matrize, die durch Erhitzen denaturiert wird. Die *Pfu*-Polymerase verlängert ausgehend von den PCR-Primern das Ausgangsplasmid. Die parentale DNA wird dann mit dem Enzym *DpnI* behandelt. Die entstandene lineare DNA wird in kompetente Zellen transformiert, wo sie ligiert wird.

Die PCR wurde nach der im Protokoll (Quick Change site directed Mutagenesis kit) beschriebenen Methode durchgeführt. Dafür wurden die Primer bestimmt, die eine gewünschte Mutation enthalten. Die Länge der Primer muss 25-45nt betragen und deren

Schmelztemperatur (T_m) bei $\geq 78^\circ\text{C}$ liegen. Die Schmelztemperatur wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N$$

N - die Länge des Primers

$\%GC$ - prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin

Für die PCR-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen 50 μl 50ng von DNA, 125ng Primer 1, 2, 200 μM dNTPs, 5 μl *Pfu*-DNA-Polymerase Puffer (10x) und 1u *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Proben wurden mit Öl überschichtet. Die Reaktion wurde mit unten vorliegendem Programm durchgeführt:

N°	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	1 min.
2	18	95°C	50 sec.
		T_m	50 sec.
		X	1 min/kb von Primerlänge
3	1	72°C	7 min.

Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben ohne Öl vereinigt, mit Ethanol gefällt (2.2.1.1), dann mit *DpnI* versetzt und 2h bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise wurde die methylierte Template-DNA entfernt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Hilfe von NukleoTrap®Kit beziehungsweise mit PrepEase™ Gel Extraction Kit aufgereinigt (2.2.1.7; 2.2.1.8). Das PCR-Produkt kann jetzt für die Transformation verwendet werden (2.2.2.2; 2.2.2.3)

2.2.1.11 Agarosegelelektrophorese

Das Agarosegel wurde verwendet, um die DNA-Fragmente zu trennen. In den meisten Fällen wurde für die Trennung der relativ langen DNA-Fragmente 1%-iges Agarosegel benutzt. Es wurden 0,3g Agarose abgewogen, mit 30ml TAE-Puffer versetzt und in einer

Mikrowelle, bis zur vollständigen Auflösung der Agarose, gekocht. Die flüssige Agaroselösung wurde mit 1 mg/ml Ethidiumbromid gemischt, in eine Gelkamera gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Abkühlung der Agarose wurde die Gelkamera mit 1xTAE-Puffer gefüllt und der Kamm gezogen. Die DNA-Proben wurden mit 1/3 Volumen Sucrosefarbmarker gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden in einem elektronischen Feld einer Spannung von 70V getrennt. Nachdem die Probe die Hälfte der Gellänge durchgelaufen hatte, wurde ein Bild von dem Gel in UV-Licht gemacht.

2.2.1.12 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bestimmt. DNA-Konzentration lässt sich mit der folgenden Regel berechnen:

Ein O.D. bei 260nm von 1 entspricht ca. 50 μ g/ml dsDNA.

Ein O.D. bei 260nm von 1 entspricht ca. 33 μ /ml ssDNA

DNA-Lösung wurde entsprechend verdünnt, in eine Messküvette überführt und in ein Photometer gestellt. Die Absorption wurde bei der Wellenlänge von 260nm gemessen. Als Nullwert wurde die Absorption gegen Wasser bestimmt.

2.2.1.13 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Das Prinzip der PCR basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Bereichs, der sich zwischen zwei Oligonukleotid-Primern befindet. Im ersten Reaktionszyklus wird die DNA durch Hitzebehandlung in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung), anschließend werden die beiden Primer anhybridisiert (Annealing). Im nächsten Schritt füllt eine DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTPs die Einzelstränge zum Doppelstrang auf. Durch Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte steigt der Anzahl der zwischen den Primern liegenden DNA-Fragmente exponentiell an. Die Annealingtemperatur (T_A) und Schmelztemperatur (T_M) der Primern werden nach folgenden Formeln berechnet:

$$T_A = [(T_{M1} + T_{M2}) / 2] - 3$$

$$T_M = 69.3 + 0.41 (\%G/C) - 650/N$$

%GC- prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin

N - die Länge des Primers

Die Dauer der Elongationszeit ist von der Länge des erwarteten PCR-Produktes abhängig (1 min/1000bp).

Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50µl durchgeführt. Dafür wurden ca.50ng DNA, 10 pmol von jedem Primer, 200µM von dNTPs, 5µl von *Pfu*-DNA-Polymerase Puffer (10x) und 1u von *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Ansätze wurden mit 25µl Paraffin überschichtet, um die Verdampfung von Wasser aus den Ansätzen zu verhindern.

2.2.1.14 Ligation des PCR-Produktes in den pCR[®]-Blant II-TOPO[®] Vektor (Invitrogen)

Mit dieser Methode wird das PCR-Produkt mit „blunt ends“ in den pCR[®]-Blant II-TOPO[®] Vektor kloniert. Der pCR[®]-Blant II-TOPO[®] Vektor ist linearisiert. Die Ligation wird durch die DNA-Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, die kovalent am 3'-Ende des Vektors gebunden ist, katalysiert. Der Vektor enthält ein *ccdB* Lethalgen, das an C-Terminus von *LacZα*-Fragment gebunden ist. Die Legation des PCR-Produktes in den Vektor verhindert die Expression des *lacZα-ccdB* Gens, nur die Zellen, die den Vektor mit dem Insert aufgenommen haben, wachsen.

Für die Reaktion wurden 2µl aus dem Gel (2.2.1.8; 2.2.1.7) gereinigtes PCR-Produkt mit 1µl „Salz solution“, 1µl pCR[®]-Blant II-TOPO[®] Vektor in einem Endvolumen 6µl gemischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1-2 µl vom Ansatz entsalzt und mit kompetenten Zellen transformiert.

2.2.1.15 Dialyse

Vor der Transformation wurde die DNA-Lösung entsalzen. Dafür wurden Nitrocelluloseplättchen verwendet. Eine Petrischale wurde mit Wasser gefüllt, ein Nitrocelluloseplättchen auf die Wasseroberfläche gelegt und die DNA-Lösung drauf

getropft. Nach 15 min kann die DNA-Lösung mit elektrokompenten Zellen transformiert werden.

2.2.1.16 Klonierung der DNA in den Expressionvektor

Das PCR-Produkt wurde zuerst in den pCR[®]-Blant II-TOPO[®] Vektor kloniert (2.2.1.14), mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (2.2.1.7; 2.2.1.8). Die DNA-Konzentration wurde wie in Methoden 2.2.1.12 beschrieben bestimmt.

Der Expressionvektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten und mit der *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* behandelt (CIAP), um die DNA-5'-Ende zu dephosphorylieren und damit eine Ligation des Vektors ohne Insert zu vermeiden. Der gespaltene Vektor wurde über ein Saccharosedichtegradient gereinigt (2.2.1.9). Die Konzentration vom Vektor wurde photometrisch bestimmt (2.2.1.12).

Für die Klonierung wurden Insert-DNA-Fragmente in ca. 2-3 fachem molaren Überschuss, 100ng-1µg gespaltener und gereinigter Vektor, Ligase-Puffer (x10) und 1u T4-DNA-Ligase zusammengemischt. Der Ansatz wurde bei 15°C über Nacht inkubiert und anschließend mit kompetenten Zellen transformiert (2.2.2.2; 2.2.2.3).

Der 3 fach molare Überschuss wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\text{ng}_{(\text{Insert})} = (\text{ng}_{(\text{Vektor})} \times \text{kb}_{(\text{Insert})} \times 3) / \text{kb}_{(\text{Vektor})}$$

2.2.1.17 „Kolonie-PCR“

Diese Methode ist für eine schnelle Analyse der Klone geeignet. Ein gewünschtes DNA-Fragment wurde aus dem Genom, das sich in der Zelle befindet, isoliert. Dafür wurden zwei Mischungen eingesetzt. Mischung I: 2,5µl Thermo Puffer (10x) wurde bis auf 25µl mit Wasser aufgefüllt. Mischung II: 0,5µl (10pmol) Primer_UP und 0,5µl (10 pmol) Primer_LO, die gewünschtes DNA-Fragment flankieren, wurden mit 1µl (10ng) dNTP, 2,5µl Thermo Puffer(10x), 0,5µl (1u) *Tag*-Polymerase gemischt und auf 25µl aufgefüllt.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden die Zellen eines Klons von Agarplato abgenommen und in 25µl Mischung I resuspendiert. Dazu wurden 25µl Mischung II zugegeben. Die Ansätze wurden mit Öl überschichtet. Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Programm benutzt:

N°	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	98°C	2 min.
2	1	85°C	3 min.
3	30	94°C	1 min.
		x	1 min.
		72°C	2 min.
4	1	72°C	10 min.

Die Schmelztemperatur wurde wie in der Methode 2.2.1.10 beschrieben berechnet. 10µl der Proben wurden auf Agarosegel analysiert (2.2.1.11).

2.2.1.18 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde am Göttinger Genomics Laboratory (G2L) sequenziert. Die Sequenzierung wurde mittels Kettenabbruchmethode durchgeführt. Die Ansätze für die Sequenzierung enthalten die Matrizen-DNA, einen Sequenzierprimer, die DNA-Polymerase und dNTPs mit Farbstoffen markierte als Terminatoren dienende ddNTPs. Während der Polymerisation werden die ddNTPs zufällig eingebaut und die Kette kann nicht mehr verlängert werden. Dadurch entstehen DNA-Ketten unterschiedlicher Länge. Die Farbstoffe der ddNTPs haben verschiedene Emissionsspektren. Die DNA-Ketten werden in einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Wegen der unterschiedlichen Emissionsspektren der Farbstoffe werden die vier ddNTPs zugeordnet und dadurch wird die Sequenz der Matrize bestimmt. Die Sequenzierdaten werden mit dem Programm Chromas[®] analysiert.

2.2.1.19 Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem A.L.F. – Sequenziergerät

Die Oligonukleotide werden mit dem Automated Laser Fluorescence Sequenziergerät (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mittels einer Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Stränge werden mit dem durch das Gel laufenden Laserstrahl detektiert. Die Elektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung des 11%-igen Gels (30 x 28 x 0,5 cm) gezeigt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Polyacrylamidgeles.

*- die Chemikalien wurden vor dem Gießen zugemischt.

Chemikalien	Volumen (Endkonzentration)
Harnstoff	29,43 g (7M)
Acrylamid (30%)	24,84 ml (10,65%)
Bisacrylamid (2%)	12,42 ml (0,65%)
10 x TBE	8,4 ml (1,2%)
APS* (10%)	700µl (1%)
Temed*	70 µl (0,1%)

Thermoplatte und Glasplatte wurden vor dem Gießen des Geles mit Wasser, Ethanol (70%) und Esopropanol gewaschen. Die Lösung wurde durch einen Filter (Porengröße 0.2µm) sterilfiltriert und zwischen die Platten gegossen. Das Gel wurde 30 min polymerisiert. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet. Die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 52°C, 2mW Lasepower, 40 Watt konstanter Leistung, 2s Aufzeichnungsintervall. Die Fluoreszenz wurde nach ca. 140 min mit der *A.L.F. Manager* Software registriert. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm *Fragment Manager*.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von P1-Lysat und P1-Transduktion

Durch Transduktion mit dem Bacteriophagen P1 können Gene von einem Bakterienstamm in einen anderen übertragen werden. Für eine erfolgreiche Transduktion braucht man ein Phagenlysate mit einem Titer von mindestens 10^{10} pfu/ml. Zunächst wurde der Phage P1 auf einem Bakterium (Donor) vermehrt. Dafür wurde der Donor über Nacht in LB-Medium mit 0,5mM CaCl₂ und 0,2% Glukose angezogen. 200µl der Übernachtskultur wurden in 10ml LB+ 0,5mM CaCl₂ und 0,2% Glukose angeimpft und 1h geschüttelt. Dann wurden 100µ P1-Lysat zugegeben und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur mit 2 Tropfen CH₃Cl 10 min geschüttelt und

abzentrifugiert (RT, 4000rpm). Der Überstand mit Phagenpartikeln wurde in ein anderes Gefäß überfüllt. Für die Bestimmung des Titers wurde eine Verdünnungsreihe des P1-Lysates mit MC-Puffer von 1:10 bis 1:10¹⁰ hergestellt. 1ml von jeder Verdünnung wurde mit 0,5ml Donorzellen (O.D. 0,6) 15 min bei 37°C inkubiert, mit 4 ml R-Weichagar auf R-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Für die Transduktion wurden 2ml von der Recipientstamm in LB-Medium über Nacht angezogen. Die Zelle wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (6000rpm, 5 min, RT) und in 1ml LB+100mM MgSO₄ + 0,5mM CaCl₂ resuspendiert. Es wurden 4 Ansätze vorbereitet: A. 100µl des unverdünnten Lysates + 100µl der Recipientzellen. B. 100µl des 1:10 verdünnten Lysates + 100µl der Recipientzellen. C. 100µl LB + 100µl der Recipientzellen. D. 100µl des unverdünnten Lysates + 100µl LB. Die Proben wurden durch Schwenken gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Um die für die Infektion notwendige Ca²⁺-Ionen zu komplexieren, wurden 200µl 1M Na-citratlösung zu den Proben gegeben und mit 1ml LB 1h bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (6000rpm, 5 min, RT), in 100µl LB + 100mM Na-citratlösung resuspendiert, auf antibiotikahaltige Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Klone wurden mittels PCR analysiert. (2.2.1.17).

2.2.2.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

500µl Übernachtkultur des gewünschten Bakterienstammes wurden in 50ml DYT-Medium angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer O.D.₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Zelle wurden bei 4°C 10 min. 4000rpm abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem Wasser mit der Pipette resuspendiert. Die Zelllösung wurde 20 min auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 40 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Der Waschschrift wird mit 30, 20, 10 ml eiskaltem Wasser wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 500µl Wasser aufgenommen.

Für die Transformation wurden 75µl Zellsuspension mit 2µl salzfreier DNA gemischt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden bei Spannung von 2500 V, Kapazität 25µF und Widerstand von 20 Ω transformiert, sofort in 3 ml DYT-Medium verdünnt, 1h bei 37°C inkubiert und auf Selektivplatten ausplattiert.

2.2.2.3. Herstellung kompetenter Zelle nach RbCl-Methode und Transformation

1ml Übernachtskultur wurde in 50 ml DYT-Medium angeimpft und bei 37°C 2h inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 4°C 10 min 4000rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C 10 min 2000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 2ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert.

Für die Transformation wurden 100µl kompetente Zellen und 1-10µl DNA (1-10ng) gemischt. Die Mischung wurde auf Eis 20-30 min inkubiert und für 90 sec auf 42 °C erhitzt. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz für 2 min erneut auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml DYT-Medium verdünnt, 1h bei 37°C gerollt und auf Selektivplatten ausgestrichen.

2.2.2.4 Herstellung der Glycerinkulturen des Bakterienstamms

Für die längere Lagerung der Stämme wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dafür wurde 1ml Übernachtskultur eines Bakterienstammes mit 2ml 86% Glycerin sorgfältig gemischt und bei -20°C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden die Glycerinkulturen bei -80°C eingefroren.

2.2.2.5 Komplementationsexperiment (nach Cunningham, *et al.*, 1986)

E. coli K12 BW25113 Δ *xthA* Stamm wurde mit den pKK223-3/Mma3148 und pKK223/Mma3148/A118M/M209Y Konstrukten transformiert und auf den Selektivplatten (Amp¹⁰⁰, Kan⁵⁰) ausplattiert. Ein Klon wurde dann in flüssigem Selektivmedium über Nacht hochwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur 10 x fach in frischem dYT-Medium mit 0,1%-Glukose verdünnt und weitere 5h bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde dann in 50mM Phosphat Buffer pH 7,4 in Schritten 1:10 bis 1:10⁶ verdünnt. Die Arbeit mit Mitomycin C wurde in der Dunkelkammer durchgeführt. Mitomycin C (10, 20, 30µg/ml) wurde zum 3 ml Weichagar bei 46°C zugemischt. Zu der Mischung wurden sofort 100µl der vorbereiteten Zelllösung zugegeben, kurz gevortext und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 1 Tag bei 37°C inkubiert und alle Klone gezählt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen IMAC

Die Reinigung des untersuchten Proteins aus dem Gesamtprotein von *E. coli* erfolgt mit einem His-Tag über IMAC.

Dafür wurde eine IMAC-Säule hergestellt. Sepharase wurde mit ca.10ml Wasser gewaschen und in eine Säule gepackt. Auf die Säule wurden 3 ml 100mM NiCl₂ gegeben und anschließend ausgetropft. Die Säule wurde dann mit 25mM HEPES/KOH, 0,5M NaCl, pH 7,6 äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die IMAC-Säule gegeben und durchlief sie unter Gravitationskraft. Das Protein wurde am Ni-Sepharasematrix gebunden und dann mit steigender Konzentration von Imidazol im 25mM HEPES/KOH, 0,5M NaCl, pH 7,6 (30, 60, 70, 80, 90, 100, 300, 500mM) eluiert. Von jeder Durchlaufraction wurde eine Aliquots (10µl) über SDS-PAGE analysiert (2.2.3.2).

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Gelfärbung

Zur Auftrennung von Proteinen nach Molekularmasse und der Bestimmung der Reinheit von Proteinen wird SDS-PAGE verwendet. Die Proteinen werden wegen ihrer Ladung im elektrischen Feld im SDS-Puffer getrennt, wobei die kleinsten Proteine das Gel schneller durchlaufen. Die Zusammensetzung des Gels ist in Tabelle 3 gegeben.

Aluminiumoxidplatten, Glassplatten und 2 Spacer werden zusammengebaut und in die Gießkamera eingelegt. Das Trenngel wird zu 3/4 gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Erstarrung des Trenngels wird 2-Propanol entfernt, das Sammelgel gegossen und die Kämme zwischen die Aluminiumoxidplatten und die Glassplatten gesteckt. Nach der Polymelesierung des Sammelgels können die SDS-Gele benutzt werden.

Ein SDS-Gel wird in die Pufferkamera gesteckt, die Kämme vorsichtig gezogen und die Kamera mit Laufpuffer (Lamml-Lösung) gefüllt. Die Proben werden mit HOECHST-Puffer gemischt, bei 95°C 10 min inkubiert und ins Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 20V. Das Gel wird bis zur Erreichung des Farbmarkers am unteren Ende des Gels laufen gelassen.

Nach der Elektrophorese wird das Gel mit Coomassie-Blau 30 min. gefärbt. Nach der Färbung wird das Gel im Wasser für 5-10 min in einer Mikrowelle gekocht, um der Hintergrund zu entfärben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des SDS-Gels (15%).

60.03 ml Trenngel und 35,2 ml Sammelgel reichen für 10 Gele. * werden vor dem Giessen zugemischt.

Trenngel (15%)		Sammelgel (5%)	
Acrylamid/Bisacrylamid 30	30 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 30	5,9 ml
1,875 M Tris-HCl, pH 8,8	12 ml	1,25 M Tris-HCl, pH 6,8	3,5 ml
SDS (10%)	600µl	SDS (10%)	350µl
H ₂ O	17,2 ml	H ₂ O	25,3ml
APS* (10%)	200 µl	APS* (10%)	120 µl
TEMED*	30 µl	TEMED*	35 µl

2.2.3.3 Proteinaufreinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Heparin-Affinitätschromatographie wird zur Reinigung von DNA-bindenden Proteinen verwendet. Heparin ähnelt dem negativ geladenen DNA-Rückgrad und die positiv geladenen DNA-bindenden Proteine können an Heparin immobilisiert werden.

Die Säule (Säulenmaterial POROS[®] HE 20, Pharmacia, Freiburg) wurde an der computergesteuerten Anlage (BioCard[®] PerSeptive Biosystems) mit der Software *Vision* angeschlossen, es ermöglicht, die Flussrate, Zusammensetzung von Lösungen und Elutionsvolumina einzustellen. Während der Chromatographie wurden der pH-Wert, der Druck und die Absorption bei 280 und 260nm gemessen.

Zunächst wurde die Säule mit einer 1M NaOH-Lösung bei eine Flussrate von 4ml/min bis pH 14 gewaschen. Danach wurde die Säule mit 20mM HEPES/KOH, pH 7,6 bis pH 7,6 gespült. Die einkonzentrierte Proteinlösung wurde mit 20mM HEPES/KOH, pH 7,6 auf 50ml verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nach der Proteinaufnahme wurde die Säule mit dem gleichen Waschpuffer ca. 20 min gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt mit dem Gradient von 0-1,5 M NaCl. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden auf einer SDS-PAGE (2.2.3.2) analysiert. Die Fraktionen mit dem gereinigten Protein wurden vereinigt, einkonzentriert (2.2.3.8), mit Glycerol gemischt und bei -20°C gelagert (2.2.3.8).

2.2.3.4 Gelfiltration

Diese Methode ist für die Reinigung von Proteinen nach dem Molekulargewicht geeignet. Sie beruht darauf, dass die Gelfiltrationsmaterialien wie ein Molekularsieb wirkt und die Moleküle nach ihrer Größe trennt. Die großen Moleküle werden früher eluiert, die kleinen Moleküle dringen in die Poren ein und werden später eluiert.

Es wurde eine Superdex™ 200 Gelfiltrationssäule verwendet. Vor Beginn der Filtration wurde die Säule gründlich mit 1M NaOH bis pH 14 gewaschen und dann mit sterilfiltriertem 20mM HEPES/KOH, pH 7,6 Puffer äquilibriert. Die Säulereinigung und die Äquilibrierung erfolgt bei einem Druck bis 0,3 Pa und bei einer Geschwindigkeit von 1ml/min. Auf die Säule wurden 500µl Proteinlösung aufgetragen. Die aufgefangenen Fraktionen wurden über einen SDS-PAGE analysiert (2.2.3.2).

2.2.3.5 Genexpression

Die Expressionskultur wurde mit dem das Protein kodierenden Plasmid transformiert und über Nacht in 50 ml dYT-Medium bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das DYT-Medium (1L) mit der über Nacht gewachsenen Kultur (20 mL) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 37°C wachsen gelassen. Die Expression von Protein wurde durch die Zugabe von 1mM IPTG induziert und die Kultur weiter 3 h oder über Nacht bei 30°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Zelle abzentrifugiert (4°C, 4000rpm, 30 min., Rota Silenta/RP, Hettich), das Pellet in 25mL 25mM HEPES KOH pH 7,6, 0,5M NaCl resuspendiert, in SS-34 Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (4°C, 9000rpm, 30 min., SS34 Rotor, Sorval® RC5C, Kendo) Das Pellet wurde bei -80°C über Nacht eingefroren. Das eingefrorene Pellet wurde in 20 mL 25mM HEPES KOH pH 7,6, 0,5M NaCl resuspendiert und 3 min. sonifiziert (Output control 5, Duty cycle 50, Sonifier W-250, Heinemann). Die Zelle wurden mittels eines *Cell-disrupters* (Constant Cell Disruption System, Constant Systems Ltd) zerstört und noch mal abzentrifugiert (4°C, 15000 rpm, 30 min. SS34 Rotor). Der Überstand wurde für die Proteinaufreinigung mittels IMAC verwendet (2.2.3.1).

2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde photometrisch gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beerischen Gesetzes über den berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) und die gemessene Absorption wurde die Proteinkonzentration berechnet:

$$C = \frac{A}{\epsilon \times d}$$

A-Absorption
 C-Konzentration
 d-Schichtdicke von einer Messküvette
 ϵ -Extinktionskoeffizient

Der Extinktionskoeffizient kann man nach folgende Gleichung berechnen:

$$\epsilon_{280} = \sum \text{Trp} \times 5500 + \sum \text{Tyr} \times 1490 + \sum \text{Cystine} \times 125$$

Die Absorption wurde bei 260 und 280 nm gemessen. Das Verhältnis 260/280 bestimmt die Reinheit der Proteinlösung und für reine Proteinlösung liegt bei ca. 2.

2.2.3.7 Herstellung der Substrate für die Glykosylase- und Endonuklease- Assays und Aktivitätsassay

Für die Glykosylase- und Endonuklease- Assays wurden 5 pmol des Fluoreszenzmarkierten Stranges mit 25 pmol des Gegenstrang in 100µl SSC-Puffer hybridisiert (Thermocyclers: Primus96^{plus}, Programm: 90°C, 15 sec; 80°C, 3 min; 50°C, 15 min; 20°C, 15 min). Die Substraten wurden dann 1:5 mit Wasser verdünnt (Endkonzentration 0,01 pmol).

2.2.3.8 Konzentrierung und Lagerung von Proteinlösungen

Für die Einkonzentrierung von Proteinlösungen wurden Ultrafiltrationsröhrchen benutzt (Vivaspin, Vivascience®). Der Konzentrator besitzt einen Filter, der die Einkonzentrierung des Proteins von 3000 bis 30000 kDa erlaubt. Bei der Zentrifugation (4°C, 3000rpm) werden die Proteine, die das kleinere Molekulargewicht haben, Salz und Puffer durch den Filter laufen. Nach dem Erreichen des gewünschten Volumens wurde die Proteinlösung abgezogen, mit 86% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Isolation und Charakterisierung des ExoIII-Homologs Mma3148 aus *Methanosarcina mazei*

Die Suche in der NCBI Datenbank nach einem mesophilen archaealen ExoIII-Homolog, das eine hohe Sequenzverwandtschaft zu Mth212 aufweist, hat ein ExoIII-Homolog aus einem mesophilen Archaeon *Methanosarcina mazei* (Mma3148) ergeben (Georg *et al.*, 2006). Mth212 wurde mit Mma3148 und vier ExoIII-Homologen, die auf U-Endoaktivität geprüft wurden, verglichen (Tabelle 4). *Methanococcus maripaludis* ExoIII (Schomacher L., 2007, diese Arbeit), *Bacillus subtilis* ExoIII (Krietenstein, N. dieses Labor, unpubliziert), *Homo sapiens* ExoIII (Georg J., 2005, diese Arbeit), *Escherichia coli* ExoIII (Georg J., 2005, diese Arbeit) weisen eine signifikante Sequenzverwandtschaft mit Mth212 auf, aber U-Endoaktivität wurde bei diesen ExoIII-Homologen nicht festgestellt. Die Sequenzverwandtschaft von Mth212 mit Mma3148 ist wesentlich höher, was nicht erstaunlich ist, weil beide Proteine zur archaeellen Domäne gehören. Jedoch ist im Vergleich mit einem Vertreter aus dieser Domäne (*M. maripaludis*) die Sequenzverwandtschaft von Mth212 mit Mma3148 größer. Deshalb ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass Mma3148 ähnliche Eigenschaften hat, größer. Mma3148 wurde kloniert, das Protein gereinigt und untersucht.

Tabelle 4: Vergleich der Sequenzidentität bzw. Sequenzähnlichkeit von Mth212 mit Mma3148 und charakterisierten ExoIII-Homologe.

Die Sequenzen wurden paarweise mit dem Programm blastp verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Es ist der prozentuale Anteil der Sequenzidentität bzw. Sequenzähnlichkeit angegeben.

Domäne	Organismus	<i>M. thermotrophicus</i> (Mth212)	
		Ähnlichkeit	Identität
Archaea	<i>M. mazei</i> (Mma3148)	76%	56%
	<i>M. maripaludis</i> (MMP1012)	65%	42%
Bacteria	<i>B. subtilis</i> (ExoA)	63%	45%
	<i>E. coli</i> (XthA)	50%	30%
Eukaryota	<i>H. sapiens</i> (HAPI)	60%	41%

3.1.1 Produktion und Reinigung von Mma3148

Das Gen (Mma3148) wurde von Jens Georg über NcoI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen in den pET_B_001 Vektor (2.2.1.16) ligiert (Georg *et al.*, 2006). Die Sequenz befindet sich in Anhang (5.2.12). Das Genprodukt wurde dadurch mit einem C-terminalen aus 6 Histidinen bestehenden *Tag* versehen, um die Reinigung mittels IMAC zu ermöglichen. Die korrekte Nukleotidsequenz wurde per Sequenzanalyse bestätigt (2.2.1.18). Um Kontamination mit *E. coli* Ung-Protein zu vermeiden, wurde das Gen im BL-21_UX Stamm (2.2.3.5) exprimiert, dessen *ung*-Gen eliminiert wurde (Schomacher, 2007). Das Protein wurde mittels IMAC (2.2.3.1) und Heparin-Affinitätschromatographie (2.2.3.3) gereinigt. Der Ablauf der Heparin-Affinitätschromatographie und die Analyse des gereinigten Proteins per SDS-PAGE sind in Abbildung 11 zu sehen. Das theoretische Molekulargewicht von Mma3148 beträgt 30,786 kDa (einschließlich Hexahistidin-*Tag*). Aus 2 L *E. coli* Kultur ließen sich ca. 6,9mg Mma3148 präparieren.

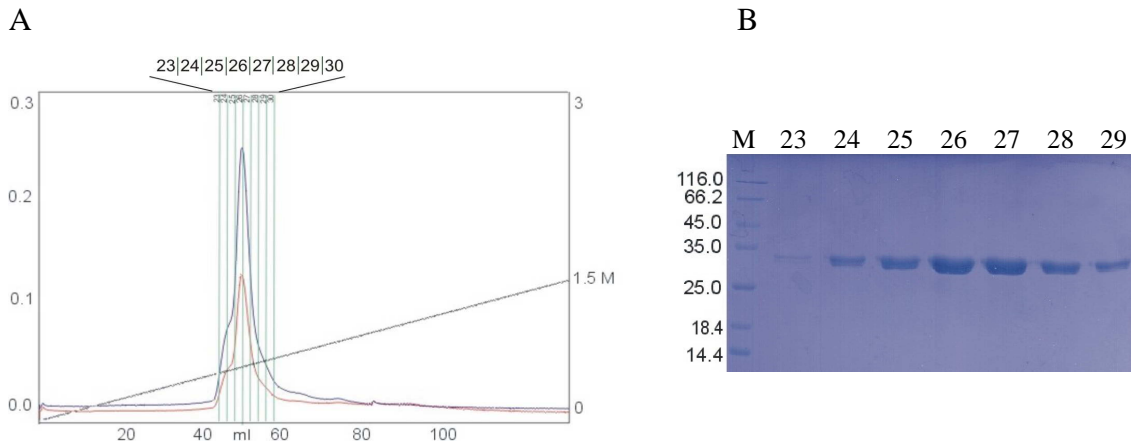


Abbildung 11: Reinigung von Mma3148.

(A) Verlauf der Heparin-Affinitätschromatographie. Absorptionsmessung des Eluats der Heparinsäule bei 280 nm (Blaue Linie) und 260 nm (rote Linie). Die Skala links zeigt die Absorption bei 280 nm. Die Skala rechts zeigt die NaCl-Konzentration. Die schwarze Linie zeigt die NaCl-Konzentration des Elutionspuffers. Die grünen Linien markieren Beginn und Ende einzelner Fraktionen. Unten ist das Volumen in Milliliter angegeben. (B) Analyse der Fraktionen nach der Heparin-Affinitätschromatographie per SDS-PAGE. M: *Protein Molecular Weight Marker* (Fermantas, 2.1.6.2), relative Molmassen $\times 10^{-3}$ links angegeben. Oben sind die Nummern der Fraktionen angegeben. Die Fraktionen 25-28 wurden vereinigt und einkonzentriert.

3.1.2 Enzymologische Charakterisierung von Mma3148

Mma3148 wurde von Jens Georg als eine AP- Endo- und 3'→5' Exonuklease beschrieben. Trotz einer sehr hohen Sequenzähnlichkeit zu Mth212 wurde bei Mma3148 keine U-Endo-Aktivität nachgewiesen. Jedoch wurde der Test auf U-Endoaktivität nur an einem U/G Substrat durchgeführt und die Interpretation der Ergebnisse wurde durch die 3'→5' Exonuklease-Aktivität erschwert. Die Aktivität des Proteins wurde an anderen Uracil-haltigen Substraten (U/T, U/C, U/A) nicht getestet.

Basierend auf den von Jens Georg erzielten Ergebnissen wurde die Charakterisierung von Mma3148 fortgeführt. Das Problem war die starke 3'→5' Exonuklease-Aktivität, die eine Unterscheidung zwischen einer spezifischen Endonuklease-Aktivität und einer unspezifischen Exonukleaseaktivität erschwert hat. Deshalb wurden zwei Substrate vorgeschlagen, die gegen den exonukleolytischen Abbau schützen sollen. Das erste Substrat besteht aus einem fluoreszenzmarkierten 40mer oberen Strang, der mit 5 RNA Nucleotiden am 3'-Ende versehen ist und einem 35mer unmarkierten unteren Strang. Nach der Hybridisierung entsteht ein Substrat mit *blunt ends*. Nach unserer Vermutung liefern die RNA-Nucleotide Schutz gegen den exonukleolytischen Abbau. (Abbildung 12A). Das

zweite Substrat besteht aus einem 40mer fluoreszenzmarkierten oberen Strang und einem 40mer unmarkierten unteren Strang, so dass nach der Hybridisierung ein Substrat mit einem Überhang aus 5 Nukleotiden am 3'-Ende entsteht (Abbildung 13A). Da ein Überhang aus 4 Nukleotiden am 3'-Ende die 3'→5' exonukleolytische Aktivität von *E. coli* ExoIII verhindert (Shida, T. *et al.*, 1996), wurde erwartet, dass ein Überhang aus 5 Nukleotiden auch für Mma3148 als ExoIII-Homolog kein Substrat ist und damit kann die 3'→5' Exonuklease-Aktivität unterbunden werden.

Nach der Reinigung wurde das Protein auf sämtliche Aktivitäten getestet. Im Labor wurde mit einer thermostabilen Uracil-prozessierenden Endonuklease (Mth212) gearbeitet, deren Aktivitätsoptimum bei 65°C liegt; jedoch wurde eine schwache Aktivität bei 37°C festgestellt (Georg J., 2005, dieser Arbeit, Seite 80). Deshalb wurden einige Kontrollexperimente zum Ausschluss der Kontamination mit Mth212 (z.B. aus den verwendeten Laborgeräten) notwendig. Das Kontrollexperiment wurde bei 65°C durchgeführt. Bei der Inkubation bei 65°C denaturiert das mesophile Protein und verliert seine Aktivität, so dass nur die Aktivität der vermuteten Kontamination detektiert werden kann (Abbildung 12B). Zusätzlich wurde eine „Kontrolle in der Kontrolle“ durchgeführt. Mit dem Test kann die mögliche Kontamination der Probe mit Mth212 verfolgt werden. In diesem Fall wurden Mma3148 und Mth212 in einem Verhältnis von 250:1 gemischt und der Test wurde unter den selben Bedingungen wiederholt (Abbildung 12B).

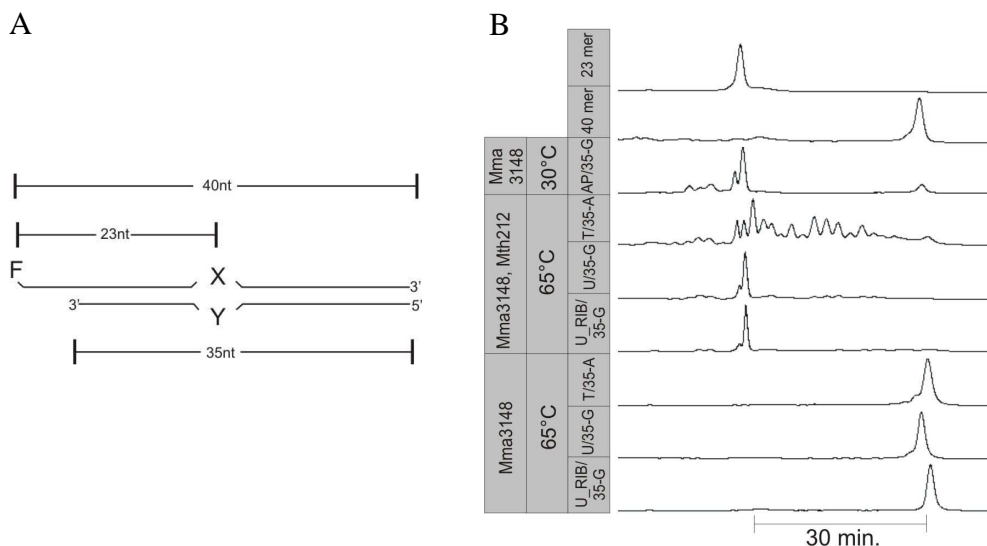


Abbildung 12: Kontrollexperimente zum Ausschluss der Kontamination mit Mth212.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Außer Y ist der 35mer Strang komplementär zu dem 40mer Strang. Für die dsDNA wurde der markierte Strang (40 mer) mit einem unmarkierten Strang (35 mer) hybridisiert. (X) steht für Uracil, Thymin oder AP-Stelle. (Y) steht für Adenin und Guanin. (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. 60 pmol Mma3148 wurden vor der Zugabe der DNA für 10 in

20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$ vorinkubiert. Nach der Zugabe der DNA (0,12 pmol) wurden die Probe für weitere 20 min inkubiert. „Kontrolle in der Kontrolle“: 60 pmol Mma3148 und 0,24 pmol Mth212 wurden gemischt, 10 min bei $65^\circ C$ ohne DNA vorinkubiert und nach der Zugabe der DNA noch 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit A.L.F.-Marker gestoppt.

Aufgrund der Abwesenheit jeder detektierbaren Aktivität beim Test von Mma3148 bei $65^\circ C$ wurde eine Verunreinigung mit Mth212 ausgeschlossen. Da Mma3148 bei $65^\circ C$ inaktiv ist, war in der Proteinmischung nur die Aktivität von Mth212 zu sehen, nämlich AP- Endo-, U-Endo- und $3' \rightarrow 5'$ Exonuklease-Aktivität.

Die Aktivität von Mma3148 wurde bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 40:1 bei $30^\circ C$ (Abbildung 13C) und bei $37^\circ C$ (Abbildung 13D) getestet.

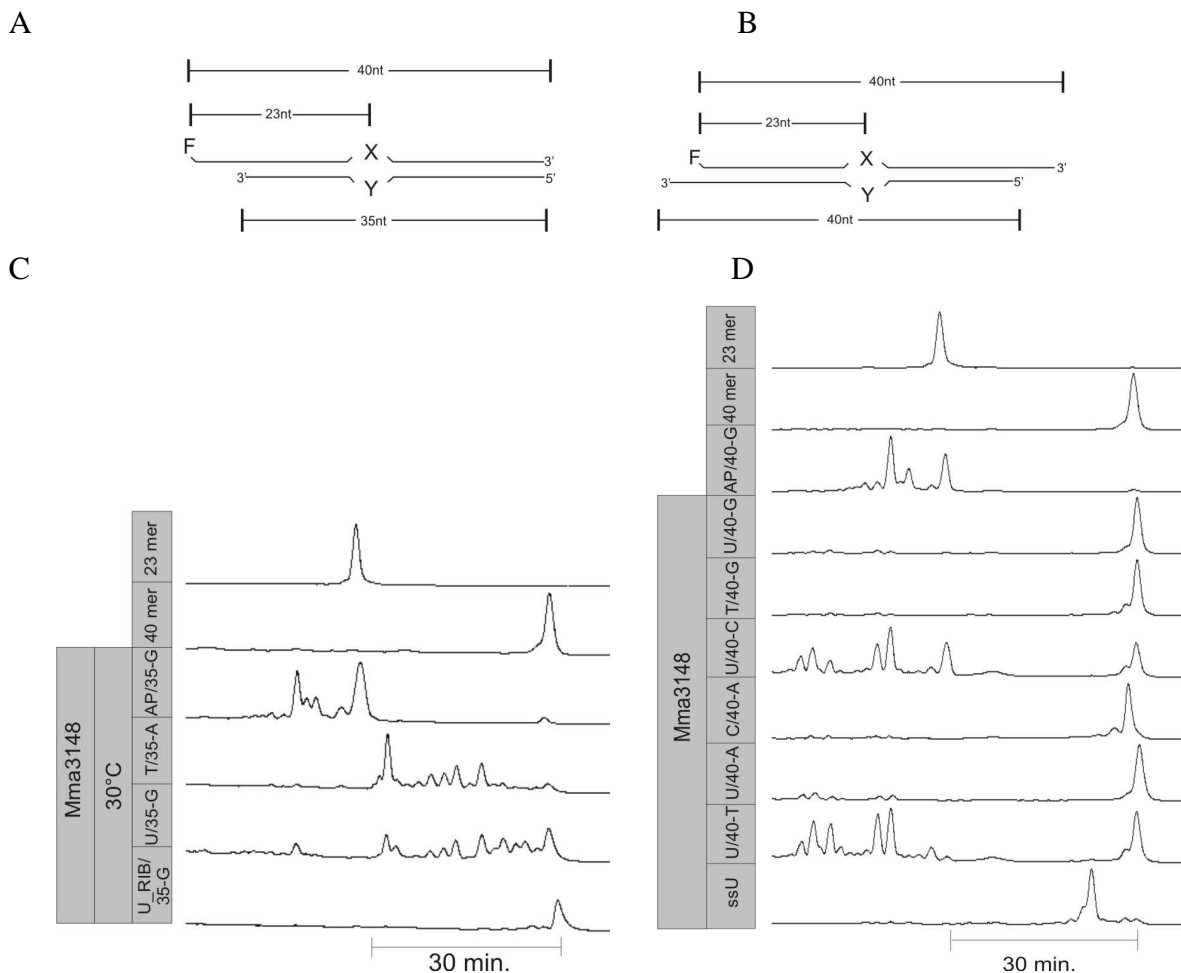


Abbildung 13: Aktivitätstest von Mma3148.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 12. (B) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Für die dsDNA wurde der markierte Strang (40 mer) mit einem unmarkierten Strang (40 mer) hybridisiert. (X) steht für Uracil, Thymin, Cytosin oder AP-Stelle. (Y) steht für Adenin, Thymin,

Cytosin und Guanin. Nach der Hybridisierung entsteht ein Substrat mit einem Überhang aus 5 Nucleotiden am 3'-Ende. (C) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Für die Reaktion wurden 60 pmol Mma3148 mit 0,12 pmol angegebenen Substraten in 50 µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 50mM KCl, 1mM MgCl₂ bei 30°C für 20 min. inkubiert. (U_RIB/G: Das Substrat ist mit den 5 RNA Nucleotiden am 3'-Ende gegen Exonukleaseaktivität geschützt). (D) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Messung der Aktivität von Mma3148 an den AP/40-G, U/40-G, T/40-G, U/40-C, C/40-A, U/40-A, U/40-T, ssU Substraten. Es wurden 4,8 pmol Mma3148 mit 0,12 pmol angegebenen Substraten in 50µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 1mM MgCl₂ bei 37°C für 20 min inkubiert.

Unter den verwendeten Bedingungen erwies sich Mma3148 als sehr aktive AP-Endonuklease (Abbildung 13C, Spur AP/35-G; Abbildung 13D, Spur AP/40-G) und 3'→5' Exonuklease (Abbildung 13C, Spur U/35-G und T/35-G). Die vorgeschlagenen gegen den exonukleolytischen Abbau geschützten Substrate (X/40-G und U/35-RIB_G) haben die 3'→5' Exonuklease-Aktivität effektiv unterbunden (Abbildung 13C, Spur U/35-RIB_G und Abbildung 13D, Spur von AP/40-G bis U/40-T). Das Protein griff die U/40-G, T/40-G und C/40-A Substrate nicht an. Die erzielten Ergebnisse haben die Ergebnisse von J. Georg bestätigt. Erstaunlicherweise wurde eine signifikante U-Endo-Aktivität gegenüber biologisch irrelevanten U/T und U/C Fehlpaarungen entdeckt. Die Uracilprozessierung gegenüber Adenin wurde sehr schwach detektiert. Die Ereignisse an dem ssU Substrat werden im Kapitel 3.1.3 diskutiert.

Eine plausible Erklärung dieser überraschenden Ergebnisse liefert die unten dargestellte Hypothese. Für die Ausbildung einer stabilen Basepaarung sind mindestens zwei Wasserstoffbrücken zwischen Basenpaaren notwendig (Babura A. D., 2001). Um die Wasserstoffbrücken auszubilden, müssen bei beiden Basen Donor- und Akzeptorstellen vorhanden sein. Die Basen-Paare A-T und G-C sind stabiler als andere mögliche Kombinationen, da sie passende Donor- Akzeptorstellen in den Nucleobasen aufweisen (Babura A. D., 2001). Die Watson-Crick-Basenpaare passen durch die Verteilung der Elektronen ideal zueinander. Die höhere Stabilität der Watson-Crick-Basenpaare liegt auch an der geometrischen Komplementarität der Basen, A mit T und G mit C. Die geringe Stabilität der Nicht-Watson-Crick-Basenpaare (in unserem Fall U/C, U/T) kann Grund dafür sein, dass U leicht beseitigt werden kann (Voet J., Voet G., 1992). Aus diesem Grund wurde das Substratspektrum erweitert. Das Experiment wurde unter denselben Bedingungen mit den Substraten T/40-C, T/40-T, C/40-C, C/40T wiederholt (Abbildung 14).

Unter den verwendeten Bedingungen wurde keins der Substrate (T/T, T/C, C/T, C/C) angegriffen. Mma3148 ist also eine DNA-Uridin-Endonuklease mit guter Diskriminierung gegen Thymin und Cytosin.

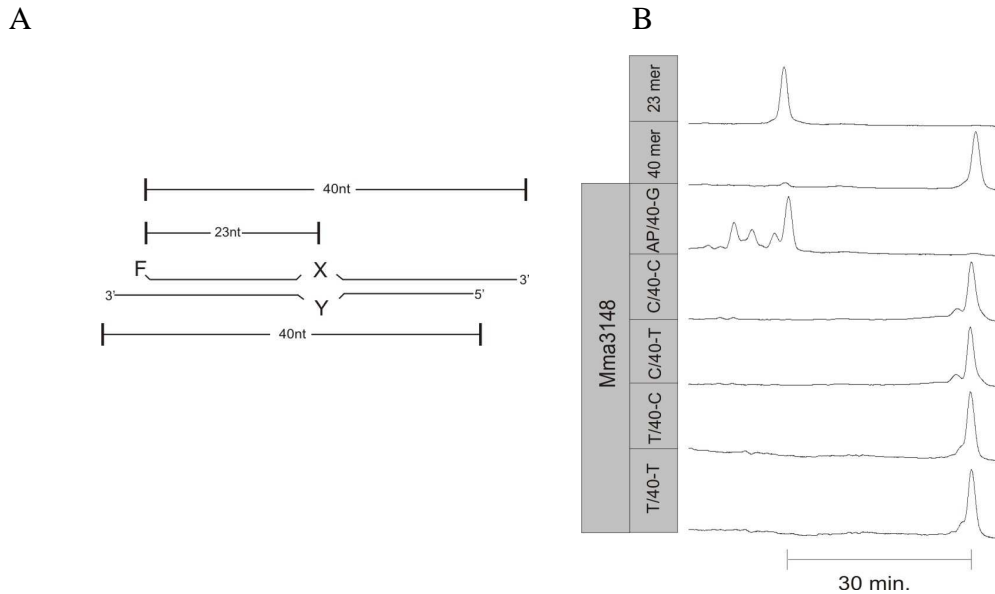


Abbildung 14: Erweitertes Substratspektrum von Mma3148.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Messung der Aktivität von Mma3148 an den C/40-C, T/40-C, T/40-T, C/40-T Substraten. Es wurden 4,8 pmol Mma3148 mit 0,12 pmol der angegebenen Substraten in 50µl 20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1mM $MgCl_2$ für 20 min bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Aktivität von Mma3148 an einzelsträngiger DNA.

Die Aktivität von Mma3148 am einzelsträngigen Substrat ssU liefert ein Produkt 36mer (Abbildung 13 Spur: ssU). Dieses Ergebnis kann nicht durch die exonukleolytische Aktivität erklärt werden. Das vorher besprochene Substrat mit dem 5 Nukleotiden Überhang am 3'-Ende gibt zuverlässigen Schutz gegen den exonukleolytischen Abbau. In Abbildung 15 sind die Ereignisse an dem Substrat U/35-G und zum Vergleich an dem U/40-G Substrat dargestellt.

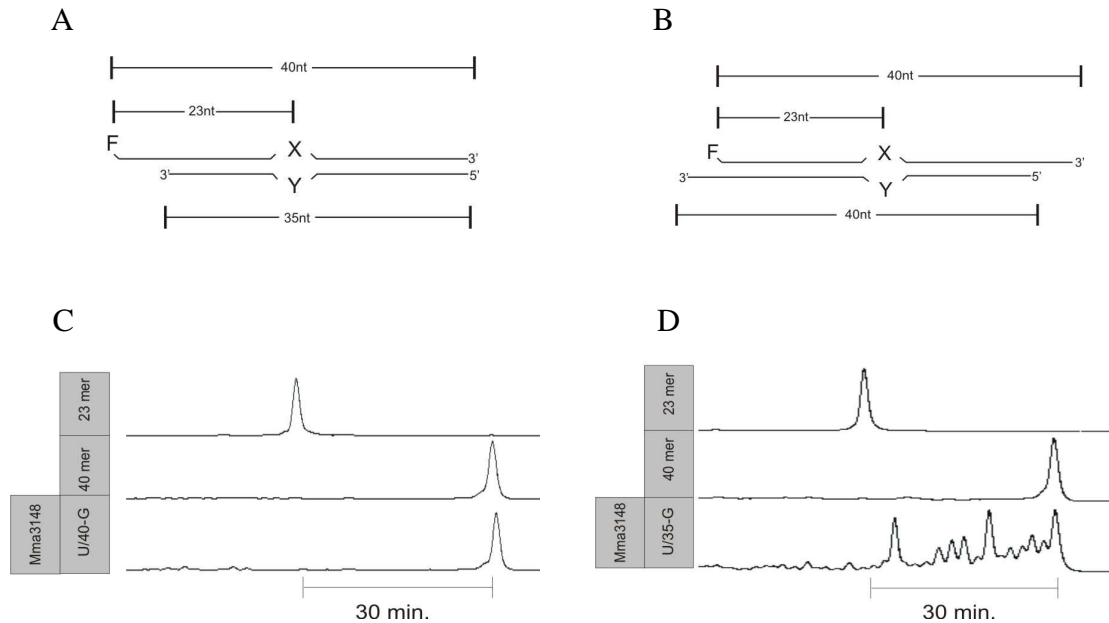


Abbildung 15: Aktivität von Mma3148 an U/40-G und U/35-G Substrate.

(A-B) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildungen 12 und 13. (C) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Messung der Aktivität von Mma3148 an den U/40-G (D) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Messung der Aktivität von Mma3148 an den U/35-G. Es wurden 4,8 pmol Mma3148 mit 0,12 pmol angegebenen Substraten in 50µl 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 1mM $MgCl_2$ für 15 min bei 37°C inkubiert.

An dem U/35-G Substrat wurde eine deutlich ausgeprägte exonukleolytische Aktivität detektiert. An dem U/40-G wurde keine exonukleolytische Aktivität nachgewiesen.

Von Jens Georg wurde eine Arbeitshypothese vorgeschlagen, die diese Ereignisse am einzelsträngigen Substrat erklärt. Die einzelsträngige DNA bildet eine Sekundärstruktur aus, die von dem Protein abgebaut werden kann (Georg J., Diplomarbeit, 2005). Die Struktur des Substrates wurde für eine Temperatur 37°C mit dem webbasierten Tool RNAfold berechnet (Hofacker, 2003). Das Experiment wurde bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 40:1 durchgeführt. Die Reaktionsprodukte und die vorhergesagte Struktur sind in Abbildung 16 dargestellt.

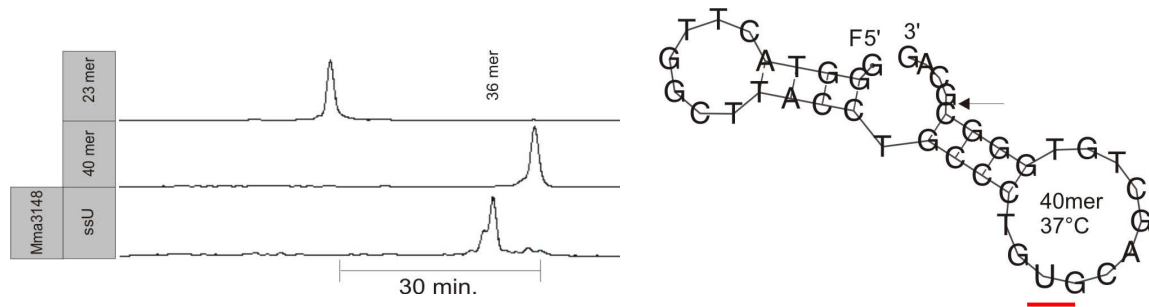


Abbildung 16: Aktivität von Mma3148 am einzelsträngigen Substrat ssU.

Links ist die Analyse der Aktivität von Mma3148 an ssU mittels ALF-PAGE zu sehen. Rechts ist die Struktur des einzelsträngigen ssU Substrats bei 37°C abgebildet. Die Struktur wurde durch das Programm RNAfold vorhergesagt (SantaLucia, 1998). Der Pfeil zeigt die von Jens Georg vorhergesagte endonukleolytische Schnittstelle. Einzelsträngige ssU DNA (0,12pmol) wurde bei 37°C in 50µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 1mM MgCl₂ vorinkubiert, danach wurde mit 4,8pmol des Proteins für weitere 15min bei 37°C inkubiert.

Die Struktur bildet einen doppelsträngigen Bereich vom 3'-Terminus, der als Substrat für Mma3148 dienen könnte. Durch einen endonukleolytischen Schnitt kann ein 36mer Peak erzeugt werden (die Stelle des Schnittes mit einem Pfeil in Abbildung 16 markiert). Durch die Aktivität von Mma3148 wurde ein Produktpeak des 36mers erzeugt, was mit der Arbeitshypothese übereinstimmt. Die Aktivität von Mth212 wurde von L. Schomacher am ssT Substrat getestet und das Ergebnis hat die Arbeitshypothese bestätigt (Schomacher L., 2007). Jedoch haben weitere Experimente mit den verschiedenen Einzelstrangsubstraten vorhergesagter und definierter Strukturen keine deutlichen Erklärungen der Aktivität am einzelsträngigen Substrat geliefert (Elena Ciirdaeva, unpubliziert).

3.2 Charakterisierung des TUDGA-Homologs aus *Methanosarcina mazei* (Mma.TUDGA).

Wie festgestellt wurde, ist Mma3148 eine U-Endonuklease, die U-Endoaktivität lediglich gegenüber den biologisch irrelevanten Fehlpaarungen U/T und U/C hat. Die Frage, welches Enzym die U-DNA-Reparatur in *M. mazei* einleitet, wurde nicht aufgeklärt.

Die meisten untersuchten Organismen haben einen Vertreter der Familie 1 UDG, der für die Initiation der Uracil-DNA-Reparatur verantwortlich ist. Allerdings fehlen in den Genomen von einigen Bakterien und Archaeen die Vertreter der Familie 1 UDG (Starkuviene and Fritz, 2002; Sandigursky and Franklin, 1999). Die Anwesenheit der UDG-Aktivität wurde jedoch in diesen Organismen gezeigt (Sandigursky and Franklin,

2000). Die Gene TUDGA und TUDGAB, deren Produkte für diese UDG-Aktivität verantwortlich sind, wurden erforscht und den Familien 4 und 5 zugeordnet. (Hinks *et al.*, 2002; Kosaka *et al.*, 2007; Sandigursky and Franklin, 1999; Sandigursky and Franklin, 2000; Starkuviene and Fritz, 2002).

Das Genom von *M. mazei* wurde nach Vertretern der Familie 1, 4 und 5 untersucht und es wurde ein UDG-Vertreter entdeckt, der hohe Sequenzähnlichkeit mit bereits beschriebenen TUDGB-, TUDGA-Homologen aus *Thermus thermophilus* und TUDGA-Homologen aus *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Archaeoglobus fulgidus* aufweist (Tabelle 5).

M. mazei UDG wurde kloniert, das Protein gereinigt und auf U-Aktivität getestet.

Tabelle 5: Vergleich der TUDGA-Homologe aus *M. mazei* mit *T. maritima*, *T. thermophilus*, *P. aerophilum*, *A. fulgidus* und TUDGB aus *T. thermophilus*.

In der Tabelle ist der prozentuale Anteil der Sequenzidentität bzw. Sequenzähnlichkeit des TUDGA-Homologes aus *M. mazei* zu den TUDGA-Homologen aus *T. maritima*, *T. thermophilus*, *P. aerophilum*, *A. fulgidus* und zu dem TUDGB-Homolog aus *T. thermophilus* angegeben.

	<i>M. mazei</i> UDG	
	Sequenzidentität	Sequenzähnlichkeit
<i>T. maritima</i> TUDGA	35%	53%
<i>T. thermophilus</i> TUDGA	29%	46%
<i>P. aerophilum</i> TUDGA	32%	45%
<i>A. fulgidus</i> TUDGA	30%	48%
<i>T. thermophilus</i> TUDGB	21%	31%

3.2.1 Klonierung, Produktion und Reinigung von Mma.TUDGA

Der offene Leserahmen von Mma.TUDGA (Mma0486) wurde mittels einer PCR mit spezifischen Primern (2.1.5.1), die NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen haben, aus der genomischen DNA von *M. mazei* amplifiziert (2.2.1.13). Das PCR-Produkt wurde in den PCR-Blunt II-TOPO Vektor (2.1.4.1) zwischenkloniert (2.2.1.14), mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (NdeI, HindIII) herausgeschnitten, aufgereinigt (2.2.1.7) und über NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen in den pET-28a Vektor (2.1.4.5) ligiert (2.2.1.16). Das Protein wird dadurch mit einem N-terminalen aus 6 Histidinen bestehenden Tag produziert. Die korrekte Sequenz des Gens wurde mittels Sequenzanalyse bestätigt (2.2.1.18). Die Sequenz befindet sich in Anhang (5.2.2). Das Protein wurde heterolog in BL-21_UX produziert (2.2.3.5) und mittels IMAC (2.2.3.1) und Heparinaffinitätschromatographie gereinigt (2.2.3.3) (Abbildung 17). Das theoretische Molekulargewicht von Mma.TUDGA beträgt 24,56 kDa. Aus 2 L *E. coli* Kultur ließen sich ca. 11,2mg Protein präparieren.

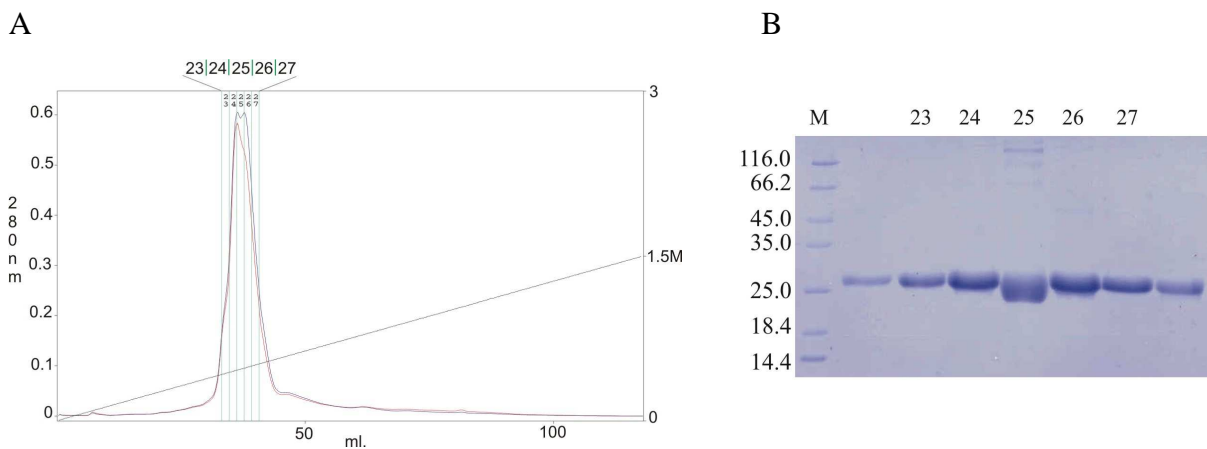


Abbildung 17: Heparin-Affinitätschromatographie und SDS-PAGE der Heparin-Affinitätschromatographie von Mma.TUDGA.

(A) Absorptionsmessung des Eluats der Heparinsäule bei 280 nm (Blaue Linie) und 260 nm (rote Linie). Die Skala links zeigt die Absorption bei 280 nm. Die Skala rechts zeigt die NaCl-Konzentration. Die schwarze Linie zeigt die NaCl-Konzentration des Elutionspuffers. Die grünen Linien markieren Beginn und Ende einzelner Fraktionen. Unten ist das Volumen in Milliliter angegeben. (B) Die Analyse der Fraktionen nach der Heparin-Affinitätschromatographie per SDS-PAGE. M: *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, 2.1.6.2), relative Molmassen $\times 10^{-3}$ links angegeben. Oben sind die Nummern der Fraktionen angegeben. Für die Assays wurden die Fraktionen 23-27 vereinigt und einkonzentriert.

3.2.2 Enzymologische Charakterisierung von Mma.TUDGA

Vor der Durchführung des Aktivitätstests von Mma.TUDGA wurden einige Kontrollexperimente für den Ausschluss einer möglichen Kontamination mit der AP-, U-Endonuklease aus *M. mazei* (Aktivitätsoptimum 37°C) oder aus *M. thermautotrophicus* (Aktivitätsoptimum 65°C) notwendig (Abbildung 18B). Die U-Endonukleasen sind metallabhängig (Marti and Fleck, 2004), deshalb wurden die Kontrollversuche in Phosphat Puffer in Anwesenheit von 1mM MgCl₂ bei 37°C bzw. 65°C gemacht, in diesem Fall ist keine zusätzliche NaOH-Behandlung notwendig.

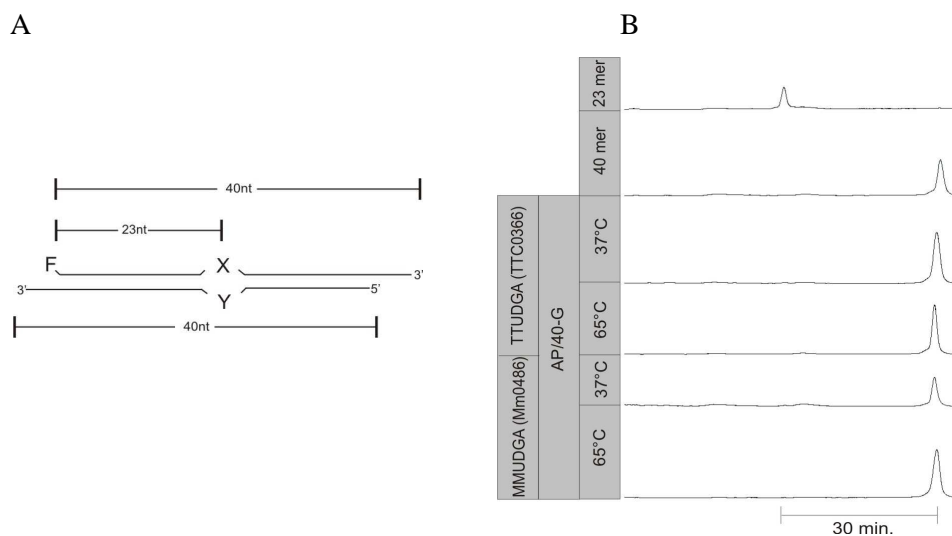


Abbildung 18: Kontrollexperimente zum Ausschluss der Kontamination mit Mth212 und Mma3148.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B) Das Kontrollexperiment zum Ausschluss der Verunreinigung mit der AP-, U- Endonuklease aus *M.mazei* oder aus *M. thermautotrophicus*. Es wurden 4,8 pmol TTC0366 bzw. 1,2 pmol Mma.TUDGA mit 0,12 pmol AP/40-G Substrat in 50µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 50mM KCl, 1mM MgCl₂ für 20 min bei 37°C bzw. 65°C inkubiert. Die Proben wurden nicht mit NaOH behandelt

Unter den verwendeten Bedingungen wurde in beiden Fällen keine Aktivität festgestellt, deshalb wurde die Kontamination ausgeschlossen.

Da TUDGA das Uracil aus der doppelsträngigen DNA unabhängig von der gegenüberstehenden Base entfernen kann, wurde die Aktivität von Mma.TUDGA mit Glykosylase-assays bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 10:1 an allen möglichen U-Kombinationen getestet. Es sind TUDGA und TUDGB-Homologe bekannt. Im

Vergleich zu TUDGB ist TUDGA in der Lage, das Uracil aus der einzelsträngigen DNA zu entfernen (Starkuviene and Fritz, 2002). Deshalb wurde die Aktivität von Mma.TUDGA zusätzlich am ssU Substraten getestet. In Abbildung 19 sind die Produkte der Reaktionen dargestellt.

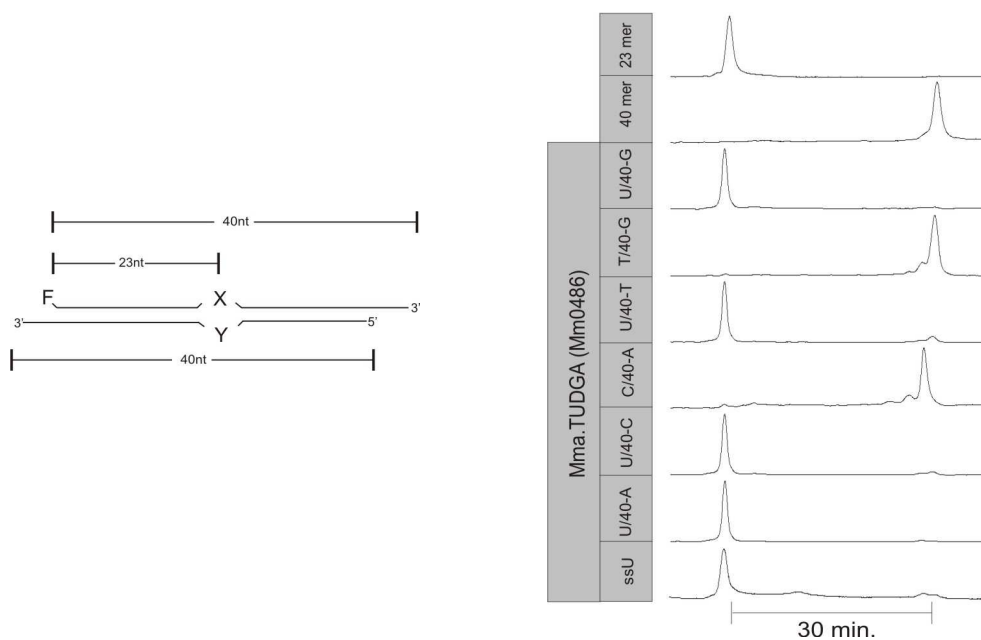


Abbildung 19: Aktivitätstest von Mma.TUDGA.

Links ist das Schema des Oligonukleotidsubstrats dargestellt. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. Rechts sind die Reaktionsprodukte von Mma.TUDGA abgebildet. Für die Assays wurden 1,2 pmol Mma.TUDGA mit 0,12 pmol angegebenen Substraten in 50µl 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$ für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 5µl 1M NaOH versetzt, für 10min bei 95°C inkubiert und mit 25µl A.L.F.-Marker gemischt.

Alle Substrate, außer T/40-G und C/40-A, wurden vollständig umgesetzt. Da Mma.TUDGA das ssU Substrat angegriffen hat, wurde bestätigt, dass Mma.TUDGA zur Familie 4 UDG gehört.

Die Reaktionsprodukte zeigen eine höhere elektrophoretische Mobilität im Vergleich mit dem 23mer-Marker. Dieser Effekt lässt sich durch die Glykosylase-Aktivität des untersuchten Proteins erklären. U-DNA-Glykosylase entfernt Uracil, dadurch entsteht eine AP-Stelle. Nach der alkalische Behandlung wird die 3'-Phosphordiesterbindung neben der AP-Stelle gespalten, was zur Entstehung eines Strangbruchs führt (β -Elimination) und der Aldehydrest abgetrennt (δ -Elimination) wird. Das Produkt hat eine 3'-Phosphatgruppe. Die

Phosphatgruppe hat ein höheres Molekulargewicht als die Hydroxylgruppe, aber wegen der zusätzlichen negativen Ladung hat das Molekül eine höhere Mobilität. Das Schema der Hydrolyse von U-Glykosid-Bindung von U-DNA-Glykosylase und die nachfolgende Spaltung mit NaOH ist in Abbildung 20 dargestellt.

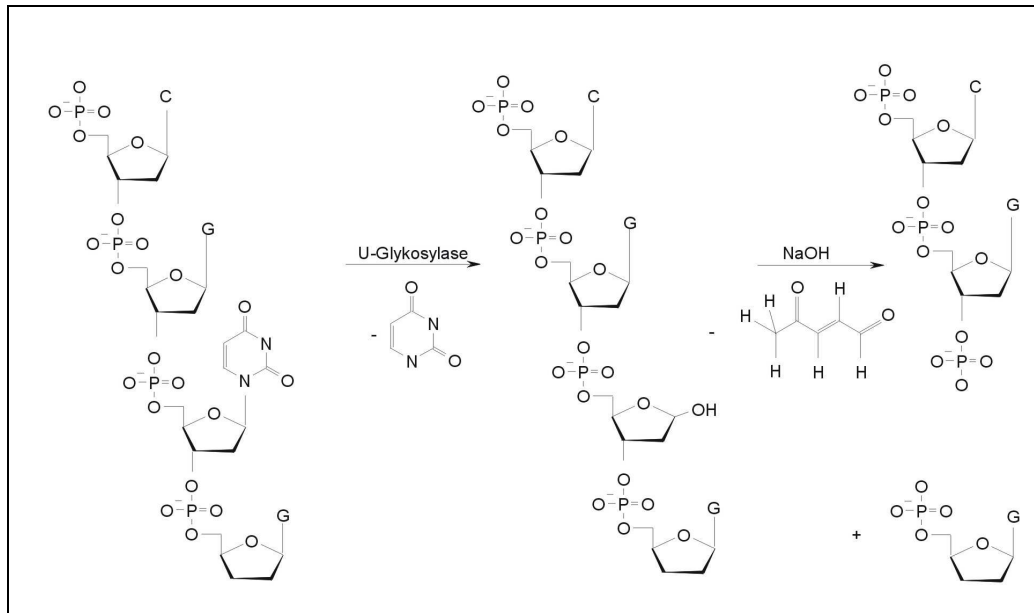


Abbildung 20: Darstellung der Hydrolyse von U-Glykosid-Bindung an U-DNA-Position von U-Glykosylase und nachfolgende Spaltung bei alkalischem pH.

Die Beschreibung ist im Text enthalten.

3.2.3 Temperaturstabilität von TUDGA-Homologen aus *M. mazei* und *T. thermophilus*

Vor dieser Studie waren TUDGA-Homologe nur aus thermostabilen Organismen bekannt, nämlich *Termitoga maritima*, *Thermus thermophilus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrobaculum aerophilum* (Hinks *et al.*, 2002; Kosaka *et al.*, 2007 Sandigursky and Franklin, 1999; Sandigursky and Franklin, 2000; Starkuviene and Fritz, 2002). Bei dem TUDGA-Homolog aus *Pyrobaculum aerophilum* wurde ein Eisen-Schwefel Cluster beschrieben, der dem Protein wahrscheinlich eine begrenzte Stabilität gewährleisten kann (Hinks *et al.*, 2002). Der Cluster wird durch die Bindung des Eisen-Atoms zu den vier tetrahedronal angeordneten S-Atomen der Cysteinreste in der Polypeptidkette befestigt und trägt der Substraterkennung bei der Erhaltung der Struktur des Proteinssegmentes bei, das in die Protein-DNA-Wechselwirkung eingeschlossen ist (Hinks *et al.*, 2002). Auffällig ist, dass bei dem Vergleich der Sequenzen der 4 bekannten TUDGA und Mma.TUDGA 4

konservierte Cysteinreste gefunden wurden, die für die Ausbildung des Eisen-Schwefel Clusters notwendig sind (Abbildung 21).

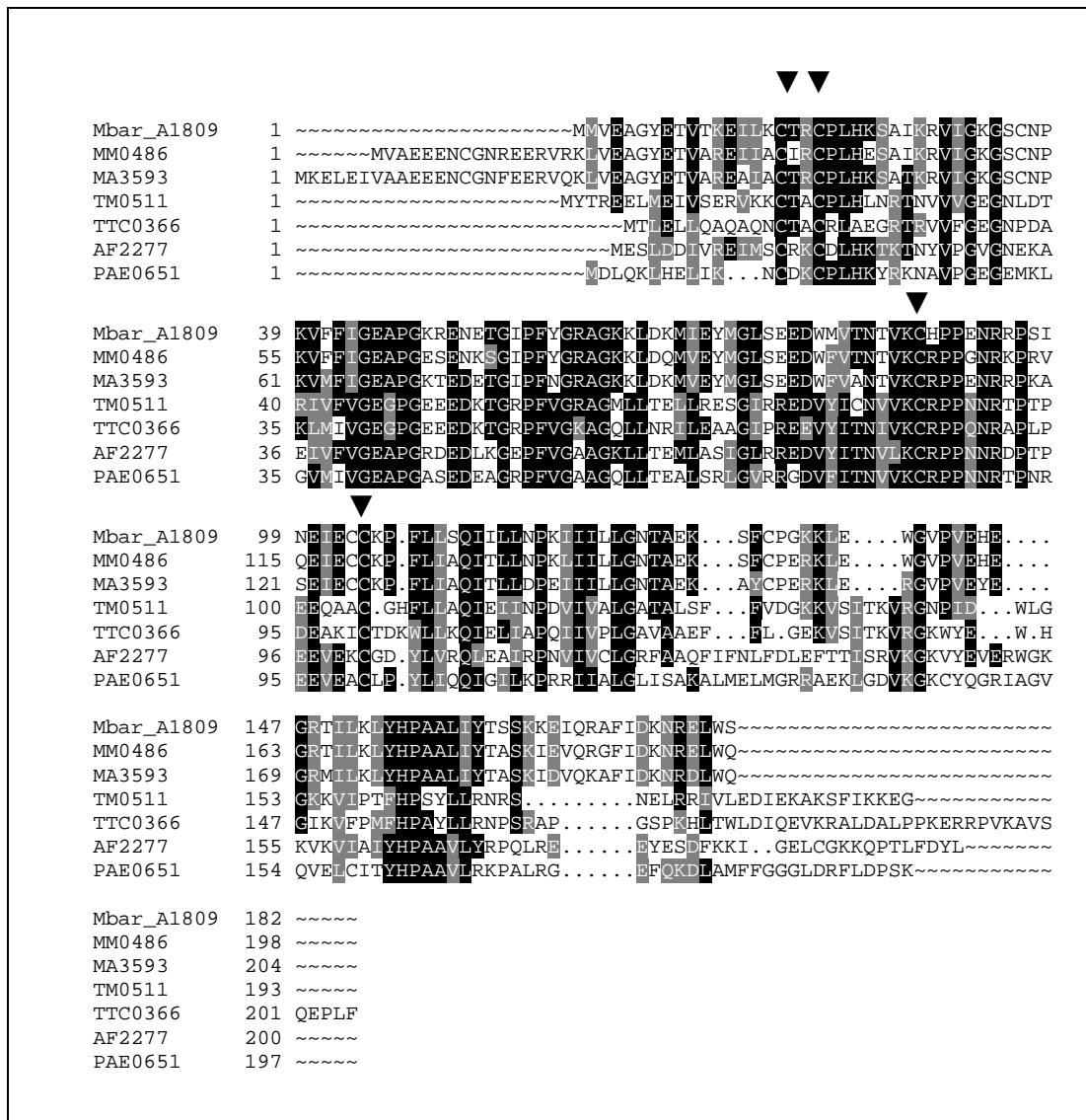


Abbildung 21: Multiples Sequenzalignement der TUDGA-Homologe aus *M. mazei* mit bereits charakterisierten TUDGA-Homologen aus *T. maritima*, *T. thermophilus*, *P. aerophilum*, *A. fulgidus*.

Mindestens 60% Identität bzw. Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen sind schwarz bzw. grau markiert. Das Alignment wurde mit der Software WISCOSIN PACKAGE Version 10,3 (Womble, 2000) erstellt und mit BOXSHADE, Version 3,21 und CorelDraw 12, bearbeitet. Mbar_A1809 - *M. barkeri*; MM0486 - *M. mazei*; MA3593 - *M. acetivorans*; TM0511 - *T. maritima*; TTC0366 - *T. thermophilus*; AF2277 - *A. fulgidus*; PAE - *P. aerophilum*. ▼ - konservierte Cysteinreste.

In der Arbeit von John A. Hinks *et al* wurde eine intensive gelbe Farbe der Proteinlösung beschrieben und das Absorptionsspektrum gemessen. Bei der Messung des

Absorptionsspektrums wurde ein breiter Peak gegen 370-400nm (zusätzlich zu dem normalen Absorptionpeak gegen 280nm) detektiert. Der Grund dafür kann auch das Eisen-Schwefel Cluster sein (Hinks *et al.*, 2002)

Bei der Mma.TUDGA-Lösung wurde nach der Einkonzentrierung auch eine dunkel-gelbe Farbe beobachtet. Ausgehend von dieser Beobachtung und dem Vorhandensein von vier konservierten Cysteine wurde vermutet, dass Mma.TUDGA einen Eisen-Schwefel Cluster hat, der eine begrenzte Stabilität des Proteins gewährleisten kann.

Das Absorptionsspektrum des konzentrierten *M. mazei* TUDGA-Homologes wurde von 260 bis 500nm gemessen. Zum Vergleich wurde das Absorptionsspektrum eines bereits beschriebenen TUDGA-Homologes aus *T. thermophilus* unter denselben Bedingungen gemessen (Abbildung 22).

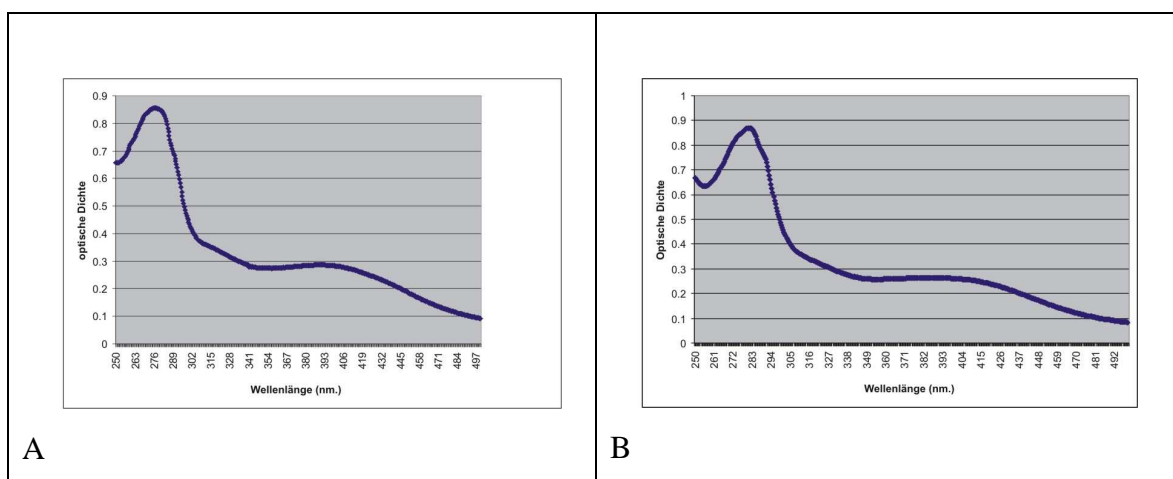


Abbildung 22: UV-Spektrum von *M. mazei* TUDGA und *T. thermophilus* TUDGA.

(A) UV-Spektrumvermessung von Mma.TUDGA, (B) UV-Spektrumvermessung von TTUDGA.

Links ist die optische Dichte, unten die Wellenlänge angegeben. Die Graphiken zeigen einen gewöhnlichen Peak gegen 280nm und einen breiten Peak gegen 340-400nm.

In beiden Fällen wurde ein schmaler Peak in einem Bereich von 250 bis 300nm und ein breiter Peak in einem Bereich von 300 bis 450nm nachgewiesen. Der erste Peak wurde von der Absorption des Lichts von Tryptophan, Tyrosin und Disulfidbrücken hervorgerufen (Pace *et al.*, 1995). Der zweite Peak kann ein Resultat der Absorption des Lichts von Eisen-Schwefel Clustern sein (Hinks *et al.*, 2002).

Der Aktivitätstest von *M. mazei* TUDGA wurde bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 10:1 im Temperaturbereich von 57° bis 87°C durchgeführt (Abbildung 23B). Zum Vergleich wurde der Aktivitätstest unter gleichen Bedingungen, aber bei einem

Enzym/Substrat-Verhältnis von 40:1 mit dem thermostabilen TUDGA-Homolog aus *T. thermophilus* durchgeführt (Abbildung 23C).

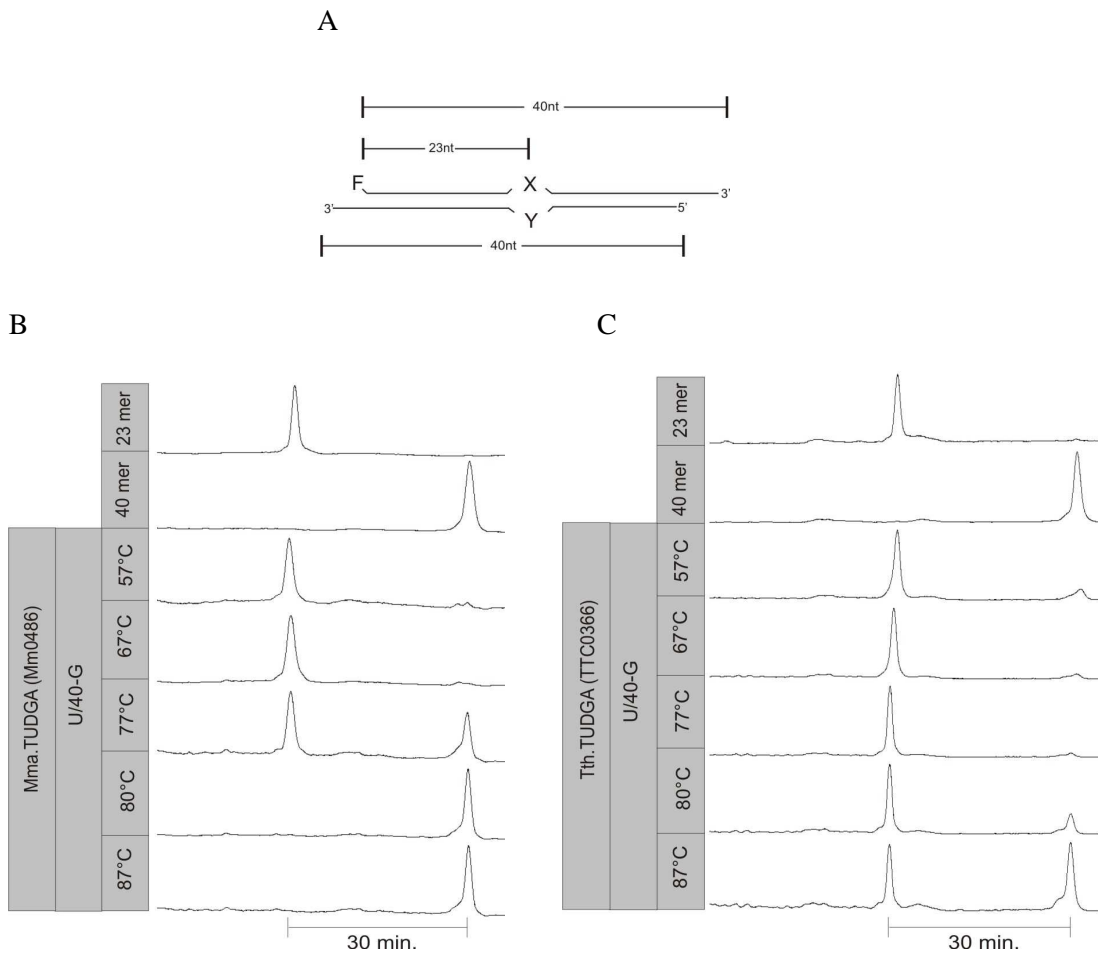


Abbildung 23: Aktivität von TUDGA-Homologen bei steigender Temperatur.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B) Aktivität von MM0486. Für den Test wurden 1,2 pmol MM0486 mit 0,12 pmol U/40-G Substrat in 50µl 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 50mM KCl, für 10 min bei angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit 100mM NaOH behandelt (5 min 95°C). (C) Aktivität von TTC0366. Für den Test wurden 4,8 pmol TTC0366 mit 0,12 pmol U/40-G Substrat in 50µl 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 50mM KCl, für 10 min bei angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit 100mM NaOH behandelt (5 min. 95°C).

Das Experiment hat die erwartete Thermostabilität von TTUDGA bestätigt. Das Protein war noch bei 87°C aktiv (38% des Substrates wurden umgesetzt). Überraschenderweise wies auch *M. mazei* TUDGA Thermostabilität auf. Das Protein setzte 51% des Substrates bei 77°C um.

Laut der Ergebnisse ist *M. mazei* TUDGA thermostabil. Eventuell stabilisiert ein Eisen-Schwefel Cluster das Protein. Für die Überprüfung dieser Hypothese könnten die vier Cysteine entfernt und das Protein noch ein mal auf Thermostabilität getestet werden.

3.3 Zusammenfassung der bis jetzt erzielten Ergebnisse

Es wurden bei *M. mazei* zwei Gene entdeckt, deren Produkte als Kandidaten für die Initiation der U-DNA-Reparatur betrachtet werden könnten: TUDGA Familie 4-Homolog (Mma0486) und ExoIII-Homolog (Mma3148). Das TUDGA-Homolog besitzt alle Eigenschaften der Uracil-DNA-Glykosylase Familie 4 und zusätzlich eine für mesophile Enzyme ungewöhnliche Thermostabilität. Mma3148 hat die typischen Eigenschaften des ExoIII-Homologes, zeigt aber zusätzlich eine Aktivität gegenüber U/T und U/C Fehlpaarungen. Laut der Ergebnisse wird die U-DNA-Reparatur bei *M. mazei* eindeutig von TUDGA-Homolog eingeleitet.

Nach dem Zwischenabschluss wurde die Frage gestellt, ob Mma3148 einen Beitrag zur Klärung leisten kann, welche speziellen Merkmale ein ExoIII-Homolog zu einer U/G-Endonuklease machen und ob Mma3148 durch gezielte Mutagenese eine U/G-Aktivität gewinnen kann. Der Erfolg der Verwandlung Mma3148 in eine U/G-Endonuklease wird ermöglichen, den Unterschied eines ExoIII-Homologs mit U/G-Aktivität von einem ExoIII-Homolog ohne U/G-Aktivität herauszufinden und die genetischen Experimente in *E. coli* durchzuführen. Das Vorhandensein der U/T und U/C-Aktivitäten bei Mma3148 erhöht die Chancen von Mma3148 U/G Aktivität durch eine gezielte Mutagenese zu gewinnen.

3.4 Ausstattung von Mma3148 mit einer U/G-Endonukleaseaktivität

Um die Aminosäurereste zu bestimmen, die als Kandidaten für den Austausch zur Ausstattung von Mma3148 mit einer U/G –Endonukleaseaktivität betrachtet werden könnten, wurden von J. Georg Mth212 mit ExoIII-Homolog ohne U/G-Aktivität (ApeI) auf Sequenz- und Strukturebene und mit Mma3148 auf Sequenzebene verglichen.

3.4.1 Aufstellung einer Arbeitshypothese über die Ausstattung Mma3148 mit einer U/G-Endonukleaseaktivität.

Zur Zeit der von Jens Georg aufgestellte Arbeitshypothese über die Ausstattung Mma3148 mit U/G-Endonukleaseaktivität durch Austausch von zwei bestimmten Aminosäureresten war die 3D-Struktur von Mma3148 und Mth212 noch nicht bekannt. Aufgrund der hohen Sequenzverwandtschaft von Mma3148 zu Mth212 (Identität 56%, Ähnlichkeit 76%) und zu ApeI (Identität 42%, Ähnlichkeit 61%) wurde vermutet, dass die drei Proteine ähnliche Strukturen haben.

Die Aminosäurereste von ApeI, die an der Katalyse beteiligt sind, mit der DNA interkalieren oder in die DNA intergrieren, wurden von J. Georg nach der Betrachtung der 3D-Struktur und nach dem Studium der Untersuchungen der Aminosäureaustauschmutante von ApeI (Mol, *et al.*, 2000) auf dem Alignment von ApeI mit Mth212 und Mma3148 markiert und verglichen (Abbildung 24) (Georg, J., 2005).

Die betrachteten Reste sind bei diesen drei Enzymen bis auf vier Aminosäuren gleich. Diese vier Aminosäuren verdienen es ausführlicher betrachtet zu werden.

Der erste Aminosäurerest Arginin 177 in ApeI liegt im Cokristall in die große Furche inseriert (Abbildung 25) vor und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem ersten Phosphatrest 3' von der AP-Stelle (Mol *et al.*, 2000). Arginin 177 bei ApeI entspricht Methionin 117 bei Mth212 und Alanin 118 bei Mma3148. Deshalb wurde vermutet, dass durch den Austausch von Alanin durch Methionin dem Mma3148 Protein U/G-Aktivität verliehen werden könnte (Georg, J., unpubliziert).

Die zweiten und dritten Aminosäurereste Methionin 270 und 271 in ApeI, die gegenüber dem oben besprochenen Arg177-Aminosäurerest liegen, inserieren in die kleine Furche (Abbildung 25). Durch die Wirkung der Arg177, Met270 und Met271 Aminosäurereste wird der DNA-Protein Komplex stabilisiert. (Mol *et al.*, 2000). Die Reste, die bei Mth212 und bei Mma3148 den Met270 und Met271 bei ApeI entsprechen, sind identisch und wurden deshalb nicht als Kandidaten für den Aminosäureaustausch betrachtet.

Der vierte Aminosäurerest Tyr 269 liegt mitten in einem Aminosäuremotiv, das mit der DNA kontaktiert. Alle anderen bereits charakterisierten ExoIII-Homologen (Mth212 aus *M. thermotrophicus* (Georg *et al.*, 2006) ApeI aus *H. sapiens* (Mol *et al.*, 2000), Af_Exo aus *A. fulgidus* (Schmiedel *et al.*, 2009) und ExoIII aus *E. coli* (Mol *et al.*, 1995) haben an dieser Position auch ein Tyrosin, mit Ausnahme von Mma3148. Bei Mma3148 handelt es sich um ein Methionin. Davon ausgehend wurde die zweite

Aminosäureaustauschmöglichkeit vorgeschlagen, nämlich der Austausch von Methionin 209 durch Tyrosin bei Mma3148 (Georg, J., unpubliziert).

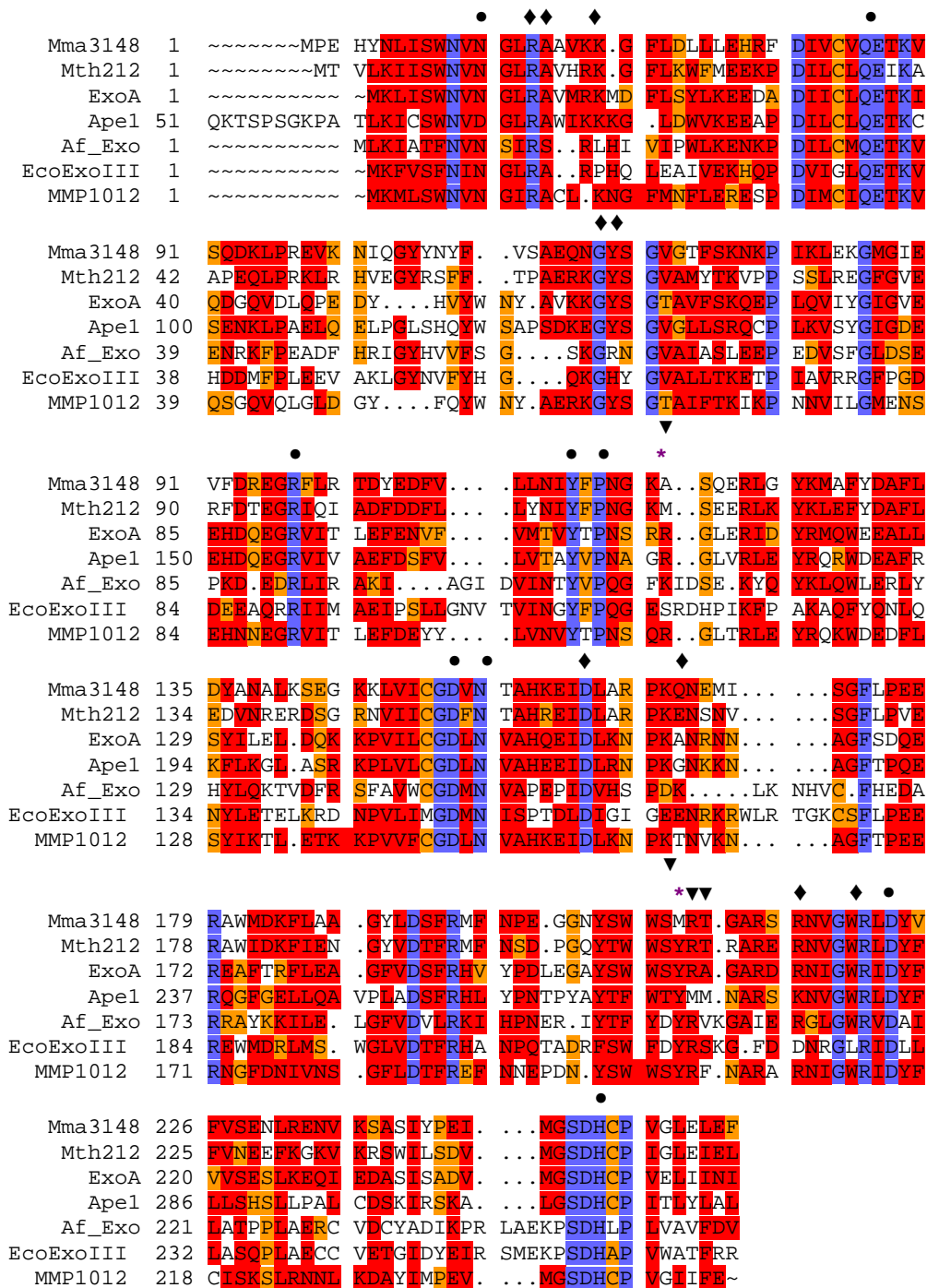


Abbildung 24: Alignment einiger Vertreter der ExoIII-Familie.

Das Alignment wurde mit W2H hergestellt (<https://gcg.gwdg.de/w2h/>) und mit Word nachbearbeitet. (Blau) Alle Aminosäuren sind identisch. (Rot) Mehr als 50% der Aminosäuren sind identisch oder gehören zu *strong groups* (Aminosäuren mit *strong similarities*). (Orange) Mehr als 50% der Aminosäuren sind identisch oder gehören zu *weak groups* (Aminosäuren mit *weak similarities*). *-Ausgetauschte Aminosäurenreste (M209 und A118 bei Mma3148). ▼-Die in die DNA intergrierte Aminosäurenreste. •-Die an der Katalyse beteiligte Aminosäurereste. ◆-Die mit der DNA interagierende Aminosäurereste. Mma3148 *Methanosarcina mazei*, Mth212 *Methanothermobacter thermautotrophicus*, ExoA *Bacillus*

subtiles, ApeI *Homo sapiens*, Af_Exo *Archeoglobus fulgidus*, EcoExoIII *Escherichia coli*, MMP1012 *Methanococcus maripaludis*.

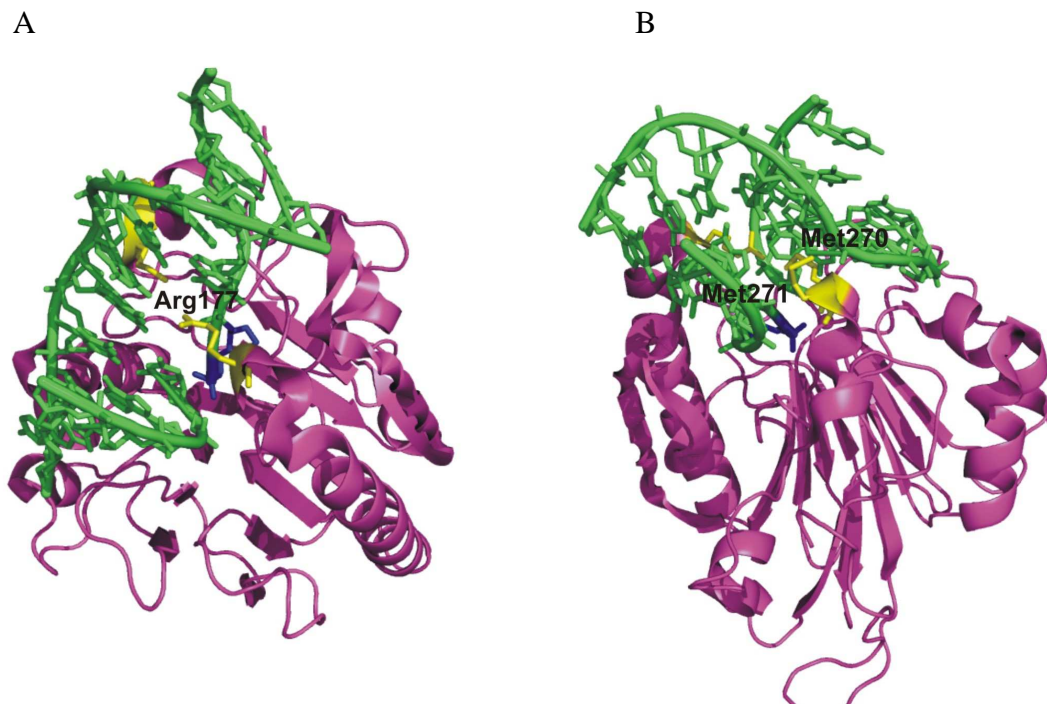


Abbildung 25: 3D-Struktur des ApeI/DNA-Komplex.

Die Struktur wurde mit PyMol bearbeitet. Die PDB-Datei der publizierten ApeI/DNA-Komplex ist 1DE9 (Mol *et al.*, 2000). (A) Betrachtung der Struktur von Arg177-Seite. (B) Betrachtung der Struktur von Met270 und Met271-Seite.

Das Phosphatrückgrat der DNA-Moleküle ist grün. Die ApeI Struktur ist lila gefärbt. Die Reste, die in die kleine Furche (Met 270 und Met 271) und in die große Furche (Arg177) inserieren, sind gelb markiert. Die AP-Stelle ist dunkel-blau gefärbt.

3.4.2 Überprüfung der Arbeitshypothese

Für die Überprüfung der Arbeitshypothese wurden die beiden vorgeschlagenen Mutanten konstruiert, das Protein gereinigt und auf den Gewinn der U-Endo-Aktivität getestet.

3.4.2.1 Herstellung, Produktion und Reinigung von Mma3148/A118M

Im in den pET_B_001 Vektor (2.1.4.2) integrierten Gen Mma3148 (Georg *et al.*, 2006) wurde von Jens Georg mit Hilfe des modifizierten *Quick change Mutagenesis* Protokolls (Stratagene, La Jolla) (2.2.1.10) das vorgeschlagene Alanin an der Stelle 118 durch Methionin ausgetauscht. Das Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit gereinigt und enzymologisch charakterisiert.

Das Protein wurde heterolog in BL-21_UX (2.1.2) produziert (2.2.3.5) und mittels IMAC (2.2.3.1) und Heparinaffinitätschromatographie gereinigt (2.2.3.3) (Abbildung 26). Aus 2 L Bakterienkultur ließen sich ca. 36,89mg Protein präparieren.

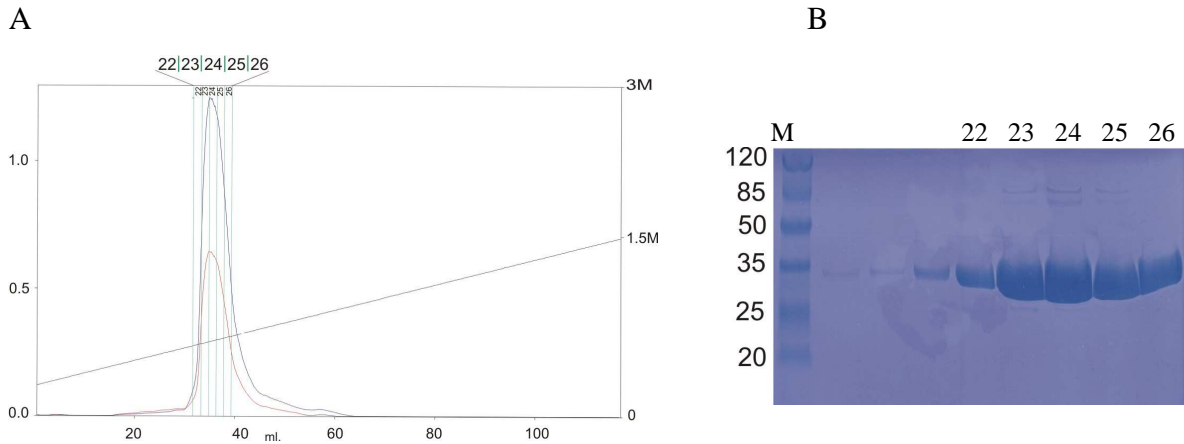


Abbildung 26: Reinigung von Mma3148/A118M.

(A) Verlauf der Heparin-Affinitätschromatographie. Kommentar siehe Abbildung 11 (B) Analyse der Fraktionen nach der Heparin-Affinitätschromatographie per SDS-PAGE dargestellt. M: *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, 2.1.6.2), relative Molmassen $\times 10^{-3}$ links angegeben. Oben sind die Nummern der Fraktionen angegeben. Die Fraktionen 23-25 wurden vereinigt und einkonzentriert.

3.4.2.2 Herstellung, Produktion und Reinigung der Mma3148/A118M/M209Y Doppelmutante

Das Konstrukt pET_B_001/Mma3148/A118M wurde für die gezielte Mutagenese verwendet. Die zweite Mutation (M209Y) wurde mit Hilfe des modifizierten *Quick change Mutagenesis* Protokolls eingefügt (2.2.1.10).

Das Vorhandensein der Aminosäureaustauschmutation wurde mittels Sequenzanalyse bestätigt (2.2.1.18). Die Sequenz befindet sich im Anhang (5.2.5). Das Protein wurde heterolog in BL-21_UX (2.1.2) produziert (2.2.3.5) und mittels IMAC und Heparinaffinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 27). Aus 2 L *E. coli* Kultur ließen sich ca. 21,40mg Protein präparieren.

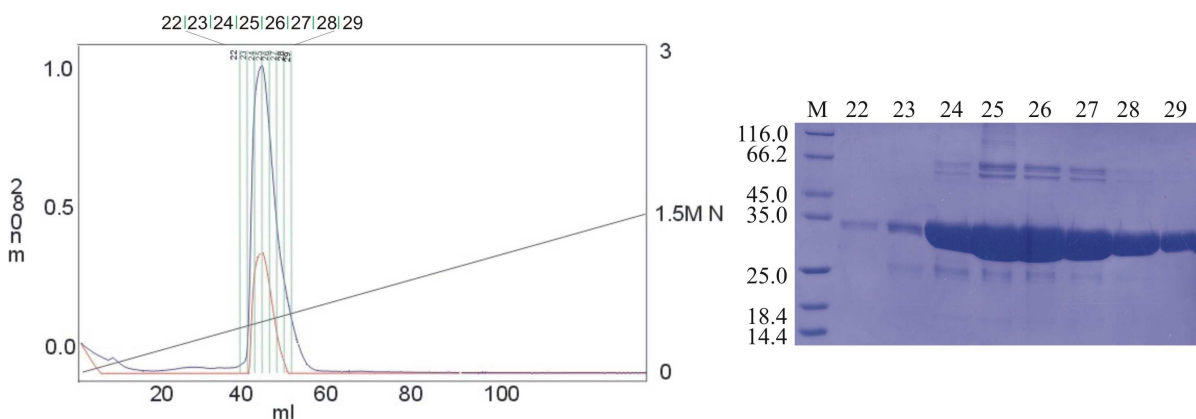


Abbildung 27: Reinigung von Mma3148/A118M/M209Y.

(A) Verlauf der Heparin-Affinitätschromatographie. Kommentar siehe Abbildung 11. (B) Analyse der Fraktionen nach der Heparin-Affinitätschromatographie per SDS-PAGE dargestellt. M: *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, 2.1.6.2), relative Molmassen $\times 10^{-3}$ links angegeben. Oben sind die Nummern der Fraktionen angegeben. Die Fraktionen 24-27 wurden vereinigt und einkonzentriert.

Bei der Analyse des gereinigten Proteins per SDS-PAGE (2.2.3.2) wurden zwei zusätzliche Proteinbanden im Bereich von 66kDa bzw. 60kDa detektiert und eine in Bereich 25kDa. Das Vorhandensein der oberen Banden lässt sich folgenderweise erklären: Das Mma3148 Protein hat drei Cysteinreste. Falls die Cysteinreste an der Oberfläche des Proteins liegen, können sie Disulfidbrücken mit den auf der Oberfläche liegenden Cysteinresten eines anderen Proteins ausbilden, wobei Dimere entstehen können. Zu diesem Zeitpunkt war die 3D-Struktur von Mma3148 noch nicht bekannt und die Position der Cysteinreste konnte nicht bestimmt werden. Da der Puffer, in dem das Protein sich nach der Heparinaffinitätschromatographie befunden hat, keine Reduktionsmittel enthielt, die Disulfidbrücken aufbrechen, wurde vermutet, dass die bei der SDS-PAGE zusätzlich detektierten Banden Dimere sein könnten. Alternativ könnten die zusätzlichen Banden von kontaminierenden *E. coli* Proteinen stammen. Die zusätzlichen Proteine haben ein viel größeres Molekulargewicht als das untersuchte Protein, deshalb können sie leicht über Gelfiltration abgetrennt werden. Das Aliquot der Proteinmischung wurde zusätzlich über Gelfiltration gereinigt (2.2.3.4). Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 75-Säule verwendet, die für die Trennung von Proteinen zwischen 30 und 70 kDa geeignet ist. Der Ablauf der Gelfiltration ist in Abbildung 28 dargestellt. Für die Gelfiltration wurde ein Tris-Puffer mit 2 mM β -Mercaptoethanol (2.1.10) verwendet.

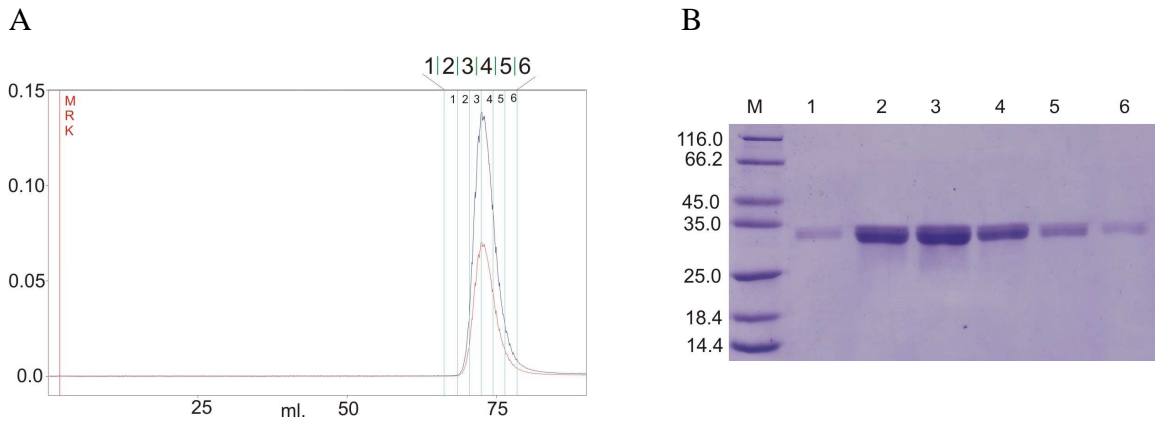


Abbildung 28: Gelfiltration von Mma3148/A118M/M209Y.

(A) Verlauf der Gelfiltration. Photometrische Absorptionsmessung des Eluats bei 280 nm (Blau Linie) und 260 nm (rote Linie). Die Skala links zeigt die Absorption bei 280 nm. Die grünen Linien zeigen die Größe einer Fraktion. Unten ist das Volumen in Milliliter angegeben. (B) Die Analyse der Fraktionen per SDS-PAGE. Die Fraktionen 3 und 4 wurden vereinigt und einkonzentriert. M: *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, 2.1.6.2), relative Molmassen $\times 10^{-3}$ links angegeben.

Nach der Gelfiltration sind die zusätzlichen Banden nicht mehr zu sehen. Die Fraktionen 3 und 4 wurden vereinigt, einkonzentriert und das Protein wurde für die Enzymologische Charakterisierung verwendet.

3.4.2.3 Enzymologische Charakterisierung von Mma3148/A118M

Bevor das Protein auf U-Endo-Aktivität geprüft wurde, wurden die Kontrollexperimente zum Ausschluss von Kontamination mit Mth212, die im Kapitel 3.1.2. beschrieben sind, durchgeführt. Die Ergebnisse des Kontrolltestes sind in Abbildung 29 zu sehen.

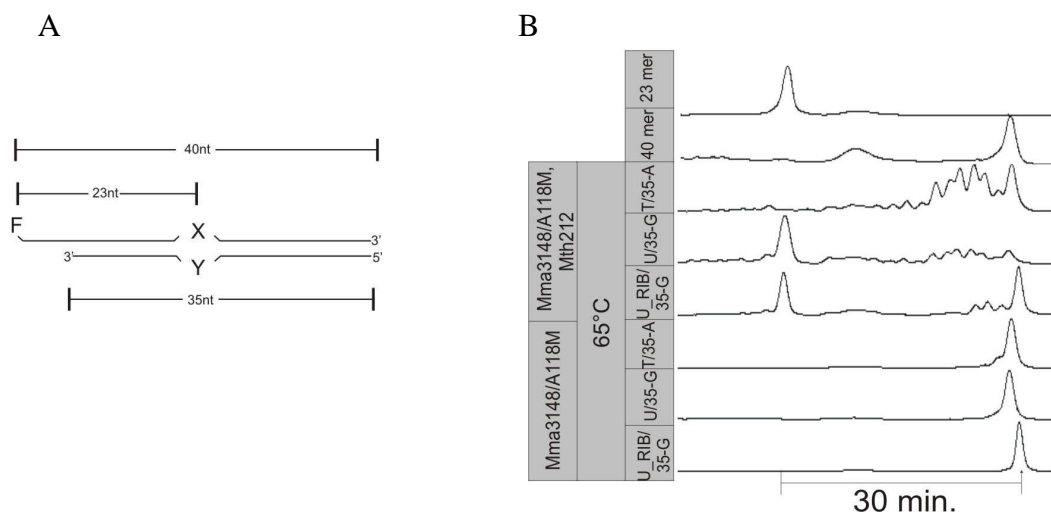


Abbildung 29: Aktivität von Mma3148/A118M.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 12. (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Prüfung auf Kontamination mit Mth212. Für die Reaktion wurden 60

pmol Mma3148/A118M bzw. 0,24 pmol Mth212 mit 0,12 pmol der angegebenen Substrate in 50 μ l 20mM K_2HPO_4/ KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$ bei 65°C für 20 min. inkubiert. (U_RIB/G: das Substrat ist mit 5 RNA Nukleotiden am 3`-Ende gegen Exonukleaseaktivität geschützt).

Aufgrund der Abwesenheit jeglicher detektierbaren Aktivität von Mma3148/A118M bei 65°C, wurde eine Kontamination mit Mth212 ausgeschlossen (Abbildung 29B).

Die AP-Endo- und 3'→5' Exo-Aktivitäten von Mma3148/A118M wurden an den AP/35-G und T/35-G Substraten gemessen (Abbildung 30). Die U-Endo-Aktivität wurde an den U/35-G und U/35-RIB_G Substraten geprüft.

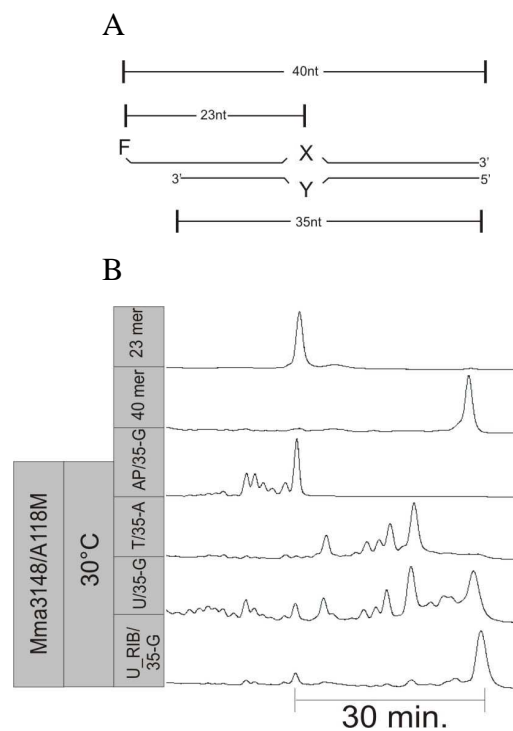


Abbildung 30: Aktivität von Mma3148/A118M.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 12. (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Es wurden 60 pmol Mma3148/A118M mit 0,12 pmol der angegebenen Substrate in 50 μ l 20mM K_2HPO_4/ KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$ bei 30°C für 20 min. inkubiert.

Unter den verwendeten Bedingungen wurde die erwartete 3'→5' Exo-Aktivität und AP-Endo-Aktivität nachgewiesen. An dem U_RIB/35-G Substrat wurde am Rande der Signifikanzschwelle eine U-Endo-Aktivität detektiert, jedoch ist ein hoher Enzymüberschuss (Enzym/Substrat Verhältnis 500: 1) notwendig.

Da die U-Endo-Aktivität des Proteins schwach ausgeprägt war, wurden mehrere Experimente für die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden für die Uridin-Endonuklease-Aktivität von Mth212 von Jens Georg im Rahmen seiner Arbeit bestimmt und in vorliegender Arbeit für die Aktivitätsmessung von Mma3148 verwendet, nämlich 20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH6,2, 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$. Für die mögliche Verbesserung der schwach ausgeprägten U-Endo-Aktivität der Einzelmutante wurden verschiedene Pufferbedingungen getestet. (20mM HEPES, pH 7,6, 1mM $MgCl_2$; 20mM HEPES, pH 7,6, 1mM $MgCl_2$, 50mM NaCl; 40mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM $MgCl_2$; 40mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM $MgCl_2$, 50mM NaCl). Die neuen Pufferbedingungen haben die Aktivität des Proteins verschlechtert (Die Daten sind nicht gezeigt). Für die weiteren Experimente wurde 20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1mM $MgCl_2$ Puffer verwendet. J. Georg hat auch den Einfluss der Konzentration von KCl auf die U-Endo-Aktivität von Mth212 analysiert und 50mM KCl als optimale Konzentration für U-Endo-Aktivität von Mth212 definiert (Georg J., 2005). Um die Uridin-Endonuklease-Aktivität von Mma3148/A118M zu erhöhen, wurde geprüft, ob die Konzentration von KCl die U-Endo-Aktivität der Einzelmutante ebenfalls beeinflussen kann. Dafür wurde der Aktivitätstest mit steigender Konzentration von KCl durchgeführt. In Abbildung 31 ist die Abhängigkeit der Aktivität von Mma3148/A118M von der Konzentration des KCl dargestellt.

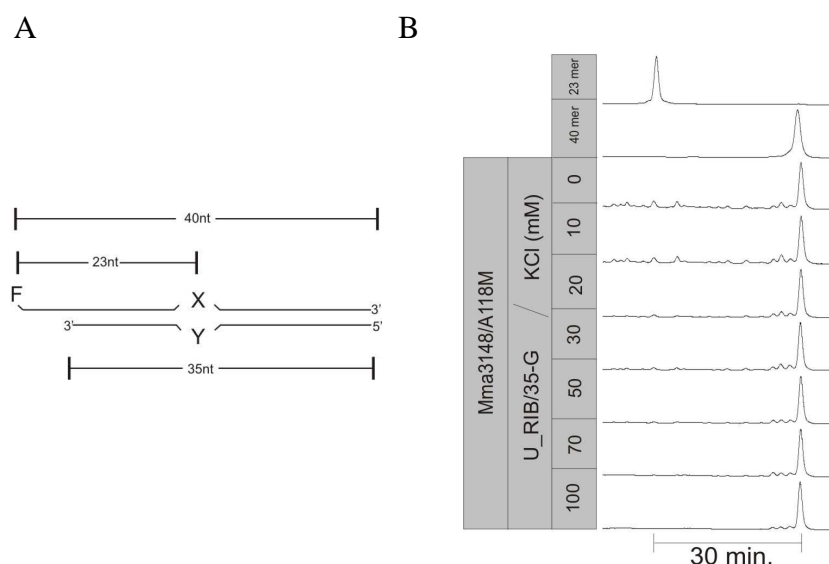


Abbildung 31: Analyse des Einflusses der KCl-Konzentration auf die Aktivität von Mma3148/A118M.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 12 (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Es wurden 60 pmol Mma3148/A118M mit 0,12 pmol U_RIB/35-G in 50µl 20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1mM $MgCl_2$ mit 0 mM bis 100mM KCl für 20 min bei 37°C inkubiert.

Die Aktivität von Mma3148/A118M wurde schon bei 20mM KCl fast vollständig inhibiert. Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die U-Endo-Aktivität von Mma3148/A118M bestimmt, nämlich 20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,2, 1mM $MgCl_2$.

3.4.2.4 Enzymologische Charakterisierung von Mma3148/A118M/M209Y

Das über Gelfiltration gereinigte Protein wurde zuerst auf Kontamination mit Mth212 geprüft. Da Mth212 bei 65°C aktiv ist und Mma3148 bei dieser Temperatur denaturiert, wurden die Kontrollexperimente bei 65°C durchgeführt. Das Kontrollexperiment wurde bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 500:1 am U/40-G Substrat durchgeführt (die Daten sind nicht gezeigt). Aufgrund der Abwesenheit jeglicher detektierbaren Aktivität, wurde eine Kontamination mit Mth212 ausgeschlossen.

Die Aktivität von Mma3148/A118M/M209Y wurde bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 30:1 an den AP/35-G, T/35-G, U/35-G und U_RIB/35-G Substraten getestet (Abbildung 32).

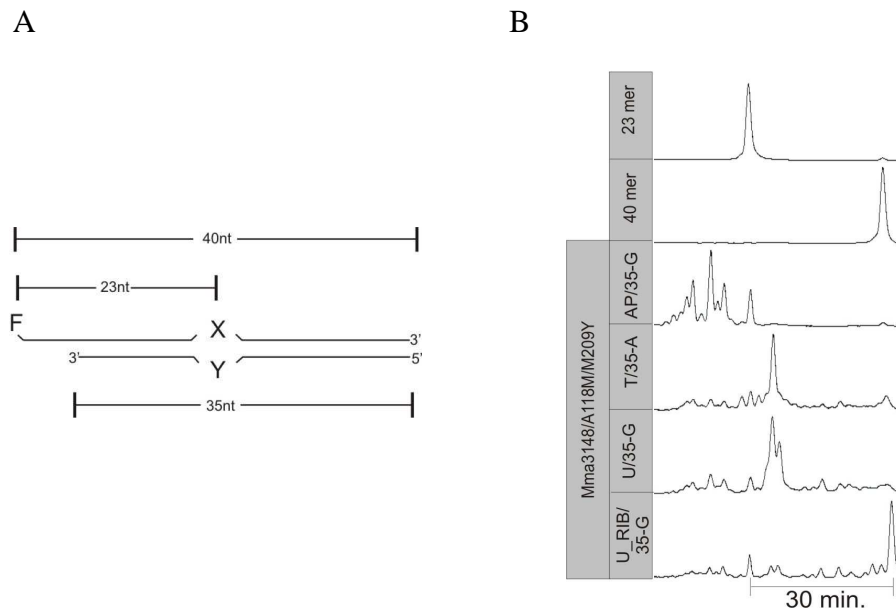


Abbildung 32: Aktivitätstest von Mma3148/A118M/M209Y.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 12. (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Es wurden 3,6 pmol Mma3148/A118M/M209Y mit 0,12 pmol AP/35-G, T/35-G, U/35-G, U_RIB/35-G in 50µl 20mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1mM $MgCl_2$ für 20 min bei 37°C inkubiert

Alle Aktivitäten, die für den Wildtyp beschrieben wurden, sind bei der Doppelmutante auch vorhanden. Die Doppelmutanten besitzen eine stark ausgeprägte 3'→5' Exo-Aktivität und AP-Endo-Aktivität. Das U_RIB/35-G Substrat hat den exonukleolytischen Abbau verlangsamt, aber nicht vollständig eliminiert, was die Unterscheidung der U-Endo-Aktivität von der Exo-Aktivität erschwert.

Bei der Doppelmutante wurde eine starke 3'→5' Exo-Aktivität festgestellt, so dass das U/35-RIB_G Substrat den exonukleolytischen Abbau nicht vollständig eliminieren kann. Deshalb wurde die U-Endo-Aktivität der Doppelmutante an dem U/40-G Substrat getestet. Zum Vergleich wurde parallel unter denselben Bedingungen der Wildtyp analysiert. Die Experimente wurden bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 30:1 durchgeführt. Die Ergebnisse der Aktivitätstests sind in Abbildung 33 dargestellt.

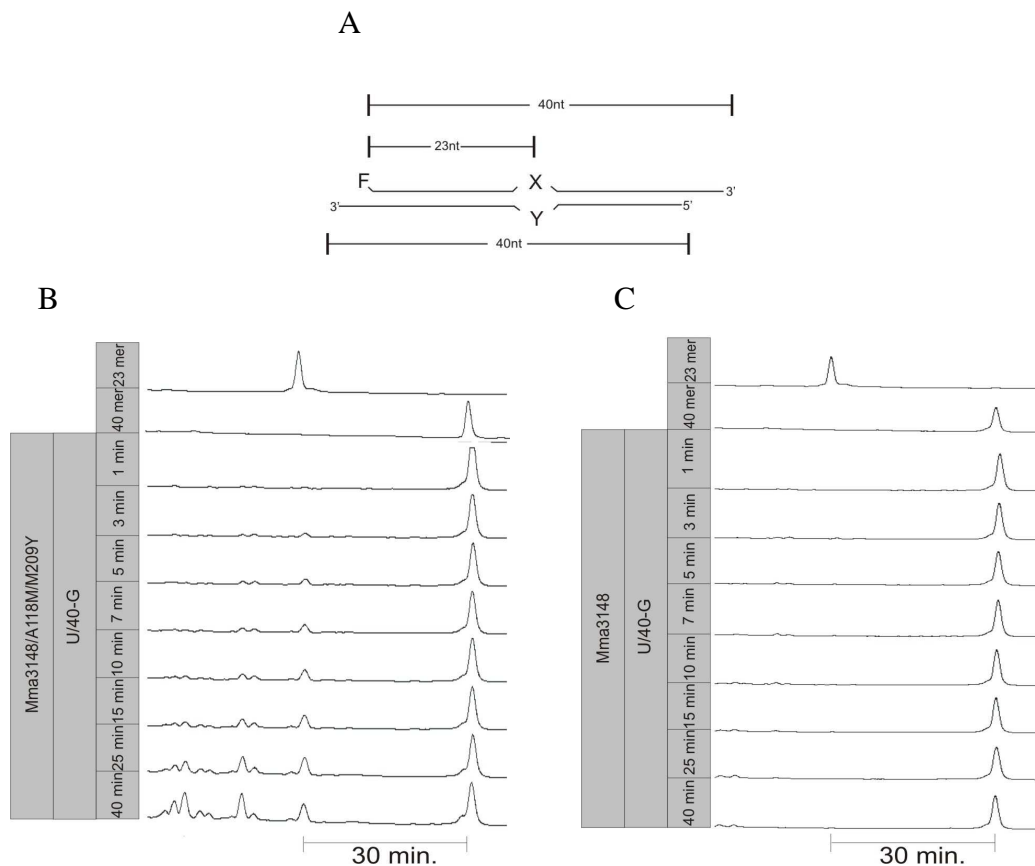


Abbildung 33: Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y Aktivität an dem U/40-G Substrat.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 3. (B-C) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Es wurden 3,6 pmol Mma3148/A118M/M209Y, bzw. Mma3148 mit 0,12 pmol U/40-G in 450µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 1mM MgCl₂ bei 37°C inkubiert. Nach angegebener Zeit wurden 20 µl abgenommen und die Reaktion mit 10µl A.L.F-Marker gestoppt.

Wie festgestellt wurde, liefert das U/40-G Substrat zuverlässigen Schutz gegen eine 3'→5' Exo-Aktivität. Der exonukleolytische Abbau wurde komplett eliminiert. Wie erwartet, besitzt der Wildtyp keine U-Endo-Aktivität, während die Doppelmutante eine deutlich detektierbare U-Endo-Aktivität aufweist. Die U-Endo-Aktivität der Doppelmutante war im Vergleich mit der U-Endo-Aktivität der Einzelmutante stärker ausgeprägt.

Da die U-Endo-Aktivität der Doppelmutante schwach ausgeprägt ist, besteht die Gefahr, dass diese Aktivität die Folge einer Kontamination mit einer U-Glykosylase ist. Um jeden Zweifel auszuschließen, wurde ein Kontrollversuch in Abwesenheit/Anwesenheit von EDTA auf Verunreinigung mit einer U-Glykosylase durchgeführt. EDTA ist ein organischer Komplexbildner, der mit Metallionen zu stabilen Verbindungen reagiert, wodurch ein metallabhängiges Protein seine Aktivität verliert. Die Metallabhängigkeit von Mth212 wurde bereits nachgewiesen (Georg J, 2005). Da Mma3148 ein Homolog von Mth212 ist, sollte die Aktivität von Mma3148 und seinem Derivat auch von der Anwesenheit der Metallionen anhängig sein. U-Glykosylase ist metallunabhängig und bleibt bei der Anwesenheit von EDTA aktiv. In Abbildung 34 sind die Reaktionsprodukte des Kontrollversuches zu sehen.

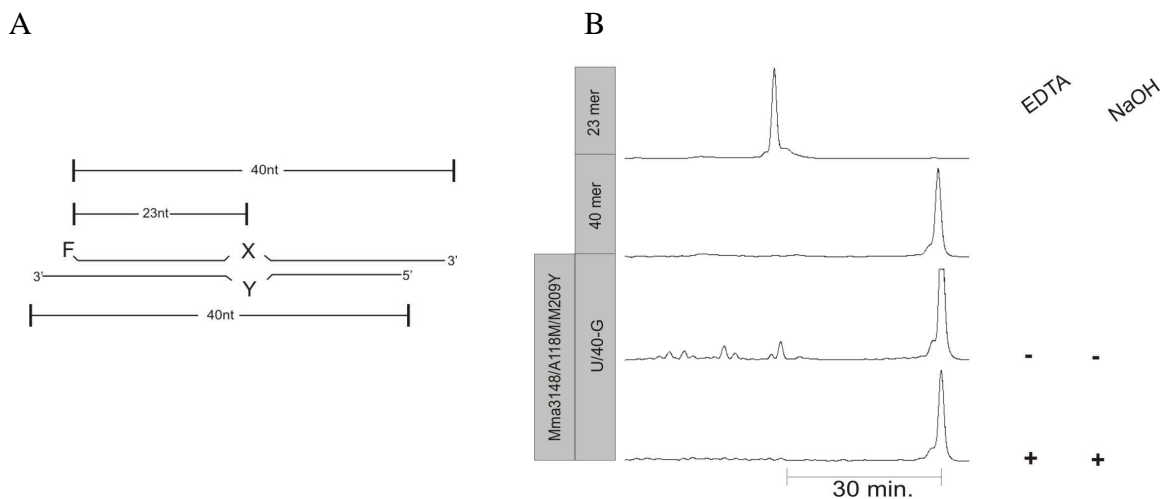


Abbildung 34: Überprüfung auf mögliche Verunreinigung mit einer U-Glykosylase.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats dargestellt. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. Es wurden 3,6 pmol Mma3148/A118M/M209Y mit 0,12 pmol U/40-G in 50µl 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 1mM $MgCl_2$ bei 37°C für 15 min inkubiert. NaOH: Nachbehandlung mit 100mM NaOH, 5 min bei 95°C, EDTA: Inkubation in Anwesenheit von 10mM EDTA.

Das Mma3148/A118M/M209Y ist bei der Inkubation mit EDTA und nachfolgender NaOH-Behandlung inaktiv. Die vermutete Glykosylase-Aktivität ist nicht festgestellt worden.

Da bei *M.mazei* TUDGA eine Thermostabilität (bis 77°C) nachgewiesen wurde, die für ein Protein aus einem mesophilen Organismus ungewöhnlich und überflüssig ist, wurde das Mma3148/A118M/M209Y Protein ebenfalls auf Thermostabilität geprüft (Abbildung 35). Gleichzeitig kann mit diesem Versuch die optimale Reaktionstemperatur der Doppelmutante festgestellt werden. Zum Vergleich wurde unter denselben Bedingungen Mth212 getestet.

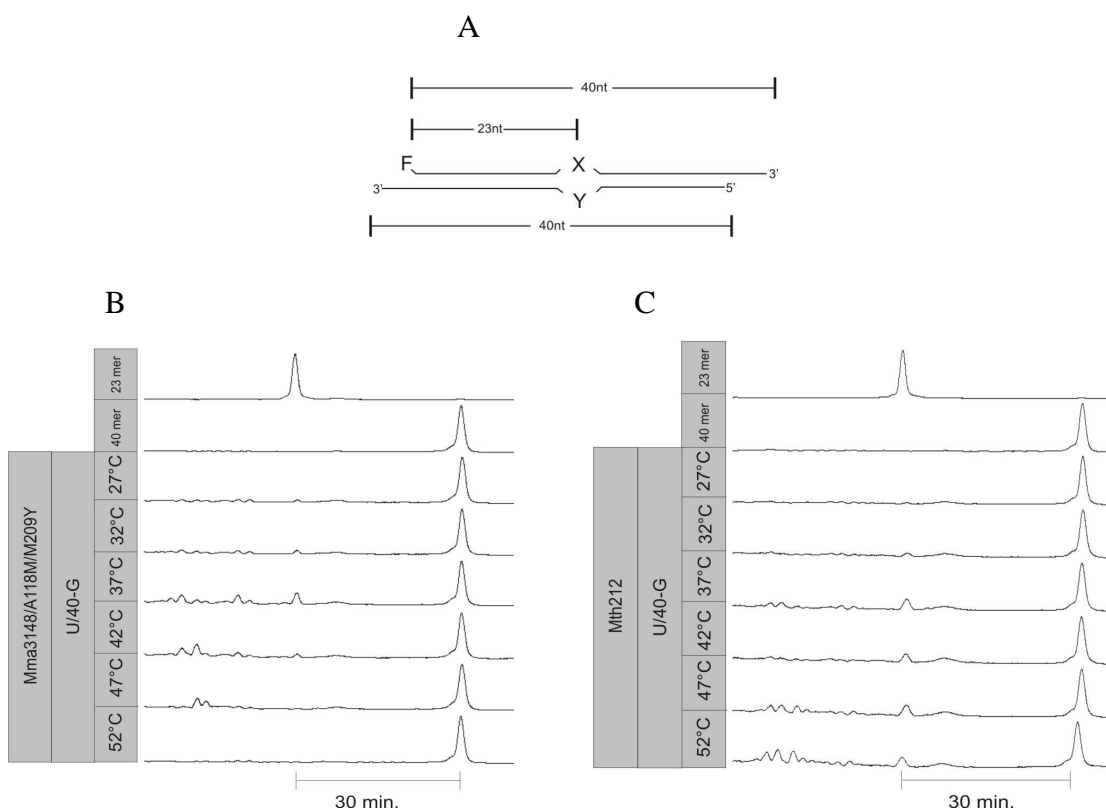


Abbildung 35: Temperaturabhängigkeit von Mma3148/A118M/M209Y und Mth212.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B-C) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. (B) Messung der Aktivität von Mma3148/A118M/M209Y von 27°C bis 52°C. 3,6pmol Mma3148/A118M/M209Y wurde mit 0,12 pmol U/40-G in 50µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 1mM MgCl₂ für 15 min von 27°C bis 52°C inkubiert. (C) Messung der Aktivität von Mth212 von 27°C bis 52°C. 3,6pmol Mth212 wurde mit 0,12 pmol U/40-G in 50µl 20mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 1mM MgCl₂ für 15 min von 27°C bis 52°C inkubiert.

Mit der Erhöhung der Inkubationstemperatur hat die Aktivität der Doppelmutante nachgelassen und ab 47°C ist das Protein fast vollständig inaktiv geworden. Die stärkste Aktivität von Mma3148/A118M/M209Y wurde bei 37°C detektiert. Im Gegensatz zur

Doppelmutante hat die Aktivität von Mth212 bei steigender Temperatur zugenommen. Da die optimale Aktivitätstemperatur für beide Enzyme in unterschiedlichen Bereichen liegt, kann mit diesem Versuch gleichzeitig eine Kontamination mit Mth212 nochmals ausgeschlossen werden.

3.4.3 Diskussion

Die Einzelmutante Mma3148/A118M hat eine leichte U/G-Aktivität gewonnen. Durch die zweite Mutation (Mma3148/A118M/M209Y) wurde die U/G-Aktivität unerheblich vergrößert. Wie nachgewiesen wurde, ist der Wildtyp Mma3148 eine U-Endonuklease mit guter Diskriminierung gegen Thymin und Cytosin. Deshalb wurde vermutet, dass die U/G-Aktivität nicht neu geschaffen wurde, sondern alle Aktivitäten des Enzyms generell gestiegen sind.

3.5 Strukturanalyse von Mma3148/A118M/M209Y

J. Georg hat seine Arbeitshypothese über die Ausstattung Mma3148 mit einer U/G-Aktivität mittels Austausch von zwei Aminosäurereste auf der Basis der Betrachtung von ApeI 3D-Struktur und des Vergleichs der Sequenzen von ApeI, Mth212 und Mma3148 begründet. Um die Hypothese zu überprüfen und das Verständnis des Erkennungsmechanismus des U/G-Substrates zu vertiefen, wurde eine Röntgenkristallstruktur von Mma3148/A118M/M209Y hergestellt und mit den Strukturen von Mth212 und ApeI verglichen. Die Kristallstruktur von Mma3148/A118M/M209Y wurde als Apof orm bestimmt. Die Herstellung der Röntgenkristallstruktur von Mth212 wurde in Rahmen der Arbeit von L. Schomacher durchgeführt (L. Schomacher, 2007). Jedoch war die Klärung des Erkennungsmechanismus von Uracil nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Herstellung der Röntgenkristallstruktur das Protein (Mma3148/A118M/M209Y) in eine Menge von 20mg produziert. Die Kristallstruktur wurde von Kristina Lakomek und Achim Dickmann hergestellt und analysiert (Abteilung für Molekulare Strukturbiologie, dieses Institut).

In Abbildung 36A ist die Aufeinanderlagerung der Strukturen des ApeI/DNA-Komplexes, Mth212 und Mma3148/A118M/M209Y dargestellt. In Abbildung 36 B-C sind die im Kapitel 3.4.1 besprochene Aminosäurereste zu sehen.

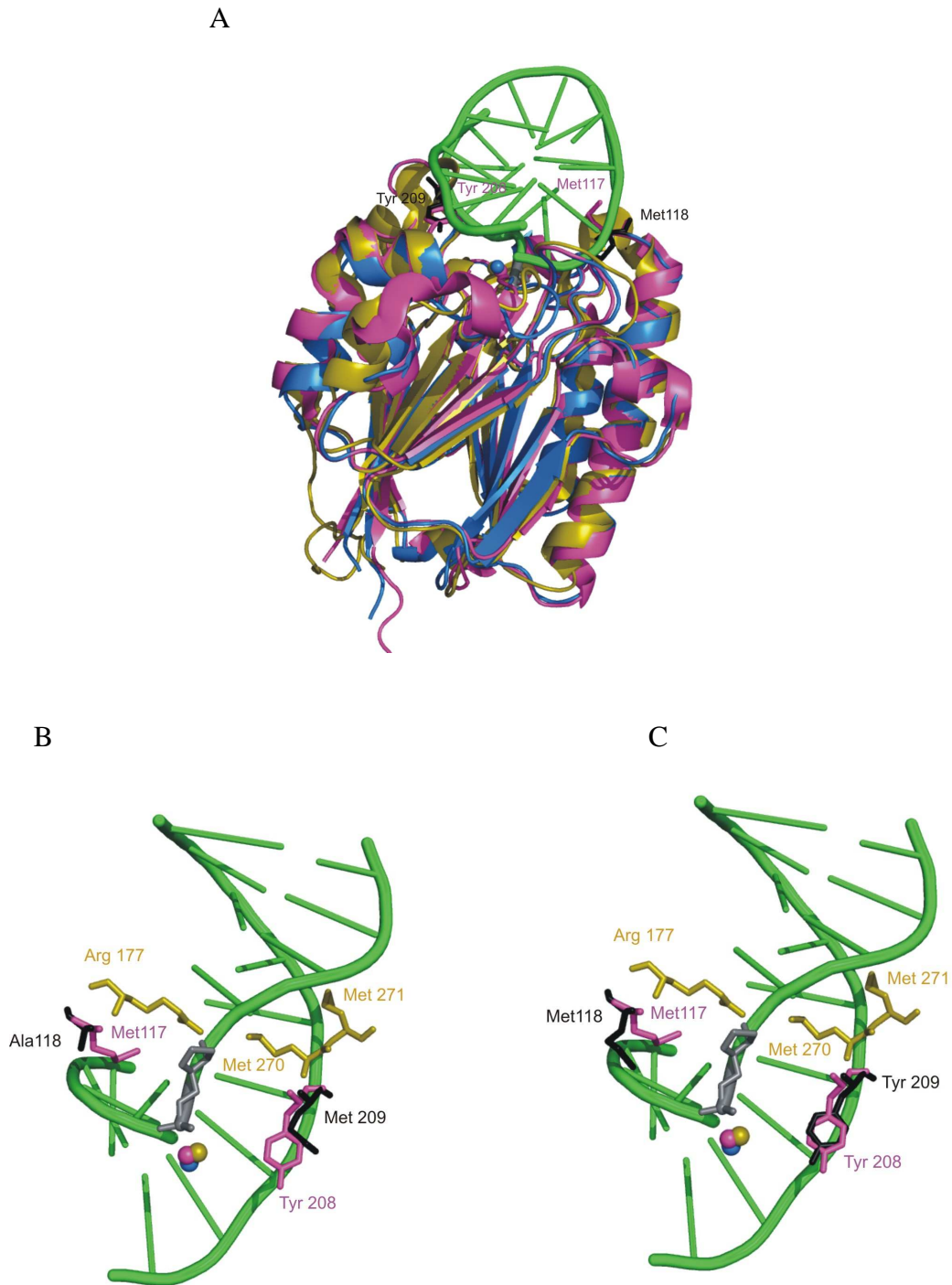


Abbildung 36: Vergleich der Strukturen von ApeI, Mma3148, Mma3148/A118M/M209Y und Mth212.

Die Strukturen wurden mit PyMol bearbeitet. Die PDB Dateien sind 1DE9 von ApeI (Mol *et al.*, 2000), 3G91 von Mth212, (Lakomek, L., 2009, unpubliziert), Mma3148/A118M/M209Y (Lakomek, L., 2009, unpubliziert). (A-C): Die Aufeinanderlagerung der Strukturen des ApeI/DNA-Komplex (gelb), Mma3148/A118M/M209Y (blau) Mth212 (lila). Das Phosphatrückgrat der DNA-Moleküle ist grün. In der Struktur von Mth212 ist das Mg^{2+} -Kation als lila-Kugel dargestellt. In der Struktur von ApeI ist das Mn^{2+} -Kation als gelbe Kugel dargestellt und in der Struktur von Mma3148 ist Mg^{2+} -Kation eine blaue Kugel. Im ApeI-DNA-Komplex ist die AP-Stelle dunkel Grau markiert. Die mit der DNA kontaktierenden

Aminosäurereste sind als *sticks* dargestellt. (A) Vergleich der Strukturen von ApeI, Mth212 und Mma3148/A118M/M209Y. (B) Die Aminosäurereste von ApeI, Mth212, Mma3148, die in die DNA interkalieren. Ala118 und Met 209 von Mma3148 sind schwarz gefärbt (mit PyMol modelliert). (C) Die Aminosäurereste von ApeI, Mth212, Mma3148/A118M/M209Y, die in die DNA interkalieren.

Wie erwartet, weisen alle drei Proteine eine sehr hohe Strukturähnlichkeit zueinander auf. Die Aminosäurereste bei ApeI, Mth212 und bei Mma3148/A118M/M209Y, die für die Katalyse wichtig sind, entsprechen einander (K. Lakomek, 2009, unpubliziert).

Ala118 und Met209 bei Mma3148 wurden durch Met bzw. Tyr ausgetauscht (Kapitel 3.4.1). An der Stelle 118 eingefügtes Methionin inseriert in die kleine Furche und das an der Stelle 209 eingefügte gegenüberliegende Tyrosin hat eine größere Kontaktfläche mit der DNA als Methionin (modelliert) (Abbildung 36 B-C). Die genaue Untersuchung der Wechselwirkungen von Mma3148/A118M/M209Y mit der DNA sind nicht möglich, da nur die Apoform des Proteins bestimmt wurde. Die Reste Arg177 und Met270 bei ApeI, die Met118 und Tyr209 bei Mma3148 entsprechen, inserieren im Modell in die DNA. Dadurch wird der Enzym/DNA-Komplex stabilisiert und die Dissoziation des Proteins von der DNA verlangsamt (Mol *et al.*, 2000). Es könnte sein, dass die zwei Austauschungen bei Mma3148 die Dissoziation des Proteins von der DNA verlangsamt haben und damit die U-Prozessierung nicht nur an „leichten“ Substraten (U/T, U/C) ermöglicht haben, sondern auch an U/G.

3.6 Genetische Untersuchung von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y

Durch zwei Mutationen A118M und M209Y wurde Mma3148 mit einer biochemisch nachweisbaren U/G-Endoaktivität ausgestattet (Mma3148 Wildtyp hat nur U/T- und U/C-Aktivität). Für die nächste Untersuchung, ob die Doppelmutante (Mma3148/A118M/M209Y) genetisch nachweisbar in einen DNA-U-Reparaturweg *in vivo* eingeschlossen werden können, wurde ein U-DNA-Reparaturexperiment *in vivo* geplant. (3.6.2). Wie in Abschnitt 1.3 erklärt ist, kann das geplante Experiment nicht in homologen archaellen Hintergrund durchgeführt werden. Deshalb wurde *E. coli* als Hintergrund gewählt. Bevor das geplante Experiment durchgeführt wird, muss nachgewiesen werden, dass Mma3148/A118M/M209Y in *E. coli* in funktionsfähiger Form vorliegt. Dafür wird ein genetischer Test durchgeführt, der auf den Eigenschaften von Mma3148 als ExoIII-Homolog (nicht aber als U-Endonuklease) beruht (3.6.1).

3.6.1 Überprüfung des Vorliegens von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209 in *E. coli* in funktionsfähiger Form

Die Überprüfung des Vorliegens von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y in *E. coli* in funktionsfähiger Form beruht auf der in der Literatur beschriebenen Beobachtung: Ausfall des *xthA*-Gens (Gen von *E. coli* ExoIII) erzeugt als Phänotyp MitomycinC Sensitivität der Zellen (Cunningham *et al.*, 1986). Die Fähigkeit des *mma3148*-Gens diesen Phänotyp zu komplementieren, kann als Anzeichen von ExoIII-ähnlicher Aktivität des entsprechenden Genproduktes betrachtet werden und damit wird das Vorliegen der Proteine in funktionsfähiger Form demonstriert. Grundlage ist der BW25113 Δ *xthA* Stamm (Kyo kollection, National Institute of Genetics) (2.1.2). Zuerst wurde der BW25113 Δ *xthA* Stamm, in dem das *xthA*-Gen durch eine Kanamycinkassette ersetzt ist, auf die Struktur des Genlocuses und auf die Sensitivität gegenüber Mitomycin C geprüft. Die untersuchten Gene (das *xthA*-Gen für die positive Kontrolle) wurden in einen Vektor mit einem entsprechenden Expressionssystem umintegriert und die Expression der entsprechenden Proteine wurde getestet.

3.6.1.1 Überprüfung des BW25113 Δ *xthA* Stammes (Kyo collection, National Institute of Genetics, Japan)

[i] Struktur der Genlocus

Der Stamm wurde mittels PCR analysiert, wofür vier Primer verwendet wurden: Außenprimer XTH_AUS_SET, XTH_AUS_ ANT (2.1.5.4), die außerhalb der Kanamycinkassette hybridisieren und nach der PCR-Reaktion ein Fragment von ca. 1450bp erzeugen sollen und Innenprimer KAN_SEN, KAN_ANT (2.1.5.3), die innerhalb der Kanamycinkassette hybridisieren und ein Fragment von ca. 470bp generieren sollen. Die Kombinationen XTH_AUS_SET, KAN_ANT und XTH_AUS_ANT, KAN_SEN produzieren Fragmente mit 780 bp bzw. 1050 bp. Die erfolgreiche Verifizierung des Stammes ist in Abbildung 37 zu sehen.

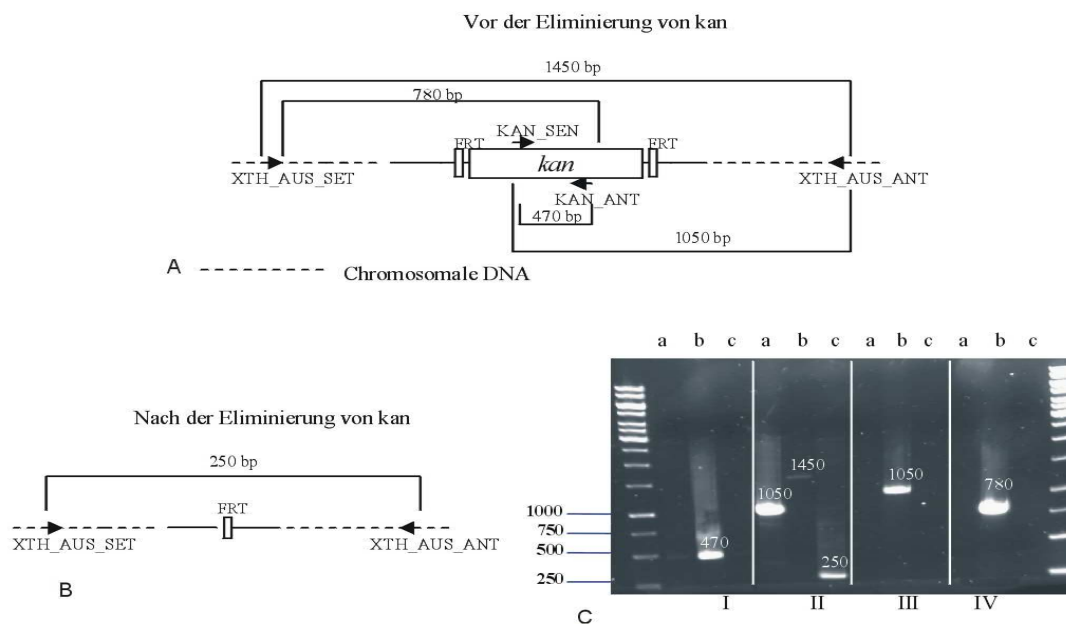


Abbildung 37: PCR-Analyse der Deletionskonstruktion.

A: Schema des *kan*-Gens im Chromosom vor der Eliminierung.

B: Schema nach der Eliminierung des *kan*-Gens

C: Analyse der PCR-Produkte. a: K12, b: BW25113*ΔxthA kan*, c: BW25113*ΔxthA*

I: KAN_ANT, KAN_SET; II: XTH_AUS_ANT, XTH_AUS_SET; III: KAN_SET,

XTH_AUS_ANT; IV: KAN_ANT, XTH_AUS_SET

Nach der Bestätigung, dass im BW25113*ΔxthA* Stamm das XthA Gen durch eine Kanamycinkassette ersetzt wurde, wurde das *kan*-Gen mittels des die FLP-Recombinase exprimierenden Plasmids pCP20 (2.1.4.3) aus dem Chromosom eliminiert (Datsenko K. A. and Wanner B. L., 2000) und der Stamm wurde erneut mit den oben genannten Außen- und Innenprimern verifiziert (Abbildung 37).

[ii] Bestätigung des Mitomycin C Phänotyps des BW25113*ΔxthA* Stammes

Die *ΔxthA* Mutante wurde in der Arbeit von Cunningham R. P. *et al* untersucht und es wurde gezeigt, dass die Mutante eine Sensitivität gegenüber Mitomycin C aufweist. (Cunningham *et al.*, 1986). Das bedeutet, dass die Reparatur der Crosslinks, die MitomycinC in komplementäre Stränge der DNA Duplex einführt (Tomasz, 1995), teilweise von der Aktivität von ExoIII abhängig ist.

Die Sensitivität des BW25113*ΔxthA* Stammes gegenüber Mitomycin C wurde entsprechend der Prozedur von R. P. Cunningham *et al.* bestätigt (Cunningham *et al.*, 1986). Jedoch musste die Menge von Mitomycin C zweimal erhöht werden, um sich dem

von Cunningham *et al.* beschriebenen Effekt zu nähern. Der Wildtyp (K12) demonstriert leichte Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C (30µg/ml), während der $\Delta xthA$ BW25113 Stamm stark sensitiv ist (Abbildung 39).

3.6.1.2 Umklonierung der untersuchten Gene aus dem pET_B_001 Vektor (*xthA*, *mma3148*, *mma3148/A118M/M209Y*) in den pKK-223-3 Vektor

Um zuverlässige und stichhaltige Ergebnisse des Komplementationstestes zu bekommen, ist es wichtig, das richtige Expressionssystem für das untersuchte Protein zu wählen. Es wurde der pKK223-3 Vektor (2.1.4.6) ausgewählt. Im pKK223-3 befindet sich das klonierte Gen unter der Kontrolle des *tac* Promoters. Der *tac* Promoter hat folgende Eigenschaften: (i) Hohes Transkriptions-Niveau im induzierten Zustand. (ii) Sehr niedriges im nicht induzierten Zustand (i.e. Großer Induktionsfaktor). Der Induktionsfaktor von pET_B_001 ist im Vergleich mit pKK223-3 nicht so groß. Die Sequenz des Vektors befindet sich im Anhang (5.2.1.5).

Die untersuchten Gene wurden ursprünglich in den pET_B_001 Vektor integriert und für das Komplementationsexperiment müssen sie in den pKK223-3 inseriert werden. Für die Kontrolle, ob die Komplementation bei den ausgesuchten Bedingungen funktionieren wird, wurde *E. coli* ExoIII (*xthA*) ebenfalls aus pET_B_001 in pKK223-3 integriert.

Die Gene, die die Proteine Mma3148 und Mma3148/A118A/M209Y kodieren, wurden mit den Primern pKK_Mma3148_For (2.1.2), der eine Schnittstelle für EcoRI enthält, und pKK_Mma3148_Rev (2.1.2), der eine Schnittstelle für Hind III hat, amplifiziert (2.2.1.13). Das PCR-Produkt wurde in den pCR-Blunt II-TOPO Vektor (2.1.4.1) zwischenkloniert (2.2.1.14), mit Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, aufgereinigt (2.2.1.8) und über EcoRI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen in den pKK223-3 Vektor ligiert (2.2.1.16). Das Konstrukt pKK223-3/Gen wurde in DH5 α (2.1.2) transformiert (2.2.2.3) und der Transformationsansatz wurde auf Selektivagarplatten ausplattiert. Zwei Klone von pKK223/Mma3148 und zwei Klone von pKK223/Mma3148/A118M/M209Y wurden per Sequenzierung analysiert. Die korrekten Sequenzen der Gene wurden mittels Sequenzanalyse bestätigt (2.2.1.18). Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.4; 5.2.6).

Die Umklonierung des *xthA*-Gens wurde in gleicher Weise durchgeführt. Jedoch mussten bei der Umklonierung des *xthA*-Gens unerwartete Schwierigkeiten überwunden werden, die

im Kapitel 3.6.3 ausführlich betrachtet werden. Klone wurden per Sequenzierung analysiert. Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.8).

3.6.1.3 Testexpression von *E. coli* ExoIII, Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y

Die Expression der Gene *xthA*, *mma3148* und *mma3148/A118M/M209Y* wurde unter reprimierenden und dereprimierenden Bedingungen geprüft. Dafür wurde ein Plasmid pREP4 (2.1.4.4) eingesetzt, das ein Gen für den *lacI* Repressor hat. Der BW25113 Δ *xthA* Stamm wurde mit den pREP4, pKK223-3/Gen und mit pKK223-3 Plasmiden transformiert (2.2.2.3), verdünnt und auf Selektivplatten (Kan⁵⁰/Amp¹⁰⁰) ausplattiert. Von den Platten wurde ein Klon jedes Transformationsansatzes in frisches dYT-Medium inokuliert und bis zum Erreichen einer O.D.₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde dann mit 1mM IPTG induziert und 3 h bei 37°C inkubiert. Der zweite Teil wurde unter denselben Bedingungen ohne Induktion hochwachsen gelassen. Die Expression des *Mma3148/A118M/M209Y* Gens wurde zusätzlich ohne *lacI*-Repressor getestet. Nach 3 Stunden Inkubation wurde ein Aliquot von jedem Ansatz per SDS-PAGE analysiert (2.2.3.2) (Abbildung 38).

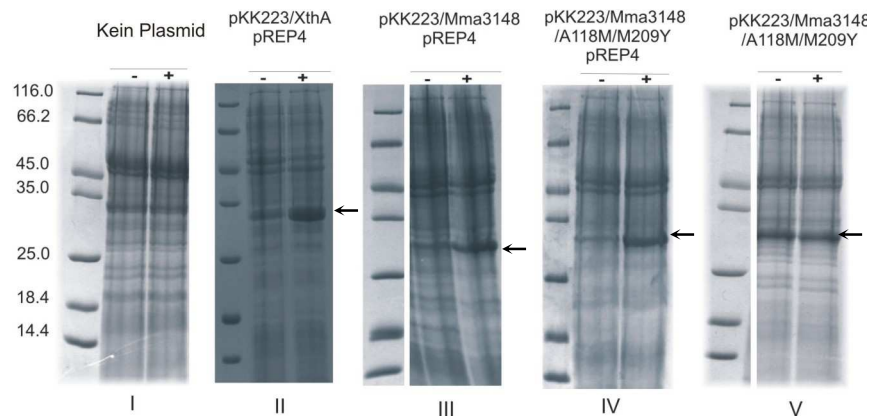


Abbildung 38: SDS-PAGE Analyse der Testproteinexpression.

Stamm in allen Fällen BW25113 Δ *xthA*, -/+ nicht induziert/induziert. *E. coli* ExoIII, Mm3148~31kDa, Weitere experimentelle Details siehe Text.

Wie in Abbildung 38 zu sehen, wurde die Expression der Gene festgestellt. Die Expression des *Mma3148/A118M/M209Y* Gens ohne Repressor und ohne Induktion wurde nachgewiesen. Die Funktionsfähigkeit des ausgewählten Expressionssystems wurde damit bestätigt.

3.6.1.4 Komplementationsexperiment und Bestätigung des Vorliegens von Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y in funktionsfähiger Form in *E. coli*.

Mit Überprüfung des Stammes, Umklonierung der Gene sowie Testexpression der untersuchten Proteine wurden alle notwendigen Vorbereitungen getroffen. Die Sensitivität des *E. coli* K12 BW25113 Δ *xthA* Stammes (2.1.2) gegenüber Mitomycin C wurde entsprechend der Prozedur von R. P. Cunningham *et al.* bestätigt. Die Gene, die Mma3148 und Mma3148/A118M/M209Y Proteine kodieren, wurden in den entsprechenden Vektor umkloniert und die Proteinexpression geprüft. Da *E. coli* ExoIII wahrscheinlich toxisch ist, wurde auf den Kontrollkomplementationstest mit pKK223/*xthA* verzichtet. Zur Untersuchung der Toxizität des *E. coli* ExoIII-Proteins siehe Kapitel 3.6.3. Das Komplementationsexperiment wurde wie in Methode 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 39 sind die Ergebnisse des Komplementationstestes dargestellt.

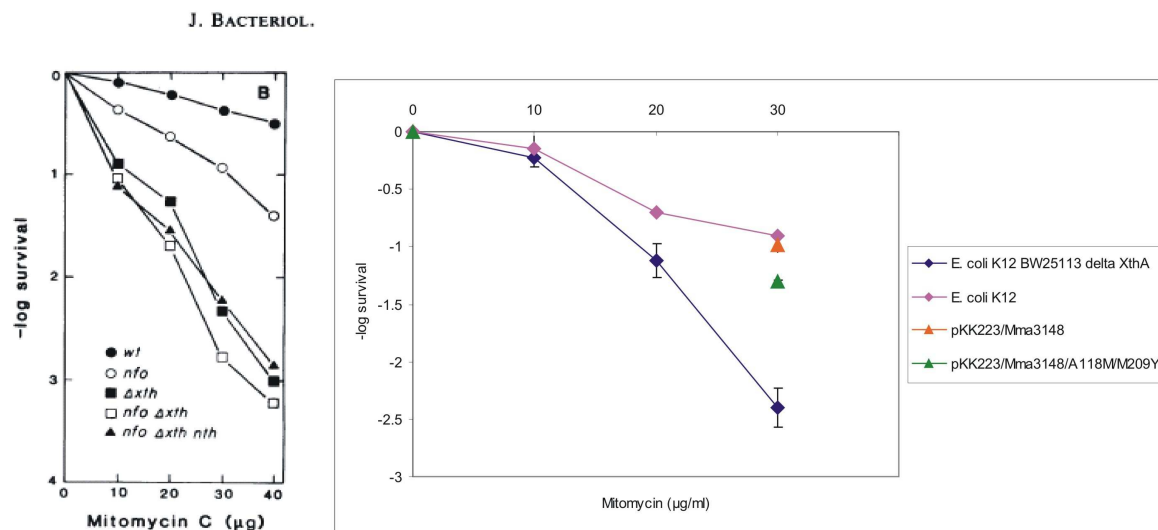


Abbildung 39: Bestätigung der Sensitivität der *E. coli* K12 und BW25113 Δ *xthA* Mutanten gegenüber Mitomycin C und Komplementation des Mitomycin C-Phänotyps durch die *Mma3148* und *Mma3148/A118M/M209Y* Gene.

(Links) Die Empfindlichkeit der K12 und Δ *xthA* Mutanten gegenüber Mitomycin C. Die Abbildung stammt aus Cunningham *et al.*, 1986 (Rechts, rot) Die Empfindlichkeit des *E. coli* K12 Stammes gegenüber MitomycinC. (Rechts, blau) Die Empfindlichkeit des *E. coli* K12 BW25113 Δ *xthA* Stammes aus KyoKollektion gegenüber Mitomycin C. (Orange, Grün) Die Komplementation des *xthA* Gens durch *Mma3148* und *Mma3148/A118M/M209Y* (gemessen nur mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin).

Jeder Test wurde dreimal wiederholt und aus den Werten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Parallel wurden K12 Wildtyp und K12 BW25113 $\Delta xthA$ auf die Sensitivität gegenüber Mitomycin C geprüft. K12 Wildtyp und K12 BW25113 $\Delta xthA$ haben wie erwartet Sensitivität gegenüber Mitomycin C gezeigt. Der K12 Wildtyp hat eine leichte Empfindlichkeit demonstriert, während der K12 BW25113 $\Delta xthA$ Stamm stark sensitiv ist. Jedoch musste die Menge von Mitomycin C zweimal erhöht werden, um sich zum von Cunningham *et al.* beschriebenen Effekt zu nähern. Der Test, ob das *M. mazei* ExoIII-Homolog (Mma3148) und sein Derivat (Mma3148/A118M/M209Y) das *E. coli* ExoIII-Homolog ersetzen kann, wurde mit 30 μ g/ml Mitomycin C durchgeführt. Laut der Ergebnisse komplementiert Mma3148 *E. coli* ExoIII sehr effektiv. Die Werte der drei Experimente lagen sehr nahe zueinander, daher sind die Standardabweichungen ziemlich gering. Mma3148/A118M/M209Y ersetzt *E. coli* ExoIII nicht so effektiv wie der Wildtyp.

Mit dem Komplementationstest wurde gezeigt, dass Mma3148 und sein Derivat in der Lage sind, ein ExoIII-Homolog aus *E. coli in vivo* wirkungsvoll zu ersetzen, was auf die Funktionsfähigkeit des archaellen Proteins in *E. coli* hinweist und eine erfolgreiche Durchführung des geplanten U-DNA-Reparaturexperimentes im heterologen *E. coli* Hintergrund wahrscheinlicher macht.

3.6.2 Versuch der Komplementation des U-Reparaturdefektes von *E. coli* Δ ung mit Mma3148/A118M/M209Y

In der Literatur wurde eine genetische Analyse der *E. coli Mismatch*-Reparatur *in vivo* beschrieben, bei der die Effizienz dieses Reparaturmechanismus mit Hilfe von M13 heteroduplex DNA (hdDNA) gemessen wurde. Die nach der Transformation der Zellen mit der M13 heteroduplex DNA entstandenen blauen oder farblosen Plaques wiesen auf die Reparaturereignisse *in vivo* hin (Kramer *et al.*, 1984). Basierend auf dem Prinzip der dort beschriebenen Methode wird M13mp20-heteroduplex-DNA, in der zwei Fehlpaarungen (U/G und T/C) in die M13*LacZ* α -Region eingefügt sind, konstruiert. (Die für die Herstellung des M13mp20-heteroduplex-DNA-Konstruktes nötigen Schritte sind im Kapitel 3.6.2.2. beschreiben.) Beide Stränge des Konstruktes codieren den farblosen Phänotyp (Abbildung 40). Wie im Abschnitt 3.6.2.1 näher erläutert wird, kann die U-DNA-Reparatur durch die U-Endoaktivität der Doppelmutante oder durch das *Mismatch*-System der Zelle ausgelöst werden. Als Folge der *Mismatch*-Reparatur oder Ausbleiben der Reparatur ist die Bildung der farblosen Plaques zu erwarten. Blaue Plaques

sind möglich als Resultat von Reparatur der U/G-Fehlpaarung zugunsten des Plus-Stranges (ausgelöst z.B. durch endonukleolytischen Schnitt beim U-Rest), sofern die DNA-Synthesetraktlänge weniger als 46 Nukleotiden beträgt.

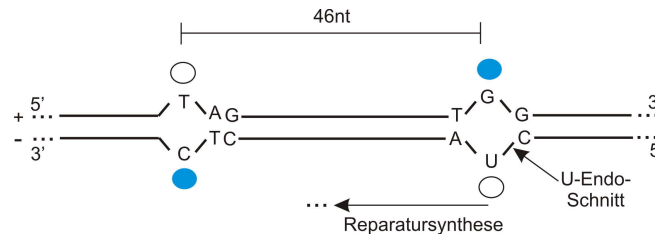


Abbildung 40: Schema des Fragmentes des M13mp20-heteroduplex-DNA-Konstruktes.

(+) bzw. (-): Plus- bzw. Minus-Strang des Phagengenoms. Thymin des Stopcodons 32 (TAG) im *lacZa*-Gen auf dem (+) Strang bildet eine Fehlpaarung mit Cytosin aus. Guanin des Codons Tryptophan 74 im *lacZa*-Gen auf dem (+) Strang bildet eine Fehlpaarung mit Uracil aus. (Weitere Details siehe im Kapitel 3.6.2.1). Weiße Kreise: Stopcodons (im Plus-Strang) bzw. Komplement davon (im Minus-Strang). Blaue Kreise: Sinncodons bzw. Komplement davon.

3.6.2.1 Erklärung der verwendeten genetischen Assays

Zwei Arten der Reparatur der Heteroduplex DNA müssen in Betracht gezogen werden:

1. DNA-*Mismatch*-Reparatur
2. DNA-U-Reparatur

Die U-DNA-Reparatur soll auf die von der DNA-U-Endonukleaseaktivität der Doppelmutante ausgelösten Ereignisse reduziert werden. Aus diesem Grund wird ein *E. coli* K12 Δung Stamm als Hintergrund verwendet und durch die Struktur des heteroduplex DNA Konstruktes werden die beiden erwähnten Arten von Reparatur unterscheidbar.

Im Fall, dass keine Reparatur stattfindet, treten keine Veränderungen in (+) oder (-) Strang auf. Es wird passive Segregation der auf den beiden Strängen codierten Marker erwartet. In diesem Fall werden nur farblose Plaques gebildet.

1. DNA-*Mismatch*-Reparatur (MMR).

Für DNA-*Mismatch*-Reparatur kommen zwei Fälle in Betracht. (i) Reparatur mit (+) Strang als Template. Die Reparatursynthese läuft auf dem (-) Strang in 5'→3' Richtung. Die linke Fehlpaarung (T/C) ist kein Substrat für DNA-*Mismatch*-Reparatur, deshalb bleibt das Stopcodon auf dem (+) Strang vorhanden. Die rechte Fehlpaarung wird repariert (AUC→ACC). Die linke Fehlpaarung wird wegen der *long patch* Natur der

DNA-*Mismatch*-Reparatur passiv korepariert (Marti and Fleck, 2004), mit dem Ergebnis des Komplements eines Stopcodons im (-) Strang. Also codieren beide Stränge für farblosen Plaquesphänotyp.

(ii) Reparatur mit (-) Strang als Template. Die Reparatursynthese läuft auf dem (+) Strang in 5'→3' Richtung. Der (+) Strang wird in Abwesenheit von Koreparatur zwei Stopcodons enthalten. Bei Koreparatur des T/C-Mismatches wird das Stopcodon passiv zu einem Glu (GAG)-Codon geändert. Also haben in diesem Fall beide Stränge die für farblose Plaquephänotypen codierende Sequenz.

2. DNA-U-Reparatur, die durch die U-Endoaktivität der Doppelmutante ausgelöst wird.

Reparatur mit (+) Strang als Template. Auf dem (-) Strang wird DNA-U-Reparatur mit einer Strangincision auf 5'-Seite des Uridinrestes gestartet. Falls die entstehende Strangunterbrechung Reparatur mit kurzen Synthesetraktlängen auslöst, ist die Reparatur an U/G ohne passive Koreparatur links zu erwarten. Das Resultat ist eine heteroduplex DNA mit einem Stopcodon im (+) Strang und den Komplementen von Glu und Trp im (-) Strang. Die Zellen werden nach der Markersegregation 2 Phagenarten enthalten, was zu einem gefleckten Plaquephänotyp führt.

3.6.2.2 Herstellung eines M13-heteroduplex-DNA-Konstruktes mit U/G- und T/C-Fehlpaarung

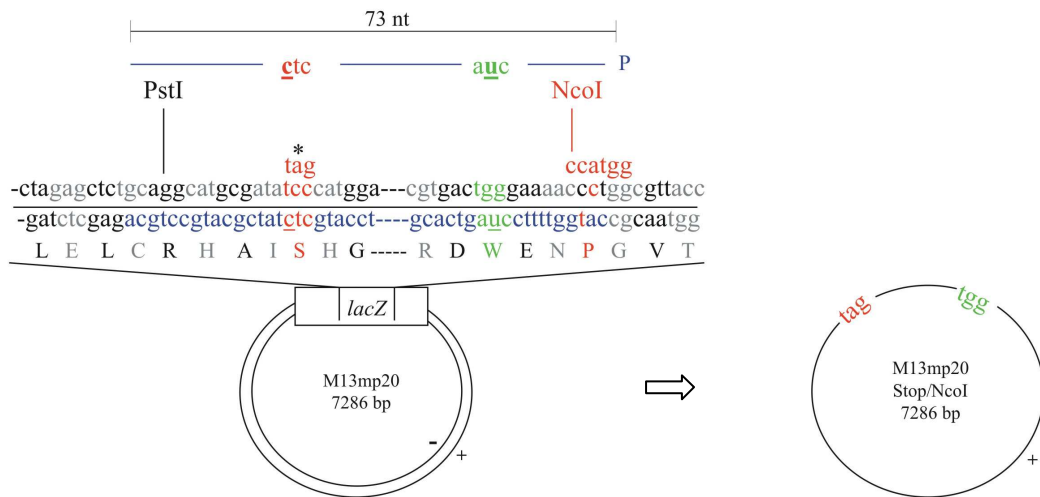
Das M13mp20-heteroduplex-DNA-Konstrukt wurde, wie schematisch in Abbildung 41 skizziert ist, vorbereitet. Alle Schritte der Herstellung des Konstruktes wurden im Agarose Gel analysiert (2.2.1.11) (Abbildung 42).

Ausgangsmaterial für das heteroduplex Konstrukt war M13mp20 dsDNA (2.1.4.7). Auf dem (+) Strang im *lacZα* Gen wurde ein Serincodon 32 (TCC) mittels *Quick change mutagenesis* (2.2.1.10) gegen ein Stopcodon (TAG) ausgetauscht. Gleichzeitig wurde damit eine NcoI-Schnittstelle zerstört (Abbildung 41A). Durch den zweiten Austausch von Prolincodon 50 (CCT) gegen Histidincodon (CAT) wurde eine neue NcoI-Schnittstelle eingebaut (Abbildung 41A). Ein Fragment, in dem ein Stopcodon eingeführt wurde und das zwischen der PstI und der neuen NcoI-Schnittstellen liegt, ist 73 nt lang und schließt Tryptophan 47 (TGG) ein (Abbildung 41A; Abbildung 42_1). Das Konstrukt wurde M13mp20/Stop/NcoI genannt. Die korrekte Sequenz des Gens wurde mittels Sequenzanalyse bestätigt (2.2.1.18). Die Sequenz befindet sich im Anhang (5.2.3). Der (+) Strang wurde isoliert (Abbildung 41A; Abbildung 42_3). M13mp20/Stop/NcoI dsDNA wurde mit PstI und NcoI gespalten, wodurch das 73nt lange Fragment ausgeschnitten

wurde. Das größere Fragment wurde mittels Suchrosegradient gereinigt (Abbildung 41B_1; Abbildung 42_2). Das gereinigte Fragment wurde mit einem Überschuss der M13mp20/Stop/NcoI ssDNA gemischt (Abbildung 41B_2; Abbildung 42_4). Die DNA-Mischung wurde thermisch denaturiert und renaturiert. Das Resultat dieses Schrittes ist die Ausbildung des gap duplex DNA-Konstruktes (gdDNA) (Abbildung 41B_3). Die gdDNA hat im Vergleich mit übriggebliebener ssDNA und doppelsträngiger linearer dsDNA eine niedrigere elektrophoretische Mobilität (Abbildung 42_5). Die Mutationen wurden bei der Annealing des synthetischen Primers eingeführt (Abbildung 41B_4; Abbildung 42_8). Der Primer ist 73 Nukleotide lang und zu dem DNA-Abschnitt, der gegenüber der Lücke liegt, mit Ausnahme von 2 Nukleotiden komplementär. Nach der Hybridisierung entstand also ein Konstrukt mit 2 Fehlpaarungen, nämlich eine T/C Fehlpaarung mit eingebautem Stopcodon (TAG/CTC) und eine U/G Fehlpaarung mit Trp 47 (TGG/AUC) (Abbildung 41B_5; Abbildung 42_8). Bevor das Konstrukt ligiert wird, muss die Mischung von ssDNA und doppelsträngiger linearer dsDNA, die an der Hybridisierung nicht teilgenommen hat, befreit werden, um unerwünschte Ligationsereignisse zu vermeiden. Dies wird mit Behandlung der Mischung mit ExoV erreicht. ExoV ist eine ATP-abhängige Exonuklease, die exonukleolytisch lineare einzelsträngige und lineare doppelsträngige DNA abbauen kann (Goldmark, 1972). Zusätzlich kann das Protein endonukleolytisch zirkuläre einzelsträngige DNA spalten (Goldmark, 1972). Die endonukleolytische Aktivität wurde nicht an doppelsträngiger zirkulärer DNA detektiert (Karu, *et al.*, 1973). Jedoch kann ExoV doppelsträngige zirkuläre DNA abbauen, die eine einzelsträngige Lücke von 5 oder mehr Nukleotiden aufweist (Karu, *et al.*, 1973).

Die nach dem Denaturierung–Renaturierungsschritt entstandene gdDNA hat eine 73nt lange einzelsträngige Lücke. Für die Kontrolle wurde die Probe nach diesem Schritt mit ExoV behandelt (Abbildung 42_6). Laut der oben erwähnten Studien ist der vollständige Abbau aller DNA-Spezies in der Mischung zu erwarten. Jedoch ist nach der Behandlung immer noch gdDNA zu sehen. Die gdDNA unter den verwendeten Bedingungen scheint stabil zu sein. Nach dem Annealing des synthetischen Primers wurde die DNA-Mischung mit ExoV behandelt (Abbildung 42_9) und danach wurde das aus drei Teilen bestehende DNA Konstrukt ligiert (Abbildung 42_10).

A



B

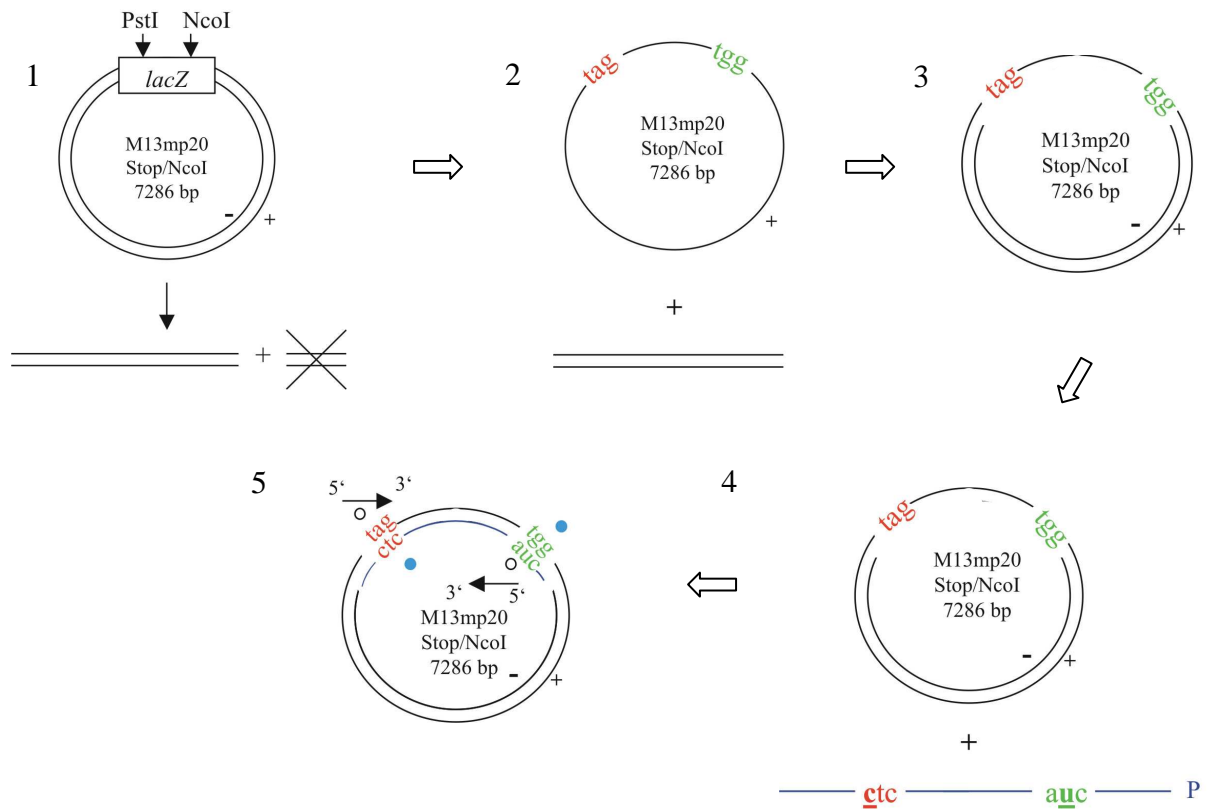


Abbildung 41: Schema der Herstellung von heteroduplex DNA *in vitro*.

(A) dsDNA von M13mp20. Rot sind die eingefügten Mutationen markiert. Es wurde im *LacZa* Gen Serin 32 gegen Stopcodon eingetauscht und eine neue NcoI-Schnittstelle eingebaut. Grün ist Tryptophan 74 markiert, das für die Herstellung von heteroduplex DNA wichtig ist. Blau ist ein am 5'-Ende phosphorylierter Primer (73nt) mit zwei Codons (ctc und auc) markiert, die zwei Fehlpaarungen mit dem eingefügten Stopcodon (tag) und dem Tryptophan (tgg) ausbildet. ssDNA mit dem Stopcodon wurde isoliert. (B) 1. dsDNA mit eingefügten Mutationen wurde mit PstI und NcoI gespalten. 2. Das große Fragment wurde mittels Suchrosegradient gereinigt (2.2.1.9) und 0,5µg Fragment wurde mit 1,25µg einzelsträngiger DNA in

KT-Puffer (2.1.9) gemischt. Die Mischung wurde bei 99°C für 5 min inkubiert, damit dsDNA denaturiert und dann bei 65°C für 6 min inkubiert. 3. Denaturierung – Renaturierungsschritt ergibt gapDNA. 4. gapDNA wurde mit 4pmol Primer gemischt und 10min bei 65°C erhitzt, was zu der Ausbildung von dem aus drei Teilen bestehenden DNA Konstrukt führt. Die Mischung wurde mit ExoV behandelt. 5. Das Konstrukt wurde bei 16°C über Nacht ligiert.

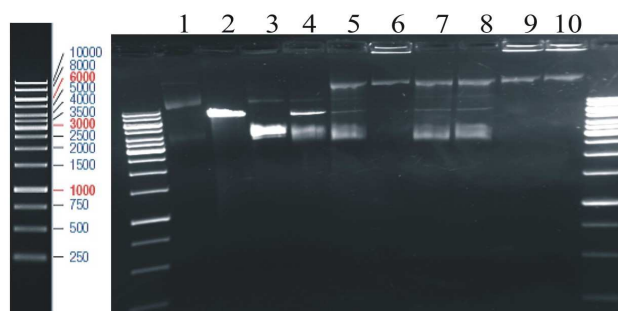


Abbildung 42: Gelelektrophorese Analyse von verschiedenen Zwischenstufen in der Konstruktion von heteroduplex DNA.

1. RF-DNA von M13mp20. 2. RF-DNA von M13mp20 gespalten mit NcoI, PstI. 3. ssDNA von M13mp20. 4. Mischung von gezeigten Spuren 2 und 3 DNAs. 5. Mischung 4 nach der Erhitzung. 6. Mischung 5 nach der Behandlung mit ExoV. 7. Mischung 5 mit dem Primer. 8. Mischung 7 nach der Erhitzung. 9. Mischung 8 nach der Behandlung mit ExoV. 10. Mischung 9 nach der Ligation.

3.6.2.3 Herstellung eines *E. coli* K12 NM522 Δ ung Stammes

Da ein U-prozessierendes Protein getestet wird, muss ein entsprechender Stamm hergestellt werden. *E. coli* besitzt mindestens zwei Uracil prozessierende Proteine: Ung und Mug. Jedoch wird Uracil aus der DNA hauptsächlich durch die Aktivität des Ung-Proteins erkannt und entfernt (Lutsenko and Bhagwat, 1999). Um zuverlässige Ergebnisse zu bekommen, muss das *ung*-Gen aus dem Chromosom eines K12 *E. coli* Stammes eliminiert werden. Da das Experiment auf Blau-Weiß-Screening eines M13 Konstruktes basiert, sind folgende Eigenschaften für den Stamm erforderlich. Die Erste: M13 ist fähig nur den Bakterienstamm zu infizieren, der die am F-Faktor kodierte Sexpili hat (Sambrook, J., et al., 1989). Die Zweite: Der Stamm muss für die Ermöglichung des Blau-Weiß-Screenings eine Mutation im *lacZ*-Gen tragen. Der *E. coli* K12 NM522 Stamm entspricht den oben besprochenen Bedingungen. Das *ung*-Gen wurde in diesem Stamm mittels P1-Transduktion eliminiert (2.2.2.1). Der Phage P1 wurde auf einem Donor vermehrt und mit diesem Phagenlysate ein Rezipient infiziert wurde. Als Donor wurde *E. coli* BL-21_UX (2.1.2) (L. Schomacher, 2007) verwendet, in dem das *ung*-Gen durch eine

Kanamycinkassette ersetzt wurde. Ein kleiner Teil der Phagen nahm die Kanamycinkassette auf. Bei der Infektion bekam der Rezipient (NM522; 2.1.2) den Marker, der dann mit dem auf dem Chromosom des Rezipienten befindlichen *ung*-Gen rekombinieren kann. Die positiven Klone wurden auf Kanamycinplatten selektiert und dann per PCR verifiziert. Für die PCR-Analyse wurden vier Primer verwendet: Außenprimer UNG_AUS_SEN, UNG_AUS_ANT (2.1.5.3), die außerhalb des Kanamycinkassette hybridisieren und nach der PCR-Reaktion ein Fragment von ca. 1745 bp erzeugen und Innenprimer KAN_SEN, KAN_ANT (2.1.5.3), die innerhalb des Kanamycinkassette hybridisieren und ein Fragment von ca. 470bp generieren sollen. Die Kombinationen UNG_AUS_SET, KAN_ANT und UNG_AUS_ANT, KAN_SEN produzieren Fragmente mit 1176 bp bzw. 940 bp. Als Kontrolle wurden BL-21_UX und NM522 Stämme mit denselben Primern analysiert. Die erfolgreiche Verifizierung des Stammes ist in Abbildung 43 zu sehen.

Der BL-21_UX Stamm hat eine Kanamycinkassette und deshalb ergab sich ein gleiches Muster wie bei der Analyse vom NM522 Δ ung Stamm. Beim NM522 Stamm ist ein *ung*-Gen vorhanden geblieben, das 920nt hat und bei der PCR-Reaktion mit den UNG-Primern amplifiziert wurde.

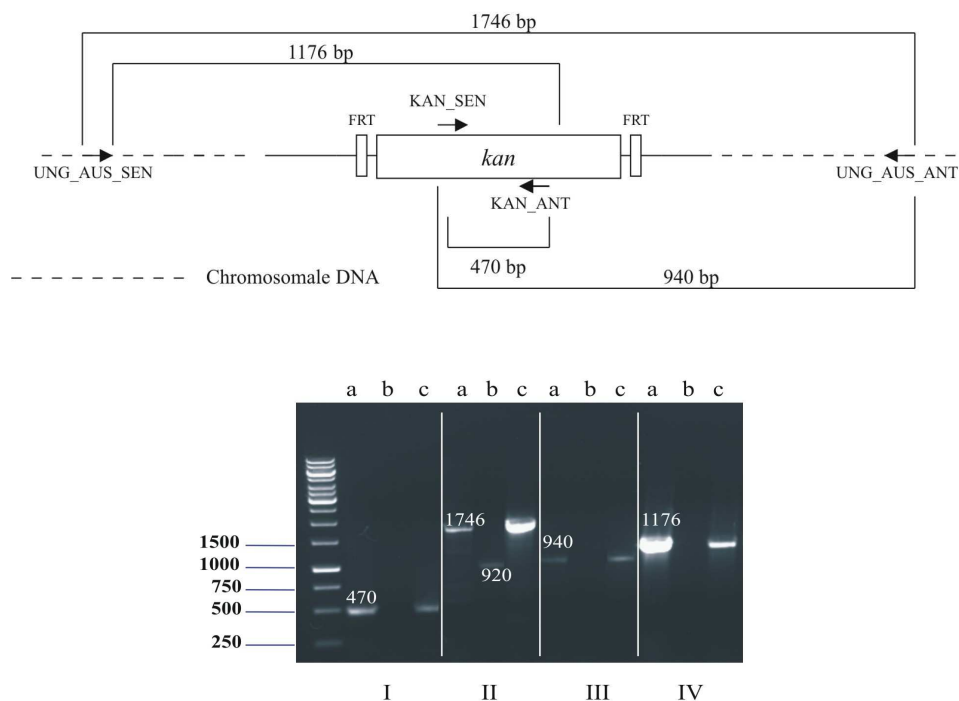


Abbildung 43: PCR-Analyse der NM522 Δ ung Deletionskonstruktion.

Oben: Schema des *kan*-Gens im Chromosom. Unten: Analyse der PCR-Produkte. Erste Spur ist 1kb DNA Marker (2.1.6.1) a: BL21_UX, b: NM522, c: NM522 Δ ung *kan*. Der Kommentar ist im Text. I: KAN_ANT, KAN_SEN; II: UNG_AUS_ANT, UNG_AUS_SEN; III: KAN_SEN, UNG_AUS_ANT; IV: KAN_ANT, UNG_AUS_SEN

3.6.2.4 U-DNA-Reparatur *in vivo*

Für die Durchführung des geplanten U-DNA-Reparatur *in vivo* Experimentes wurden die besprochenen Vorbereitungen getroffen. Es wurde ein NM522 Δ ung Stamm hergestellt und das M13mp20-heteroduplex-DNA-Konstrukt angefertigt.

Das M13mp20-heteroduplex-Konstrukt ist mit folgenden zwei Modifikationen ausgestattet. Die Erste ist ein Stopcodon (TAG) statt Ser32 im lacZ-Gen auf dem (+) Strang. Das Thymin des eingefügten Stopcodons bildet eine Fehlpaarung mit Cytosin aus. Die Zweite: Guanin des Codons Trp 47 im lacZ-Gen auf dem (+) Strang bildet eine Fehlpaarung mit Uracil aus (Abbildung 41_5).

Es wurden zuerst einige Kontrollexperimente benötigt: 1. Mit der ersten Kontrolle wurde geprüft, ob das vorgeschlagene System erwartungsgemäß funktioniert und die U/G Fehlpaarung repariert wird. Dafür wurde NM522 mit dem M13mp20-heteroduplex-Konstrukt transformiert (2.2.2.3). 2. Die zweite Kontrolle soll bestätigen, dass im NM522 Δ ung Stamm die U/G-Reparatur nicht stattfinden kann. Der NM522 Δ ung Stamm wurde mit dem M13mp20-heteroduplex-Konstrukt transformiert und der Versuch wurde wiederholt. 3. Für die Kontrolle, ob die in den pKK223-3 Vektor integrierten Gene das aus dem Chromosom deletierte *ung*-Gen komplementieren können, wurde der NM522 Δ ung Stamm zuerst mit dem pKK223-3/*ung* Konstrukt und danach mit dem M13mp20-heteroduplex-Konstrukt transformiert (2.2.2.3). 4. Für die vierte und letzte Kontrolle wurde der NM522 Δ ung Stamm mit dem pKK223-3/Mma3148 Plasmid und dann mit dem M13mp20-heteroduplex-Konstrukt transformiert (2.2.2.3).

Das letzte Experiment soll zeigen, ob die Mma3148/A118M/M209Y Doppelmutante mit schwacher U/G-Aktivität in der Lage ist, die U/G-Reparatur zu initiieren. Der NM522 Δ ung Stamm wurde mit dem pKK223-3/Mma3148/A118M/M209Y Plasmid und dann mit dem M13mp20-heteroduplex-Konstrukt transformiert.

Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt. Die Originaldaten befinden sich im Anhang (5.1).

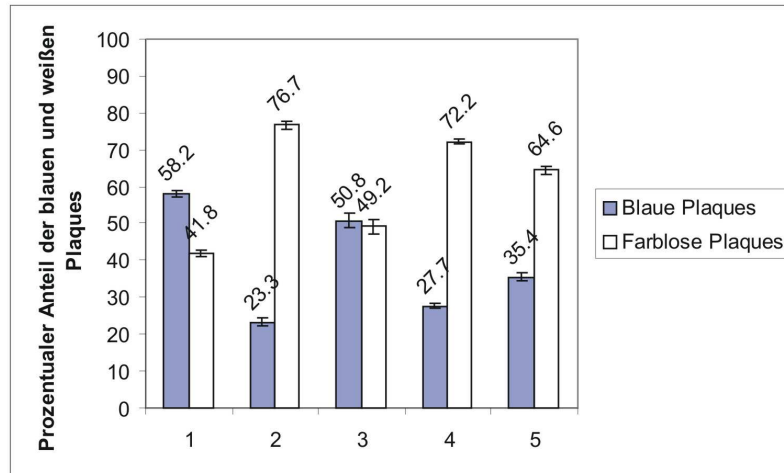


Abbildung 44: Prozentualer Anteil der blauen und farblosen Plaques nach dem Reparaturoperiment.

(Ordinate) Prozentualer Anteil von blauen und farblosen Plaques. (Abszisse) 1. NM522, 2. NM522 Δ ung, 3. NM522 Δ ung/pKK223-3_ung, 4. NM522 Δ ung/pKK223-3_Mma3138, 5. NM522 Δ ung/pKK223-3_Mma3138_A118M/M209Y. (Das *ung*-Gen wurde in pKK223-3 zwischen SmaI und PstI ligiert (Die Umklonierung des *ung*-Gens in den pKK223-3 wurde mit der gleichen Prozedur (Seite 86) durchgeführt. Die RBS wurde aus dem pET_B_001 mitkloniert). Die Sequenz ist im Anhang 5.2.13 angegeben). Die entsprechenden Stämme wurden mit 3 μ l Konstrukt transformiert (2.2.2.3). Die Transformationsansätze wurden in LB-Medium 1:10, 1:100 verdünnt. Jeder Ansatz wurde mit 200 μ l entsprechender Übernachtszellkultur gemischt und bei 37°C für 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort mit 3ml LB-Weichagar, 120 μ l X-gal (20mg/ml), 4 μ l IPTG (1M) bei 45°C gemischt und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 18h inkubiert. Die Originaldaten jedes individuellen Experiments sind im Anhang 5.1 angegeben.

Das erste Kontrollexperiment ergab 58,2% blaue Plaques und 41,8% farblose Plaques (Abbildung 44_1). Die Bildung der blauen Plaques könnte durch folgende Ereignisse am M13mp20-heteroduplex-Konstrukt geklärt werden. U/G-Fehlpaarung wurde im NM522 Wildtyp durch die Aktivität von *E. coli* Ung-Protein repariert. Die farblosen Plaques können der Vermutung nach in folgenden Fällen gebildet werden. Die U/G-Reparatur hat nicht stattgefunden oder der mutagenic Primer wurde nicht mit M13mp20/Stop/NcoI ligiert und die farblosen Plaques stammen vom (+) Strang mit dem Stopcodon.

2. Das zweite Kontrollexperiment ergab 23,3% blaue Plaques und 76,7% farblose Plaques (Abbildung 44_2). Die blauen Plaques können in diesem Fall als Folge der U-Reparatur, die durch die unerhebliche U-Aktivität des zweiten *E. coli* Uracil prozessierenden Protein (Mug) initiiert wurde (Lutsenko and Bhagwat, 1999), entstehen.

Mit den beiden Kontrollexperimenten wurde die erwartete Reparatur des hergestellten M13- heteroduplex-Konstruktes gezeigt.

3. Das dritte Kontrollexperiment ergab 50,8% blaue Plaques und 49,2% farblose Plaques (Abbildung 44_3). Die Ungefähr gleiche Menge von blauen und farblosen Plaques in diesem Fall könnte durch die Konkurrenz zwischen MMR und die durch die U-Endoaktivität ausgelöste Reparatur erklärt werden. Da der erste und der dritte Kontrolltest ungefähr gleiche Mengen der farblosen und blauen Plaques ergaben, wurde die Funktionsfähigkeit des vorgeschlagenen Systems für den Nachweis der U/G-Reparatur *in vivo* bestätigt.

4. Mit der vierten und der letzten Kontrolle wurden 27,7% blaue und 72,2% farblose Plaques festgestellt (Abbildung 44_4). Die Messwerte der 2 und 4 Kontrollexperimente lagen wie erwartet ziemlich nah zueinander und damit wurde bestätigt, dass Mma3148 keine U/G-Reparatur ausführt.

5. Mit dem letzten Versuch, der zeigen soll, ob die Mma3148/A118M/M209Y Doppelmutante die U/G-Reparatur ausführen kann, wurden folgende Ergebnisse erzielt: 35,4% blaue Plaques und 64,6% farblose Plaques (Abbildung 44_5). Im Experiment mit der Doppelmutante wurden 7,7% mehr blaue Plaques erzeugt, als in dem mit dem Wildtyp. Die Daten liefern einen schwachen, aber ausbaufähigen Hinweis auf Beteiligung des Mma3148/A118M/M209Y-Proteins an U/G-Reparatur. Dieser schwache Effekt könnte bei Wiederholung des Tests in einem Stamm, in dem MMR deaktiviert ist, stärker ausfallen (aus Zeitgründen nicht gemacht).

3.6.3 Untersuchung der Toxizität bei der Überproduktion von *E. coli* ExoIII

Wie erwähnt wurde, traten bei der Umklonierung des *xthA*-Gens unerwartete Schwierigkeiten auf. Um den überraschenden Vorfall zu klären, wurden mehrere Transformanten nach der Transformation von DH5 α und XL10 mit dem Ligationsansatz (pKK223-3/*xthA*) untersucht. Um mögliche Gründe der Schwierigkeiten zu finden, wurden inaktive Mutanten von *E. coli* ExoIII konstruiert und untersucht.

3.6.3.1 Sequenzanalyse des pKK223-3/*xthA* Konstrukts nach der Transformation in DH5 α und XL10 Stämme

Das *xthA* Gen wurde mit den Primern pKK_Xth_For (enthält eine EcoRI Schnittstelle) und pKK_Xth_Rev (enthält eine HindIII Schnittstelle) amplifiziert (2.2.1.13). Das

PCR-Produkt wurde in den pCR-Blunt II-TOPO Vektor zwischenkloniert (2.2.1.14), mit geeigneten Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, aufgereinigt (2.2.1.7) und über EcoRI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen in den pKK223-3 Vektor ligiert (2.2.1.16). Das Konstrukt pKK223-3/Gen wurde in DH5 α transformiert (2.2.2.3) und der Transformationsansatz wurde auf Selektivagarplatten (Amp¹⁰⁰) ausplattiert. Für die Aufklärung der aufgetretenen Schwierigkeiten wurden mehrere Transformanten untersucht. In Abbildung 45 ist ein Fragment der Sequenz der pKK223-3/*xthA* Konstrukts dargestellt.

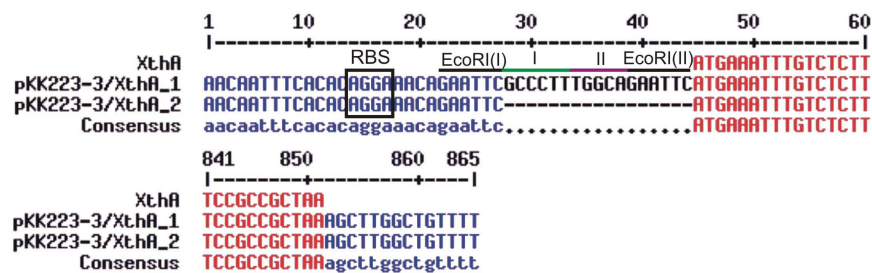
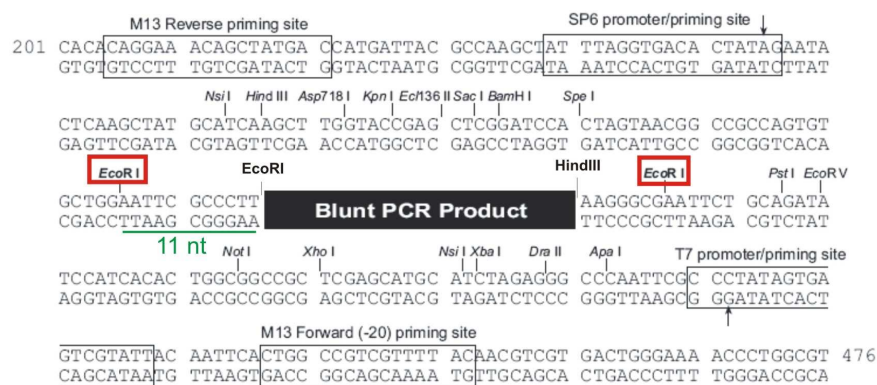


Abbildung 45: Sequenzanalyse des pKK223-3/*xthA* Konstrukts.

Ausschnitt der Sequenzen von pKK223/*xthA*_1 mit einem TOPO-Fragment und pKK223/*xthA*_2 ohne TOPO-Fragment. Das schwarze Quadrat markiert die ribosomalen Bindungsstellen. EcoR(I) - die Schnittstelle vom pKK223 Vektor. EcoRI(II) - die Schnittstelle vom Primer. (I) – TOPO-Fragment, (II) – 5 Nukleotiden, die zum Klonierungsprimer gehören.

A



B



Abbildung 46: Multiple cloning site aus (A) pCR[®]-Blunt II TOPO[®](Invitrogen) und (B) pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech).

Die Gene wurden mit den Primern amplifiziert, die Schnittstellen für EcoRI und für Hind III enthalten. Das PCR-Produkt wurde in den pCR-Blunt II-TOPO Vektor zwischenkloniert. Da der pCR-Blunt II-TOPO Vektor auch zwei EcoRI Schnittstellen 11nt vor und 7 nt nach dem inserierten Gen hat, hat bei der Ausschneidung des Gens aus dem Vektor mit EcoRI und HindIII Enzymen eine Partialverdau stattgefunden, sodass ein TOPO-Fragment 11nt mit dem Gen ausgeschnitten und in den pKK223-3 integriert wurde.

Rot sind EcoRI und Hind III Schnittstellen markiert. Grün sind 11 nt aus dem pCR-Blunt II-TOPO Vektor, die in den pKK223-3 mit dem Gen integriert wurden.

Die Sequenzen haben gezeigt, dass die analysierten Klone eine zusätzliche Sequenz vor dem Startcodon haben. Das Fragment stammt vermutlich aus dem TOPO-Vektor, wohin das Gen vor der Integrierung in den pKK223-3 Vektor zwischenkloniert wurde. Um die Vermutung zu bestätigen wurden die Multiple cloning sites aus pCR[®]-Blunt II TOPO[®] und pKK223-3 analysiert (Abbildung 46).

Für die Integrierung des Gens in den pKK223-3 wurden die EcoRI und HindIII Schnittstellen gewählt. Eine andere Schnittstelle außer EcoRI vor dem Startcodon konnte wegen der Entfernung des Startcodons des Gens von der RBS nicht gewählt werden. Für die Expression des Gens ist wichtig, dass die optimale Entfernung des Startcodons des Gens zur ribosomalen Bindungsstelle (RBS) 5 bis 13 bp beträgt (Abbildung 46B). Der TOPO-Vektor hat auch zwei EcoRI Schnittstellen, die sich 11nt vor und 7 nt nach dem inserierten Gen befinden (Abbildung 46A). Für weitere Klonierung in den pKK223 Plasmid wurde das *xthA* Gen aus dem TOPO-Vektor mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Bei der Behandlung der TOPO-Klone mit den Restriktionsenzymen hat ein Partialverdau stattgefunden, so dass ein TOPO-Fragment 6bp mit dem Gen ausgeschnitten wurde. Im Fall des zusätzlichen Fragments beträgt der Abstand zwischen dem Startcodon des Gens und der RBS des Vektors 27 bp, was die Genexpression verhindern kann (Abbildung 45).

Um die TOPO-Sequenz zu beseitigen, wurde die Inkubationszeit der Spaltung auf 3h und über Nacht verlängert. Das ausgeschnittene Gen wurde mit dem pKK223-3 Plasmid ligiert, in die kompetente DH5 α transformiert und die Klone wurden mittels der Sequenzierung analysiert. Die Sequenzen haben bestätigt, dass die untersuchten Vektoren entweder das TOPO-Fragment oder die Punktmutationen haben. Es wurden insgesamt 16 Sequenzen analysiert, 12 davon hatten ein TOPO-Fragment vor dem Startcodon und 4 von erwähnten 12 hatten eine Deletion vor dem Stopcodon, bei 2 von 16 Sequenzen wurde das Startcodon Methionin gegen Isoleucin (ATG \rightarrow ATA) ausgetauscht. Die letzten 2 hatten eine spontane Mutation im Gen. Es wurden Glycin gegen Arginin (GGC \rightarrow CGC) und Tryptophan gegen

Stopcodon (TGG→TAG) getauscht. Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.8). Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde vermutet, dass das *E.coli* ExoIII Protein für die Zelle in großen Mengen toxisch ist und nur die Zellen überleben, in denen das Gen nicht exprimiert wird (der Fall mit dem TOPO-Fragment) oder ein mutiertes Protein produziert wird.

Wenn das eigene ExoIII-Protein für *E. coli* in großen Mengen toxisch ist, muss die Expression dieses Proteins in der Zelle für die Ermöglichung der Klonierung unterdrückt werden. Da der pKK223-3 Vektor keinen *lacI* Repressor hat, wurde ein *E. coli* Stamm XL10-Gold (Stratagene) besorgt, der ein *lacI* Gen enthält. Die kompetenten XL10 Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und 7 Klone wurden sequenziert. 6 Klone waren fehlerfrei. Ein Fragment der korrekten Sequenz ist in Abbildung 45 zu sehen.

3.6.3.2 Bestätigung der Toxizität von *E. coli* ExoIII

Um die vermutete Toxizität von *E.coli* ExoIII zu prüfen, wurde die Anzahl der Klone nach der Transformation von *E. coli* BW25113 Δ *xthA* mit pKK223/*xthA* gemessen. In einem Fall wurde die Expression des *xthA*-Gens nicht unterdrückt. Im anderen Fall wurde die Expression des *xthA*-Gens unterdrückt. Falls ExoIII toxisch ist, wurden für den Fall, dass die Genexpression nicht unterdrückt wurde, keine Transformanten erwartet. Für die Ausführung der zweiten Bedingung wurde ein Plasmid pREP4 (2.1.4.4) besorgt, das ein Gen für den *lacI* Repressor hat. *E. coli* BW25113 Δ *xthA* wurde mit pKK223-3/*xthA* und pKK223-3/*xthA*, pREP4 transformiert. Zum Vergleich wurde der Versuch mit pKK223-3/Mma3148 und pKK223-3/Mma3148/A118M/M209Y unter denselben Bedingungen wiederholt. Als Kontrolle wurde der Stamm mit pREP4 und leerem pKK223-3 transformiert (2.2.2.3). Die Ansätze wurden auf Selektivplatten ausplattiert. Die Menge der Transformanten pro ml wurde ausgerechnet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Transformationseffizienz des *E. coli* K12 BW25113 Δ xthA Stammes.

E. coli K12 BW25113 Δ xthA wurde mit den 100ng pKK223-3, pKK223-3/Mth212, pKK223-3/Mma3148, pKK223-3/Mma3148/A118M/M209Y, pKK223-3/XthA und pREP4 Plasmiden transformiert und die Anzahl der Transformanten gezählt. Im Fall der Transformation mit den pKK223-3, pKK223-3/Mma3148 und pKK223-3/Mma3148/A118M/M209Y Plasmiden wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt und die Menge der Transformanten pro ml berechnet.

<i>E. coli</i> K12 BW25113 Δ xthA					
Die Anzahl der Transformanten pro 100ng DNA		pKK223-3	pKK223-3/ Mma3148	pKK223-3/ Mma3148/ A118M/M209Y	pKK223-3/ XthA
	pREP4 (+)		293	266	707
pREP4 (-)		9×10^4	6×10^4	$5,7 \times 10^4$	3

Im Fall der Transformation mit pKK223, pKK223/Mma3148 bzw. pKK223/Mma3148/A118M/M209Y wurde die Anzahl der Transformanten zwischen 6×10^4 und 9×10^4 pro 100ng DNA gemessen. Die Anzahl der Transformanten entspricht der normalen Transformationsausbeute. Das archaeele Protein hat sich für *E. coli* als nicht toxisch erwiesen. Die Doppeltransformation ergab in allen vier Fällen ungefähr die gleiche Anzahl von Transformanten zwischen 300 und 700 pro 100ng DNA. Die Anzahl der Transformanten ist in diesem Fall kleiner, was nicht erstaunlich ist, weil die Transformation mit zwei Plasmiden gleichzeitig durchgeführt wurde und die Möglichkeit der gleichzeitigen Aufnahme zweier Plasmide geringer ist. Die Transformation des Stamms nur mit dem pKK223/XthA ergab lediglich 3 Transformanten pro Ansatz. Die Vermutung über die Toxizität des *E. coli* ExoIII-Proteins wurde unterstützt. Deshalb wurde auf den Kontrollkomplementationstest mit *E. coli* ExoIII verzichtet. Die erzielten Ergebnisse stehen im Konflikt mit anderen Studien, in denen das Protein in großen Mengen ohne gleiches Problem produziert wurde (Kaneda *et al.*, 2006; Miki *et al.*, 1987) Das Problem der Toxizität des *E. coli* ExoIII wird in Kapitel 3.6.3.3 betrachtet.

3.6.3.3 Genaue Untersuchung der Toxizität des *E. coli* ExoIII-Proteins

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, dass *E. coli* ExoIII bei Vorliegen in großen Mengen für *E. coli* toxisch zu sein scheint. Für diesen toxischen Effekt kommen zwei Ursachen in Frage: 1. Starke unspezifische Bindung des Proteins an der DNA verhindert andere Protein-DNA-Wechselwirkungen. 2. Die exonukleolytische Aktivität des ExoIII-Proteins verursacht irreparable Schäden der DNA. Um mehr Licht in dieses Problem zu bringen, wurde eine enzymatisch inaktive ExoIII-Mutante hergestellt und mittels Erstellung einer Wachstumskurve auf Toxizität getestet.

Ein Aminosäurerest, der bei allen bis jetzt charakterisierten ExoIII-Homologen konserviert ist und der sich bei ApeI im aktiven Zentrum befindet, ist Asp210 (Rothwell, 2000). Für die Analyse der biochemischen Funktion von Asp210 in ApeI wurde die D210N Mutante konstruiert (Rothwell, 2000). Durch die einzelne Mutation verliert das ApeI-Protein sämtliche Aktivitäten, aber nicht die Fähigkeit zur Substraterkennung und zur Bildung des Enzym-Substrat Komplexes (Rothwell, 2000). Der entsprechende Rest in *E. coli* ist Asp151. Basierend auf diesem Kenntnis wurde die XthA/D151N-Mutante mittels *Quick Change Mutagenese* konstruiert (2.2.1.10) und enzymologisch charakterisiert. Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.9). Die *E. coli* ExoIII D151N Mutante hat die AP-Endo- sowie die 3' → 5' Exoaktivität verloren (Die Daten sind nicht gezeigt).

Für die Messung der Toxizität wurde der *E. coli* K12 BW25113 Δ xthA-Stamm mit den pKK223-3/XthA, pREP4 und mit den pKK223-3/XthA/D151N, pREP4 Plasmiden transformiert und unter reprimierenden und dereprimierenden Bedingungen hochwachsen gelassen. (pREP4 trägt ein *lacI^q* Gen, das die IPTG-induzierbare Expression des Protein unterdrückt) (2.1.4.4). Zum Vergleich wurden *M. mazei* ExoIII (Mma3148) und sein Derivat (Mma3148/A118M/M209Y) unter denselben Bedingungen getestet. Als Kontrolle wurde der BW25113 Δ xthA-Stamm mit pREP4/pKK22-3 und ohne Plasmid getestet. Das logarithmische Wachstum der BW25113 Δ xthA-Zellkulturen mit pREP4/pKK22-3/Gen und ohne Plasmid ist in Abbildung 47A-F dargestellt.

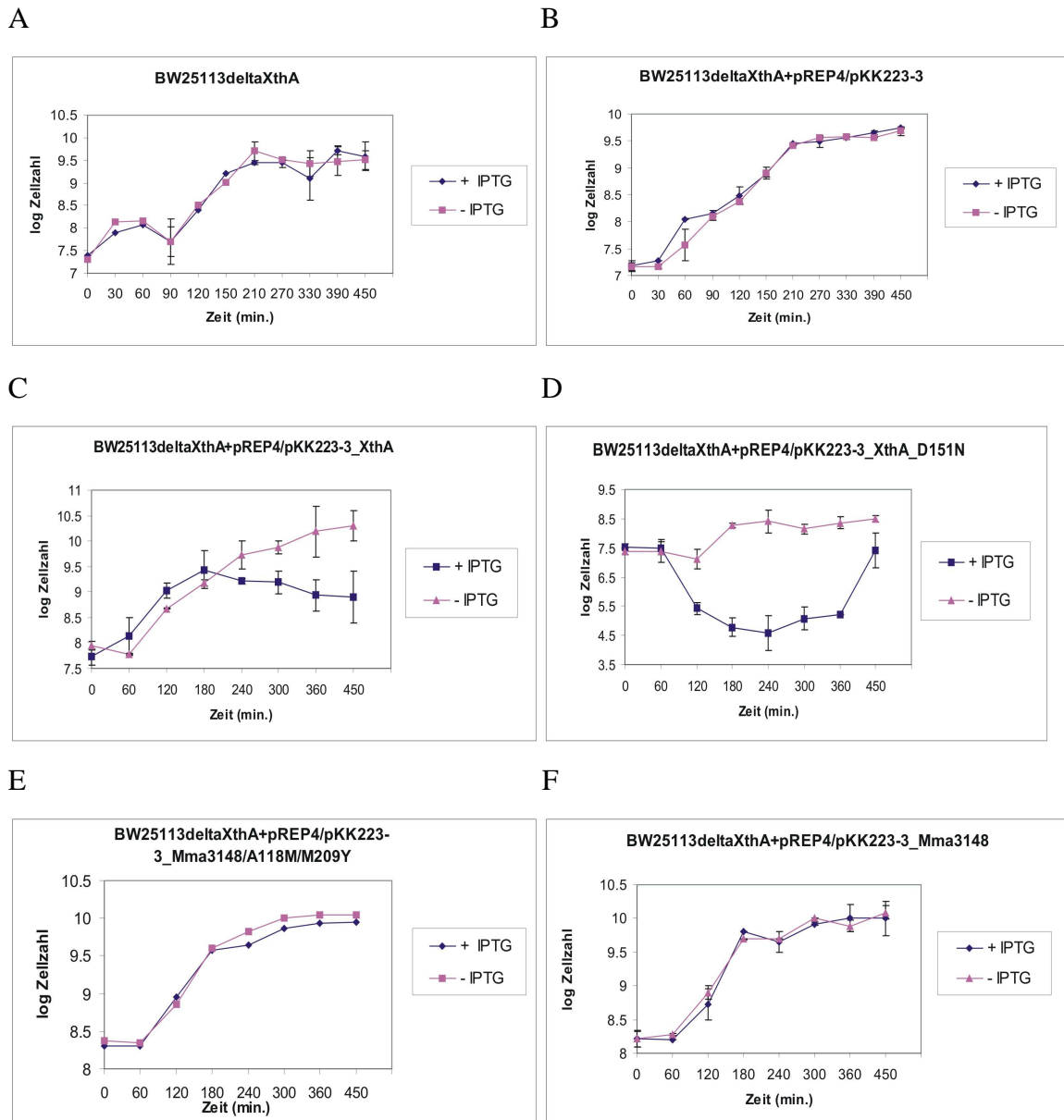


Abbildung 47: Wachstumskurven von *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$.

(A) Die Wachstumskurve von *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$. Die blaue und rote Kurve zeigen das Wachstum von den mit 1mM IPTG induzierten und nicht induzierten Zellen. Die Übernacht-Kultur wurde bis zu einer O.D. 1 verdünnt und 7,5 Stunden bei 37°C geschüttelt. Eine Aliquot wurde jede Stunde genommen, entsprechend verdünnt und auf Amp/Kan Platten ausplattiert. Nach 1,5 Stunden wurde eine Probe mit 1mM IPTG induziert. (B) Die Wachstumskurve von mit pKK223-3 und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$. (C) Die Wachstumskurve von mit pKK223-3_XthA und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$. (D) Die Wachstumskurve von mit pKK223-3_XthA_D151N und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$. (E) Die Wachstumskurve von mit pKK223-3_Mma3148_A118M_M209Y und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$. (F) Die Wachstumskurve von mit pKK223-3_Mma3148 und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 $\Delta xthA$. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt. Die Wachstumskurve von mit

pKK223-3_Mma3148_A118M_M209Y und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 Δ xthA (E) wurde einmal gemacht.

Unter den verwendeten Bedingungen hat sich die Zellzahl in allen getesteten Fällen innerhalb einer Stunde bis zum Beginn der stationären Phase verdoppelt. Die BW25113 Δ xthA-Zellkultur und die BW25113 Δ xthA-Zellkultur mit pREP4/pKK223-3 haben das erwartete logarithmische Wachstum gezeigt (Abbildung 47A-B). Die nicht induzierte BW25113 Δ xthA-Zellkultur mit pREP4/pKK223-3_XthA hat ebenso das erwartete logarithmische Wachstum aufgewiesen (Abbildung 47C). Die induzierte BW25113 Δ xth_pREP4/pKK223-3_XthA-Zellkultur hat nach 3h Inkubation eine deutliche Abnahme der Zellzahl gezeigt, was mit der Vermutung über die Toxizität des *E. coli* ExoIII-Proteins übereinstimmt. Das zum Vergleich getestete *M. mazei* ExoIII (Mma3148) und sein Derivat (Mma3148/A118M/M209Y) waren unter denselben Bedingungen nicht toxisch (Abbildung 47 E-F).

Überraschenderweise hat die Mutante pKK223-3/XthA/D151N eine noch stärkere Toxizität gezeigt (Abbildung 47 D). Sofort nach der Induktion wurde eine ausgeprägte Abnahme der Zellzahl beobachtet. Jedoch hat die Zellzahl nach 6h Inkubation wieder zugenommen.

Das Wachstum der Zellkultur könnte in diesem Fall durch Supressormutationen erklärt werden. Jedoch widersprechen die erzielten Ergebnisse der Hypothese, dass das inaktive Protein nicht toxisch wirken kann. Damit ist die Vermutung, dass die Ursache der Toxizität in der starken unspezifischen Bindung des Proteins an der DNA liegt, wahrscheinlicher. Um das zu bestätigen und die zweite vermutete Ursache des toxischen Effekts endgültig auszuschließen, wurden weitere Mutanten hergestellt.

Die Mutante XthA/W212A, die in dieser Arbeit konstruiert wurde, wurde bereits von Kaneda K. und seinem Team untersucht (Kaneda *et al.*, 2006b). Tryptophan 212 in *E. coli* ExoIII wurde als ein Aminosäurerest in der Nähe vom aktiven Zentrum beschrieben, der eine entscheidende Rolle für die Erkennung der AP-Stelle spielt. Die XthA/W212A Mutante ist nicht mehr in der Lage, einen Enzym-Substrat Komplex zu bilden. Zum Vergleich wurde die XthA/D151N/W212A Mutante hergestellt. Beide Mutanten wurden mittels *Quick Change Mutagenesis* konstruiert (2.2.1.10). Zehn XthA/D151N/W212A Klone wurden per Sequenzierung analysiert (2.2.1.18). Alle zehn Klone enthielten die eingefügten Mutationen und einer hatte eine spontane Mutation. Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.11). Bei der Herstellung der XthA/W212A Mutante traten schon bekannte Schwierigkeiten auf. Es wurden insgesamt 86 Klone analysiert. Die Analyse der Sequenzen ist in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenstellung der spontanen Mutationen bei der Konstruktion der pKK223-3/XthA/W212A Mutanten.

Blau sind die Reste markiert, die sich entscheidend an der Bildung der tertiären Struktur des Proteins beteiligen. Grün sind die an der enzymatischen Aktivität beteiligten Reste markiert. Rot sind die Reste markiert, die an der Orientierung und/oder Stabilisierung der katalytischen Reste beteiligt sind. AM: Abkürzung von Aminosäurerest.

insgesamt	Primer- insertion	<i>Frame shift</i>	Missens mutation	Missens+ <i>Frame shift</i>	Primer+ Missens mutation	Primer+ <i>Frame shift</i>	Ohne W212A Austausch
86	29	8	37	3	6	2	1

AM Austausch	Missens mutation	Nonsens mutation	Val37 →Phe ggt→ttt	Gly57 →Trp ggg→tgg	Glu101 →Cys ggg→tgt	Pro111 →Gln ccg→cag	Gln113 →Asp ggg→gat
Menge der Austausche	37	5	1	2	1	1	2

Gly162 →Cys ggc→tgc	Arg184 →His cgc→cac	Glu194 →Trp ggg→tgg	Glu194 →Val ggg→gtg	Arg200 →His cgc→cac	Phe213 →Leu ttt→ctt	Arg227 →His cgc→cac	Leu231 →Pro ctg→ccg
1	1	2	1	2	1	4	2

Ala233 →Asp gcc→gac	Ser234 →Ile agc→atc	Ser257 →Tyr tcc→tac	His259 →Gln cac→caa	Pro261 →Thr ccc→acc	Pro261 →His ccc→cac	Val262 →Phe gtc→ttc	Ala264 →Glu gcg→gag
1	1	1	1	3	2	1	1

In den 29 Sequenzen wurde eine Primerinsertion (ca.35nt) entdeckt. 8 Sequenzen hatten einen *frame shift* und 37 enthielten eine Punktmutation, 3 Sequenzen hatten eine Punktmutation und einen *frame shift*, 6 analysierte Sequenzen enthielten eine Primerinsertion und eine Punktmutation, 2 hatten eine Primerinsertion und einen *frame shift*. Eine Sequenz hatte keinen gewünschten W212A Austausch und keine spontanen Mutationen. Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.10). Die 37 Sequenzen nur mit Punktmutationen wurden genauer untersucht. In 5 Sequenzen wurde Glutamin an den verschiedenen Positionen zum Stopcodon mutiert (Glu95, Glu133, Glu66, Glu183, Glu239). In 32 Sequenzen wurde an verschiedenen Positionen durch einen Nukleotidaustausch der Aminosäurerest verändert. Der Hypothese nach wurden

Aminosäurereste ausgetauscht, die die Aktivität des Proteins beeinflussen können. In der Arbeit von Gorman A. M. *et al.* wurden interessante Eigenschaften von manchen Aminosäurenresten von *E. coli* ExoIII beschrieben (Gorman *et al.*, 1997). Die Reste Pro111, Asp160, Arg184, Glu194, Arg200, Arg227, Pro261 beteiligen sich an der Bildung der tertiären Struktur des Proteins (in der Tabelle sind blau markiert). Der Rest Ser257 beteiligt sich an der Orientierung und/oder Stabilisierung der katalytischen Reste (rot markiert). Der Rest His259 beteiligt sich an der enzymatischen Aktivität (grün markiert). Aus den erzielten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Aminosäurereste, die sich an der Ausbildung der tertiären Struktur des Proteins beteiligen, am häufigsten ausgetauscht wurden.

Der Stamm BW25113 Δ *xthA* wurde mit den pKK223-3/*XthA*_W212A, pREP4 Plasmiden transformiert und die Wachstumskurve wie oben beschrieben ermittelt (Abbildung 48).

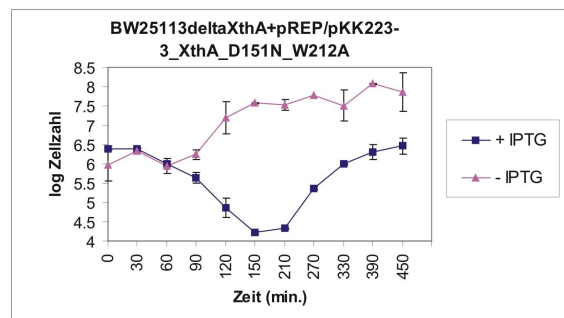


Abbildung 48: Wachstumskurve von *E. coli* K12 BW25113 Δ *xthA*/pKK223-3_*XthA*_D151N_W212A.

Die Wachstumskurve von mit pKK223-3_*XthA*_D151N_W212A und pREP4 transformiertem *E. coli* K12 BW25113 Δ *xthA*. Die blaue und rote Kurve zeigen das Wachstum von den mit 1mM IPTG induzierten und nicht induzierten Zellen. Für die weitere Erklärung siehe Abbildung 47.

Die Doppelmutante *xthA*/D151N/W212A hat sich als toxisch erwiesen. Sofort nach der Induktion wurde eine starke Abnahme der Zellzahl beobachtet, aber nach 1,5h wurde eine Zunahme der Zellzahl festgestellt. Wahrscheinlich liegt die Ursache der Toxizität in der starken unspezifischen Bindung des Proteins an der DNA.

3.7 Untersuchungen zur Aufklärung der U-Erkennung von Mth212

Mth212 ist das bis jetzt einzige ExoIII-Homolog, das 3'→5' Exo-, AP-Endo und U-Endoaktivität kombiniert. Das Vorhandensein der U-Endoaktivität unterscheidet Mth212 von allen anderen bekannten ExoIII-Homologen. Um die strukturellen Besonderheiten zu identifizieren, die Mth212 die U-Endoaktivität verleihen, wurde Mth212 auf der Ebene der Aminosäuresequenz mit ApeI und Mma3148 verglichen (J. Georg unpubliziert; Seite 69). (Die beiden Proteine weisen trotz ihrer signifikanten Sequenzähnlichkeit (Seite 69) zu Mth212 keine U/G-Aktivität auf, obwohl Mma3148 Uracil gegen Thymin und Cytosin diskriminiert). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der drei Proteine wurde vermutet, dass sie ähnliche Strukturen haben. Die 3D-Struktur von ApeI wurde von Mol *et al.* aufgeklärt (Mol, C.D., *et al.*, 2000). Die 3D-Strukturen von Mth212 und Mma3148 waren vor Beginn des Projekts nicht bekannt. Nach Betrachtung der 3D-Struktur von ApeI wurden die an der Katalyse beteiligten, mit der DNA interagierende oder in die DNA intergrierte Aminosäurereste auf dem Alignment von ApeI mit Mth212, Mma3148 markiert (Abbildung 24, Seite 70) und wichtige Unterschiede wurden festgestellt: Arginin 177 in ApeI entspricht Methionin 117 in Mth212 und Alanin 118 in Mma3148 und Tyr 269 in ApeI entspricht Tyr 208 in Mth212 (Abbildung 24) und Met209 in Mma3148 (die detaillierte Erklärung siehe Seite 69). Davon ausgehend wurden von J. Georg zwei Aminosäuren für Mutationsstudien mit Mma3148 vorgeschlagen, die für die U/G-Aktivität verantwortlich sein könnten, Alanin118 durch Methionin und Methionin 209 durch Tyrosin.

Die zwei vorgeschlagenen Mutationen führen zu einer schwachen, biochemisch nachweisbaren U/G-Aktivität. Da Mma3148 eine U-Endonuklease mit guter Diskriminierung gegen Thymin und Cytosin ist, wurde vermutet, dass zwei Mutationen zur generellen Steigerung aller Aktivitäten des Proteins geführt haben. Die Frage der U-Erkennung und der Unterschied zwischen einem ExoIII-Homolog mit bzw. ohne U-Endonukleaseaktivität an U/G-Fehlpaarung wurde damit nicht aufgeklärt. Um Hinweise auf die molekulare Basis für die zusätzliche endonukleolytische Aktivität gegenüber U/G-Fehlpaarung zu kommen, wurde von Kristina Lakomek (Abteilung Molekulare Strukturbiologie) die Kristallstruktur von Mth212 (Wild Typ) und der inaktiven Mutante Mth212/D151N (Georg, J. *et al.*, 2006) als Apof orm und in Komplex mit uracilhaltigen Substraten bestimmt. Fast alle Mth212/DNA-Komplexe repräsentieren die exonukleolytische Aktivität des Enzyms, in denen ein 3'-Terminus des Substrates am aktiven Zentrum von Mth212 gebunden wurde (Lakomek K., 2009, unpubliziert). Unter

den verwendeten Bedingungen war es nicht möglich, die Struktur des „U-Endo-Komplexes“ zu bekommen, in dem Mth212 dU im aktiven Zentrum bindet (Lakomek K., 2009, unpubliziert).

Es ist jedoch die Struktur von ApeI im Komplex mit einer DNA-Doppelhelix, die eine AP-Stelle enthält, bekannt, in dem das Protein an der zentralen DNA-Region, an der 5'-Seite der AP-Stelle gebunden ist (Mol, C.D *et al.*, 2000; Lakomek K., 2009, unpubliziert). Die Strukturen der Mth212/DNA-Komplexe wurden mit der bekannten ApeI/DNA-Struktur verglichen. In allen Mth212/DNA Exo-Komplexen ist die Oberfläche des Enzyms, welche die DNA bindet, gleich und entspricht der Region von ApeI, die Kontakte zur DNA an der 5'-Seite der AP-Stelle im AP/DNA-Komplex ausbildet. Diese Region von ApeI trägt zum Absuchen der DNA bei, um DNA-Schäden zu erkennen und die DNA zu binden (Mol, C.D., *et al.*, 2000). Obwohl die Gesamtstruktur und die Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum in Mth212 derjenigen von ApeI ähnelt, wurden Unterschiede an der Oberfläche, die die DNA kontaktiert, insbesondere in den drei DNA-bindenden Loop-Regionen, beobachtet, nämlich die Aminosäurereste Asn114-Arg121 (Loop I), Arg163-Gly172 (Loop II), Trp205-Trp219 (Loop III) betreffend (Lakomek K, 2009, unpubliziert) (Abbildung 49). Die deutlichen Unterschiede betreffen zwei DNA kontaktierende Reste, nämlich Met270 und Arg177 von ApeI, die in die große und kleine Furche inserieren. Diese Reste stabilisieren den DNA-Protein Komplex (Mol *et al.*, 2000; Lakomek K, 2009D). Keine von ihnen ist für die Aktivität des Proteins essentiell (Mol *et al.*, 2000). Jedoch sind beide wichtige Elemente für Erkennung, Stabilisierung der extra-helikalen Konformation der AP-Stelle und Fixierung des Enzyms auf der DNA durch direkten Kontakt zu dem ersten Phosphatrest 3' von der AP-Stelle. (Mol *et al.*, 2000; Lakomek K., 2009, unpubliziert). Die Reste Met270 und Arg177 entsprechen Arg209 (Loop III) und Met117 (Loop I) bei Mth212 (Abbildung24) (Lakomek K, 2009, unpubliziert). Sie fixieren wahrscheinlich das DNA-Rückgrat für die Doppel-Loop-Insertion (Lakomek K., 2009, unpubliziert). Das führt vermutlich zum extremen Knick der gebundenen DNA, der in den Mth212/DNA-Komplexen sichtbar und eine Voraussetzung für die AP-Endonukleaseaktivität von ApeI ist (Mol *et al.*, 2000). Die Seitenkette von Met117 interagiert mit der Phosphatgruppe neben der anschließend gespaltenen Phosphodiesterbindung und ist vielleicht geeignet zur Erkennung der Konformationsänderung des DNA-Rückgrates, die häufig in AP- und U-haltigen DNA entstehen (Lakomek K., 2009, unpubliziert). Jedoch hat der Austausch von Methionin 117 gegen Alanin keine Veränderungen in der Aktivität von Mth212 gebracht (J. Georg, dieses Labor, unpubliziert).

Arg209 (so genannte „Arginin-Finger“) inseriert in den Mth212/DNA Exo-Komplexen in die DNA-Duplex zwischen den Basen und interagiert mit der Base des 3'-terminalen Nukleotids, dessen Phosphat-Rest das Ziel der Spaltung ist (Abbildung: 50) (Lakomek K., 2009, unpubliziert). In vorgeschlagenem Modell der Uracil-Erkennung kann die Insertion des Arg209-haltigen Loops dU-Rest in der extra-helikalen Konformation stabilisieren (Lakomek K., 2009, unpubliziert). Die hydrophobe Tasche in der Nähe der katalytischen Reste ist zwischen ApeI und Mth212 außer dem Ersatz von Phe266 durch Trp205 bei Mth212 identisch. Trp205 befindet sich direkt neben dem dritten DNA-Loop. Die große Tryptophan-Seitenkette kann vermutlich starke Interaktionen mit vermeintlichem Substrat ausbilden und könnte somit zusätzlich die Fähigkeit von Mth212 unterstützen, dU herauszuschneiden (Lakomek K., 2009, unpubliziert). Jedoch ist dieser Rest in manchen archaeellen Homologen und in *E. coli* ExoIII ebenso konserviert (Abbildung 24). Das andere archaeelle ExoIII-Homolog MMP1012 aus *M. maripoludis*, das auf U-Endoaktivität geprüft wurde (MMP1012: Schomacher, L., 2007, diese Arbeit, Seite 120), hat kein erweitertes Substratspektrum aufgewiesen. *E. coli* ExoIII wurde auf U-Aktivität mit negativem Ausgang getestet (Georg, J., 2005; diese Arbeit, Seite 120).

Basierend auf den erworbenen Kenntnissen wurde folgendes Modell für die Erkennung des dU-Rests vorgestellt (Lakomek, persönliche Kommunikation): dsDNA wird für AP-Stellen oder dU gescannt. Watson-Crick-Basenpaare sind stabil genug, um während der leichten Krümmung der DNA durch Mth212 intakt zu bleiben. Die Basenpaare, die eine AP-Stelle oder Uracil enthalten, sind weniger stabil, so dass die Seitenkette von Arg209 leicht in die DNA-Helix inserieren kann. Die Arginin-Seitenkette kann entweder beide Basen aus dem Basenstapel verdrängen oder nur das Ziel-Nukleotid. Wie eine AP-Stelle wird dU vermutlich in die hydrophobe Bindungstasche herausgedreht.

Beim Vergleich der Sequenzen von ExoIII-Homologen (Abbildung 24) wurde festgestellt, dass der auffällige Sequenzkontext Trp-Trp-Ser-Tyr-Arg 205-209 (LoopIII) bei der ExoIII-Homologen aus *M. thermotrophicus* (Mth212), *M. mazei* (Mma3148) und *B. subtilis* (ExoA) konserviert ist (K. Lakomek, 2009, unpubliziert). Mth212 ist eine U-Endonuklease (Georg J., *et al*, 2006), Mma3148 ist ebenso eine U-Endonuklease mit guter Diskriminierung gegen Thymin und Cytosin. ExoA wurde auf U-Aktivität mit negativem Ausgang getestet (N. Krietenstein, H. Tseden, dieses Labor, unpubliziert). Deshalb wurde vermutet, dass das Motiv allein für das erweiterte Substratspektrum nicht ausreichend ist.

Insertion von Trp205-Arg209 von LoopIII in die DNA-helix ist in Abbildung 51 dargestellt. Die von K. Lakomek diskutierte Aminosäurereste Trp205 und Arg209 ebenso wie die dazwischen liegenden Aminosäurereste Trp206, Ser207 und Tyr208 wurden einzeln durch Alanin ausgetauscht und biochemisch charakterisiert.

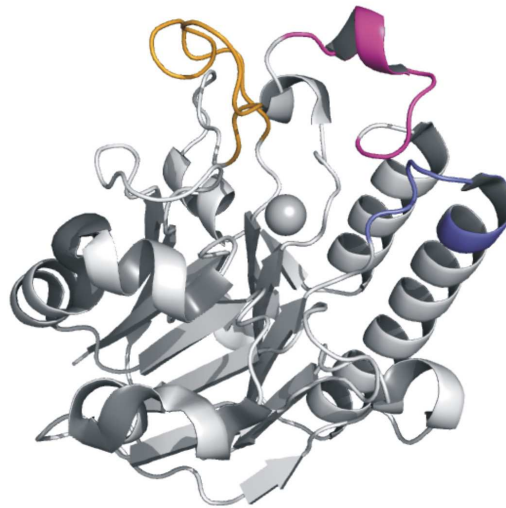


Abbildung 49: Apo-Struktur von Mth212.

Die drei DNA-bindenden loops sind violett (loopI: Asn114-Arg121), rot (loopII: Arg163-Gly172) und gelb (loopIII: Trp205-Trp219) markiert. Das Magnesiumion im aktiven Zentrum ist als *sphere* in grau gezeigt (PDB-ID 3G91, K. Lakomek, 2009, unpubliziert).

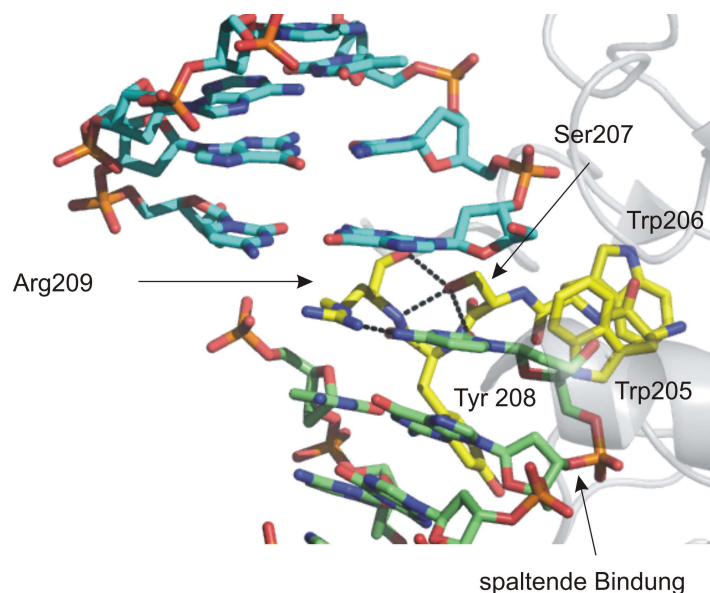


Abbildung 50: Insertion von Trp205-Arg209 von LoopIII in die DNA-helix.

Die Reste Trp205-Arg209 sind als gelbe *sticks* dargestellt. Die Seitenketten der Reste sind gelb, rot und blau für Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff Atome gefärbt. Die beiden DNA Helices sind als blaue und grüne Linien gezeigt. Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff Atome sind hellblau bzw. grün, rot, blau gefärbt. Die zu spaltende Bindung ist mit einem Pfeil markiert. Vermutete Wasserstoff-Bindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. (PDB-ID 3GA6; Lakomek, K *et al*, 2009 unpubliziert).

3.7.1 Herstellung, Produktion und Reinigung von Mth212/W205A, Mth212/W206A, Mth212/S207A, Mth212/Y208A und Mth212/R209A

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die oben genannten fünf Mth212-Mutanten hergestellt. Im in den pET_B_001 Vektor zwischen *XhoI*- und *NcoI*- Schnittstelle integrierten Mth212-Gen wurde mittels *Quick change Mutagenesis* (2.2.1.10) die vorgeschlagenen fünf Aminosäurereste (Trp-Trp-Ser-Tyr-Arg 205-209) einzeln durch Alanin ausgetauscht. Das Vorhandensein der gewünschten Mutation im Gen wurde per Sequenzierung bestätigt (2.2.1.18). Die Sequenzen befinden sich im Anhang (5.2.7). Die Proteine wurden heterolog in BL-21_UX produziert (2.2.3.5), mittels IMAC (2.2.3.1) und Heparinaffinitätschromatographie gereinigt (2.2.3.3). Die gereinigten Proteine wurden per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 52). Das theoretische Molekulargewicht von Mth212 beträgt 31,380 kDa.

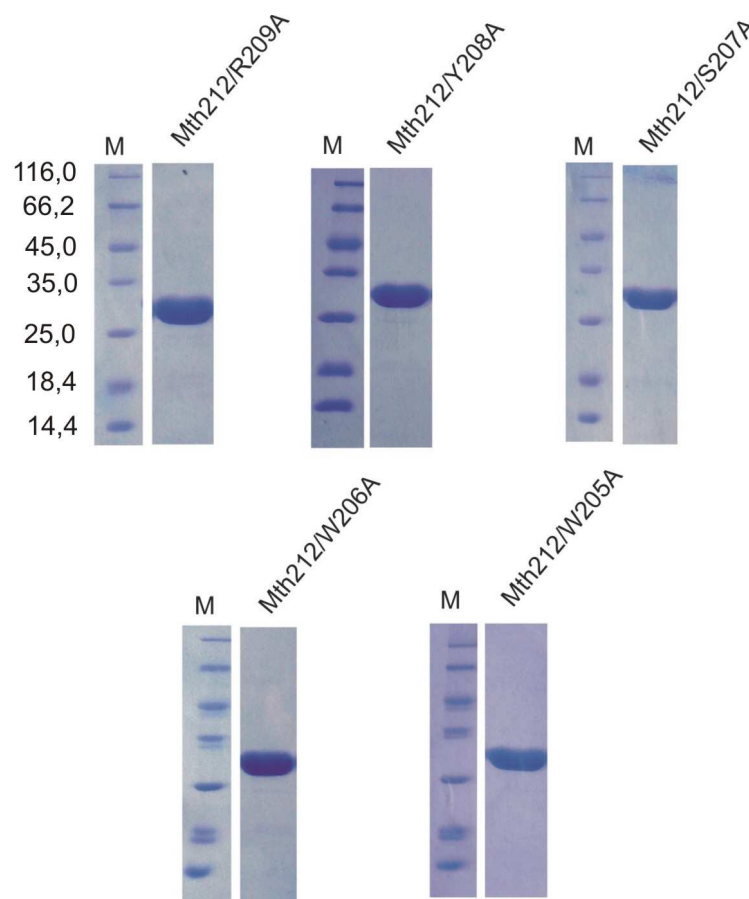
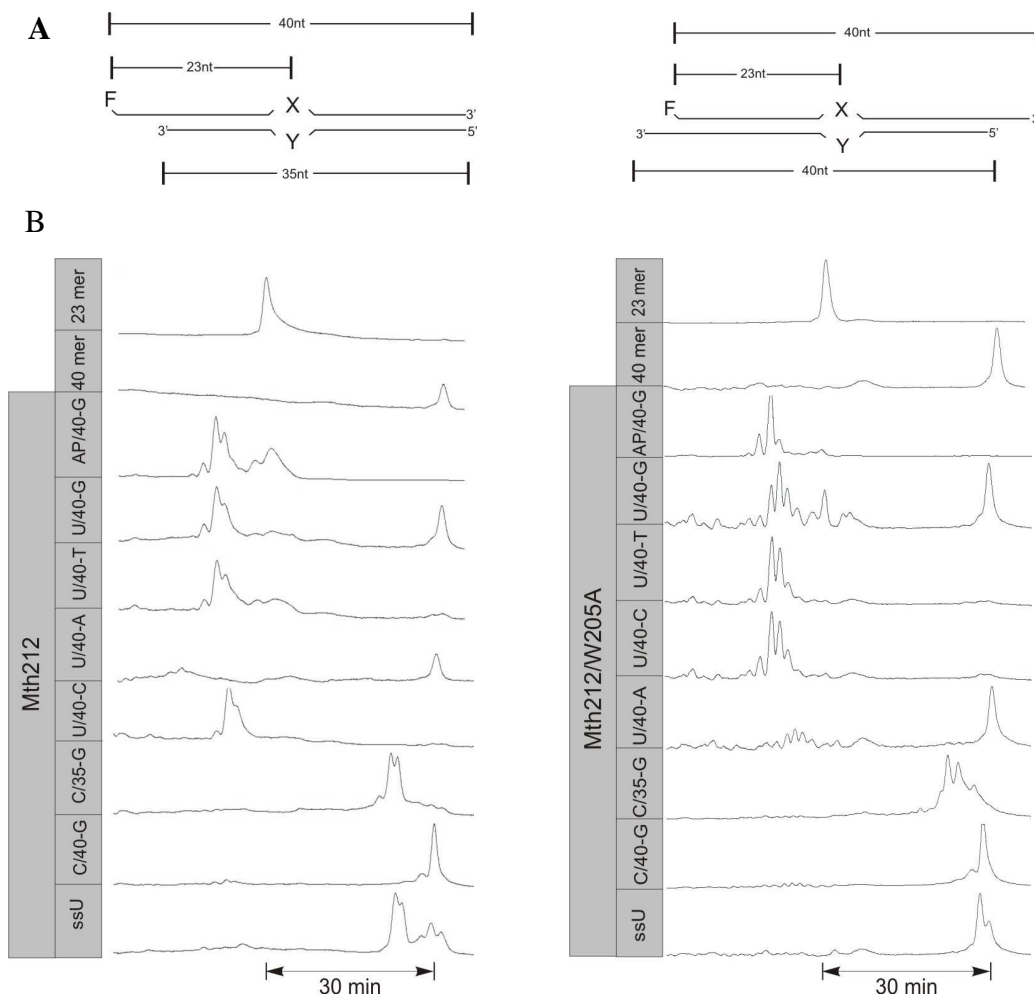


Abbildung 51: SDS-PAGE der gereinigten Mth212-Mutanten.

Erste Spur (M): *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, 2.1.6.2). Zweite Spur: Die gereinigte Mth212-Mutante. Das theoretische Molekulargewicht von Mth212 beträgt 31,380 kDa.

3.7.2 Enzymologische Charakterisierung von Mth212/W205A, Mth212/W206A, Mth212/S207A, Mth212/Y208A und Mth212/R209A

Die U-Aktivität der Mth212-Mutanten (siehe Überschrift) wurde an den Substraten U/40-G, U/40-T, U/40-C und U/40-A getestet. Die AP-Endonukleaseaktivität wurde an dem AP/40-G-Substrat geprüft. Da der Überhang aus 5 Nukleotiden am 3'-Ende bei X/40-Y-Substraten (X: U, AP, C; Y: G, T, C, A) als ein wirkungsvoller Schutz gegen 3'→5' Exonuklyolytische Aktivität charakterisiert wurde (Seite 55), wurde die 3'→5' Exonukleaseaktivität an einem C/35-G Substrat mit *blunt ends* untersucht. Die Aktivitätsassays wurden bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:1 durchgeführt. Die Ergebnisse der Aktivitätstests sind in Abbildung 52 dargestellt.



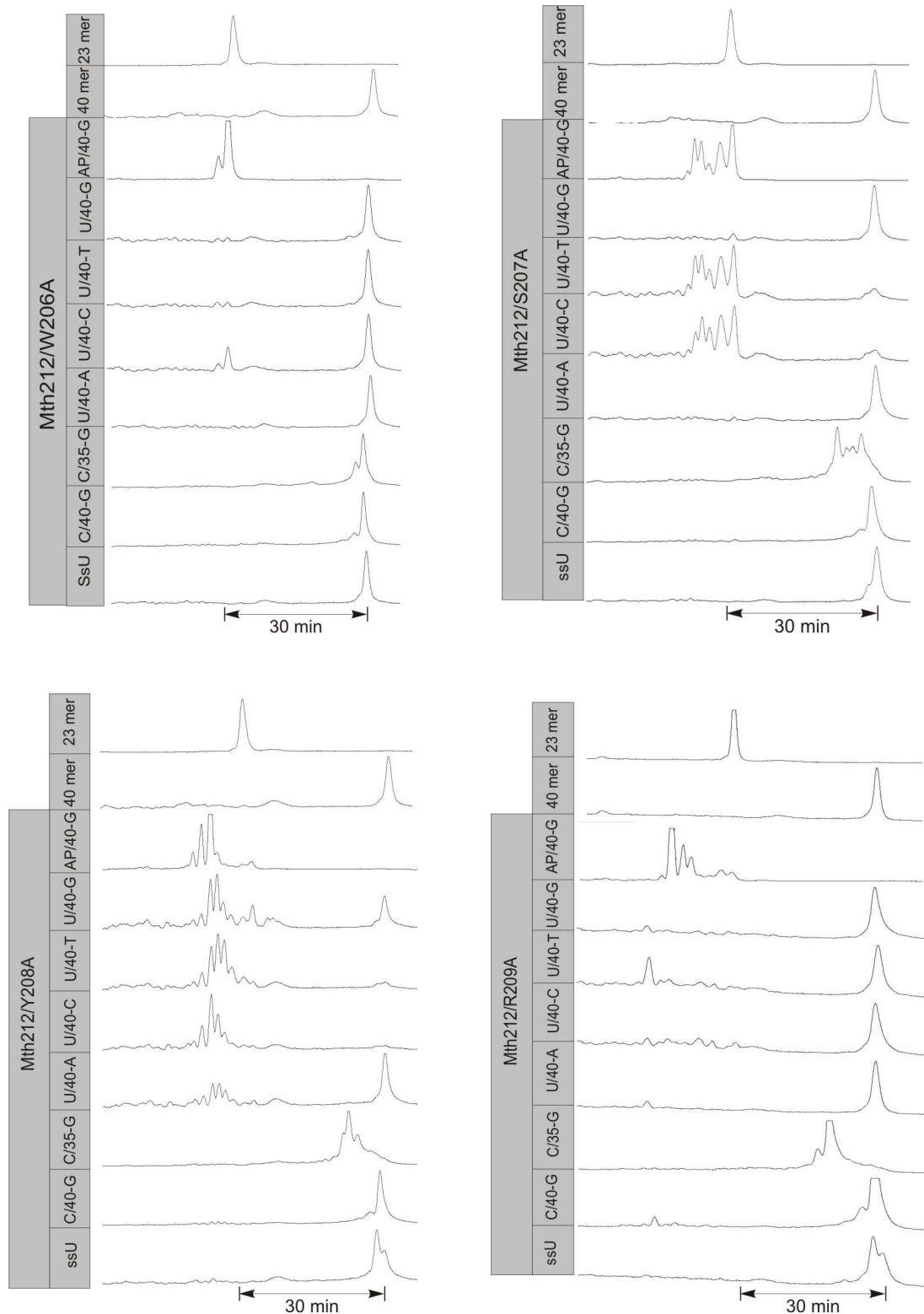


Abbildung 52: Aktivität der Mth212-Mutanten.

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B) Die Reaktionsprodukte nach Inkubation mit Mth212-Mutanten. Für die Assays wurden 0,24 pmol Enzym mit 0,24 pmol der angegebenen Substrate in 50 μ l 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$ für 15 min bei 65°C inkubiert. Vor der Zugabe des Enzyms wurden die Ansätze 10 min bei 65°C vorinkubiert.

Bei der Mma3148-Einzelmutante Mma3148/A118M wurde eine generelle Steigerung aller Aktivitäten des Enzyms beobachtet (Abbildung 30). Die Mma3148-Doppelmutante Mma3148/A118M/M209Y hat im Vergleich zur Einzelmutante eine weitere leichte Erhöhung aller Aktivitäten gezeigt (Abbildung 33). Deshalb wurde erwartet, dass der Austausch der Aminosäurereste an diesen Positionen in Mth212 zu einer leichten generellen Verringerung aller Aktivitäten des Enzyms führen kann. Jedoch haben weder der Austausch von Met117 (Georg, J., unpubliziert) noch derjenige von Tyr208 durch Alanin eine Veränderung in der Aktivität von Mth212 gebracht.

Tryptophan 205 ist der Vermutung nach in der Lage, starke Interaktionen mit dem Substrat auszubilden, die die Fähigkeit von Mth212 an einem dU-Rest zu schneiden, unterstützen (Lakomek K., 2009, unpubliziert) und in Mutationsstudien mit humanem ApeI und *E. coli* ExoIII wurde berichtet, dass die Tryptophanreste Trp212 in ExoIII, Trp280 und Trp267 in ApeI in der Nähe vom aktiven Zentrum die entscheidende Rolle an der Erkennung des Substrates spielen (Kaneda, K., et al., 2006). Der Rest Trp212 in ExoIII entspricht Trp205 in Mth212 (Abbildung 24). Jedoch hat der Austausch von Tryptophan 205 durch Alanin ebenfalls keine Veränderung in der Aktivität von Mth212 gebracht. Die oben erwähnte Vermutung wurde damit widergelegt. Außerdem ist dieser Rest in den *E. coli* und *B. subtilis* Homologen konserviert, die kein erweitertes Substratspektrum aufweisen.

Die W206A und S207A Mutante haben schwer zuinterpretierenden Ergebnisse geliefert.

Trp206 von Mth212 ist nicht an der Substratbindungstasche beteiligt (persönliche Kommunikation mit Lakomek, K.). Deshalb soll der Vermutung nach der Austausch von Tryptophan 206 durch Alanin die Aktivität des Proteins nicht ändern. Im Aktivitätstest wurden jedoch Veränderungen aller Aktivitäten außer der AP-endonukleolytischen Aktivität beobachtet. Die Mutante Mth212/W206A hat U/G-, U/T-, U/A-Endonuklease- und 3'→5'Exoaktivität vollständig verloren und zeigt sehr schwache U-Aktivität gegenüber U/C. Unter verwendeten Bedingungen ist es nicht gelungen eine Struktur, in der Mth212 dU im aktiven Zentrum bindet, zu bekommen. Deshalb könnte vermutet werden, dass bisher unbekannte Interaktion von Trp206 mit Uracil gibt, die zur Erkennung des dU-Restes beiträgt. Jedoch liegt Trp206 weit von der Substratbindungstasche entfernt und es ist sehr unwahrscheinlich, dass Konformationsänderungen erfolgen, durch die Trp206 in die Nähe des dU-Restes gelangt (persönliche Kommunikation mit Lakomek, K.).

Die Mth212/S207A Mutante hat die U/T-, U/C-, U/A-Aktivitäten und 3'→5'Exoaktivität des Wildtyps behalten während die U/G-Aktivität fast vollständig ausgeschaltet wurde. Die 3'→5'exonukleolytische Aktivität wurde nach dem Endoschnitt verlangsamt. Serin 207

bietet eine Hydroxylgruppe für potentielle Wasserstoffbrücken-Bildung an (Lakomek, K., 2009). Wahrscheinlich begünstigt die derartige Interaktion die Loopstabilität.

Die Eliminierung der U/G-Aktivität und sehr schwache U/T und U/C wurde bei der Mth212/R209A Mutante nachgewiesen, während die 3'→5'Exoaktivität erhalten bleibt. Das gezielte Ausschalten der U-Aktivität bestätigt die Vermutung, dass dieser Rest eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Stabilisierung eines 2'-Desoxyuridinrests in der extra-helikalen Konformation spielt.

3.8 Zur Evolution der DNA-U-Reparatur bei den Archaeen.

Die Reparatur von Uracil kann durch den am höchsten konservierten generellen Basen-Exzisions-Reparaturmechanismus erfolgen, der durch die Aktivität der Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) eingeleitet wird (Kapitel 1.2.1). Die erste Uracil-DNA-Glykosylase (Uracil-N-Glykosylase: Ung) wurde 1974 in *E. coli* entdeckt (Lingahl, 1974). Seit dieser Entdeckung wurden mehrere Enzyme in verschiedenen Organismen mit der gleichen Funktion gefunden, die aufgrund der Sequenzinformation sowie genetischen und biochemischen Studien in 5 Familien zugeordnet worden sind (Kapitel 1.2.1). Mitglieder der Familien 1-3 wurden nur in den Genomen von bisher sequenzierten Eukaryoten und Bakterien entdeckt, aber nicht in Archaeen. Bei den untersuchten Archaeen wurden die Vertreter der Familien 4 und 5 detektiert. Die erstentdeckten Enzyme, die den Familien 1-5 zugeordnet wurden, andere später beschriebene weitere Vertreter der Familien 1-3 und alle bisher charakterisierten Mitglieder der Familien 4-5 sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Zusammenstellung der erstbeschriebenen und manchen später entdeckten weiteren Vertreter der UDG Familien 1-5.

¹ - Lindahl, 1974, ² - Neddermann and Jiricny, 1993, ^{3, 4} - Haushalter *et al.*, 1999, ⁵ - Sandigursky and Franklin, 1999, ⁶ - Gallinati and Jiricny, 1996, ⁷ - Olsen *et al.*, 1989, ⁸ - Starkuviene and Fritz, 2002, ⁹ - Sandigursky and Franklin, 2000, ¹⁰ - Sartori *et al.*, 2001, ¹¹ - Diese Arbeit, ¹² - Pettersen *et al.*, 2007, ¹³ - Moe *et al.*, 2006, ¹⁴ - Nilsen *et al.*, 2001; ¹⁵ - Cone *et al.*, 1977, ¹⁶ - Hardeland *et al.*, 2003, ¹⁷ - Mi *et al.*, 2009, ¹⁸ - Masaoka *et al.*, 2003, * - fast ausschließlich nur bei Eukaryoten zu finden, bei Bakterien sind nur wenige Vertreter, ** - lediglich über Sequenzverwandtschaft definiert.

UDG-Familie Nummer	Prototyp	Weitere Vertreter		
		Eukaryoten	Bakterien	Archaeen
1	UNG (<i>E. coli</i>) ¹	UNG ⁷ , UNG2 ¹⁴ (<i>H. sapiens</i>),	UNG (<i>B. subtilis</i>) ¹⁵	————
2	TDG (<i>H. sapiens</i>) ²	Thd1p (<i>D. melanogaster</i>) ¹⁶ Thp1p (<i>S. pombe</i>) ¹⁶	drMUG (<i>D. radiodurans</i>) ¹³ MUG (<i>E. coli</i>) ⁶	————
3	SMUG (<i>X. leavis</i>) ³ hSMUG1 (<i>H. sapiens</i>) ⁴	rSMUG1* (<i>R. norvegicus</i>) ¹⁸	GmeSMUG1** (<i>G. metallireducens</i>) ^{12, 17}	————
4	TMUDG (<i>T. maritima</i>) ⁵	————	TTUDGA ⁸ (<i>T. thermophilus</i>)	Pa-UDGA ¹⁰ (<i>P. aerophilum</i>) AFUDG ⁹ (<i>A. fulgidus</i>) MM0486 ¹¹ (<i>M. mazei</i>)
5	TTUDGB ⁸ (<i>T. thermophilus</i>)	————	Bisher nur in <i>T. thermophilus</i> detektiert	Pa-UDGB ¹⁰ (<i>P. aerophilum</i>)

Das Vorhandensein der Vertreter der Familie 4 und 5 in Archaeen, die die Funktion der Mitglieder der Familie 1-3 übernehmen, kann die Erklärung für die Abwesenheit der Vertreter der Familie 1-3 in diesen Organismen sein. Jedoch gibt es auch solche Archaeen, bei deren keine Mitglieder der Familie 1-5 gefunden wurden, wie z.B. *Methanothermobacter thermautotrophicus*. In diesem Archaeon wurde ein ExoIII-Homolog (Mth212) entdeckt, das eine U-endonukleolytische Aktivität besitzt und die U-Reparatur initiieren kann (Schomacher *et al.*, 2009a). Bei anderen Archaeen wurden weder Mitglieder der Familie 1-5 noch U/G-Aktivität bei dem jeweiligen ExoIII-Homolog entdeckt, wie z.B. bei *Methanococcus maripaludis* (Schomacher, 2007). Im Genom des

thermophilen Archaeons *Methanocaldococcus jannaschii* wurden ebenfalls keine Homologe zu einer der genannten Uracil-DNA-Glykosylasen und kein ExoIII-Homolog detektiert (Schomacher *et al.*, 2009b). In diesem Organismus wurde ein Enzym entdeckt, das als erster Vertreter der neuen Familie Mj1434 mit UDG-Aktivität beschrieben wurde (Chung *et al.*, 2003). Jedoch wurde diese Studie widerlegt (Schomacher *et al.*, 2009b). Die Frage der U-DNA-Reparatur bleibt bei solchen Archaeen offen.

Aus der Verteilung der Enzyme in den unterschiedlichen Organismen lässt sich folgende Arbeitshypothese bezüglich der möglichen Evolution der DNA-U-Reparatur in der archaeellen Domäne ableiten: Die DNA-U-Reparatur wurde ursprünglich von dem ExoIII-Homolog eingeleitet. Das Gen, das TUDG codiert, wurde durch lateralen Gentransfer aus Bakterien später erworben und hat die Funktion der ExoIII-Homologen an der DNA-U-Reparatur übernommen, so dass die U-Endoaktivität der ExoIII-Homologen überflüssig geworden ist. Die Möglichkeit des lateralen Gentransfers ist zwischen Bakterien und Archaeen am Beispiel *Methanosarcina mazei* besprochen worden (Deppenmeier *et al.*, 2002).

In dem Archaeon *Methanosarcina mazei* wurde ebenfalls ein ExoIII-Homolog (Mma3148) entdeckt, das U-Endoaktivität aufweist (diese Arbeit). Für dieses Enzym konnte eine U-endonukleolytische Aktivität ausschließlich gegenüber Cytosin und Thymin gezeigt werden (diese Arbeit, Seite 55). Gleichzeitig ist dieser Organismus mit einem aktiven TUDGA-Homolog ausgestattet, welches die Initiierung der DNA-U-Reparatur übernehmen kann. Im Licht der oben vorgeschlagenen Hypothese könnte die U-Endoaktivität von Mma3148 folgenderweiser erklärt werden: Mma3148 könnte eine U-Endonuklease sein, deren U-Endoaktivität wegen des per lateralem Gentransfer evolutiv späteren Erwerbs eines TUDGA-Homologs überflüssig geworden ist und im Lauf der Evolution schwächer geworden ist, so dass nur der Rest der U-Aktivität an den „leichten“ U/T und U/C-Substraten zu sehen ist.

Die Arbeitshypothese soll mit drei unten vorgeschlagenen Untersuchungen überprüft werden:

1. Biochemische Untersuchung der U/T und U/C Aktivität von ExoIII-Homologen aus den Organismen, die mit Vertretern der Familie 1 ausgestattet sind.
2. Bioinformatische Untersuchung der anderen Spezies der Gattung *Methanosarcina* auf Vorhandensein der TUDGA-Homologen. Wenn das Gen, das TUDGA codiert, durch lateralen Gentransfer erworben wurde, sollten die anderen Spezies der Gattung *Methanosarcina* nicht mit TUDGA-Homologen ausgestattet sein.
3. Stammbaumanalyse der bislang charakterisierten TUDGA- und ExoIII-Homologen.

1. Untersuchung der anderen bereits beschriebenen ExoIII-Homologe auf U/T- und U/C-Aktivität aus *H. sapiens*, *M. thermautotrophicus*, *E. coli*, *M. maripaludis*

Für den Test wurden ExoIII-Homologe aus *H. sapiens* (ApeI), *M. thermautotrophicus* (Mth212), *E. coli* (ExoIII) und *M. maripaludis* (MMP1012) ausgesucht. Die Aktivität von Mth212 wurde als Kontrolle gemessen. Da Mth212 eine aktive U-Endonuklease ist (Georg, J. *et al.*, 2006), wurde erwartet, dass Mth212 auch U/T und U/C Aktivitäten hat. *H. sapiens* und *E. coli* besitzen einen Vertreter der Familie 1, der die U-DNA-Reparatur einleitet (Lindahl, 1974; Olsen *et al.*, 1989; Nilsen *et al.*, 2001). Die ExoIII-Homologe aus diesen Organismen wurden auf U/G-Aktivität mit negativem Ausgang getestet (Georg, J., *et al.*, 2006) und der Vermutung nach sollen sie keine U/T, U/C-Aktivität aufweisen. Mit *M. maripaludis* wurde auch ein mesophiles Archaeon betrachtet. Interessanterweise wurden im Genom dieses Archaeons keine Vertreter der Familie 1, 2, 3, 4 oder 5 gefunden (Schomacher, L., 2007). Der Test von MMP1012 auf U/G-Aktivität ist mit negativem Ausgang gewesen (Schomacher L., 2007). Dieser Organismus scheint noch nicht bekannte DNA-U-Reparaturenzyme zu besitzen.

ApeI und *E. coli* ExoIII wurden von Fermentas bzw. NEB gekauft. MMP1012 wurde im Rahmen dieser Arbeit produziert und getestet. Die Aktivität der Proteine wurde an den AP/40-G, U/40G, U/40-C, U/40-T und U/40-A Substraten geprüft. Die Ergebnisse der Aktivitätstests für *E.coli* ExoIII, ApeI und MMP1012 sind in Abbildung 53 dargestellt. Die Aktivität von Mth212 ist in Abbildung 52 zu sehen.

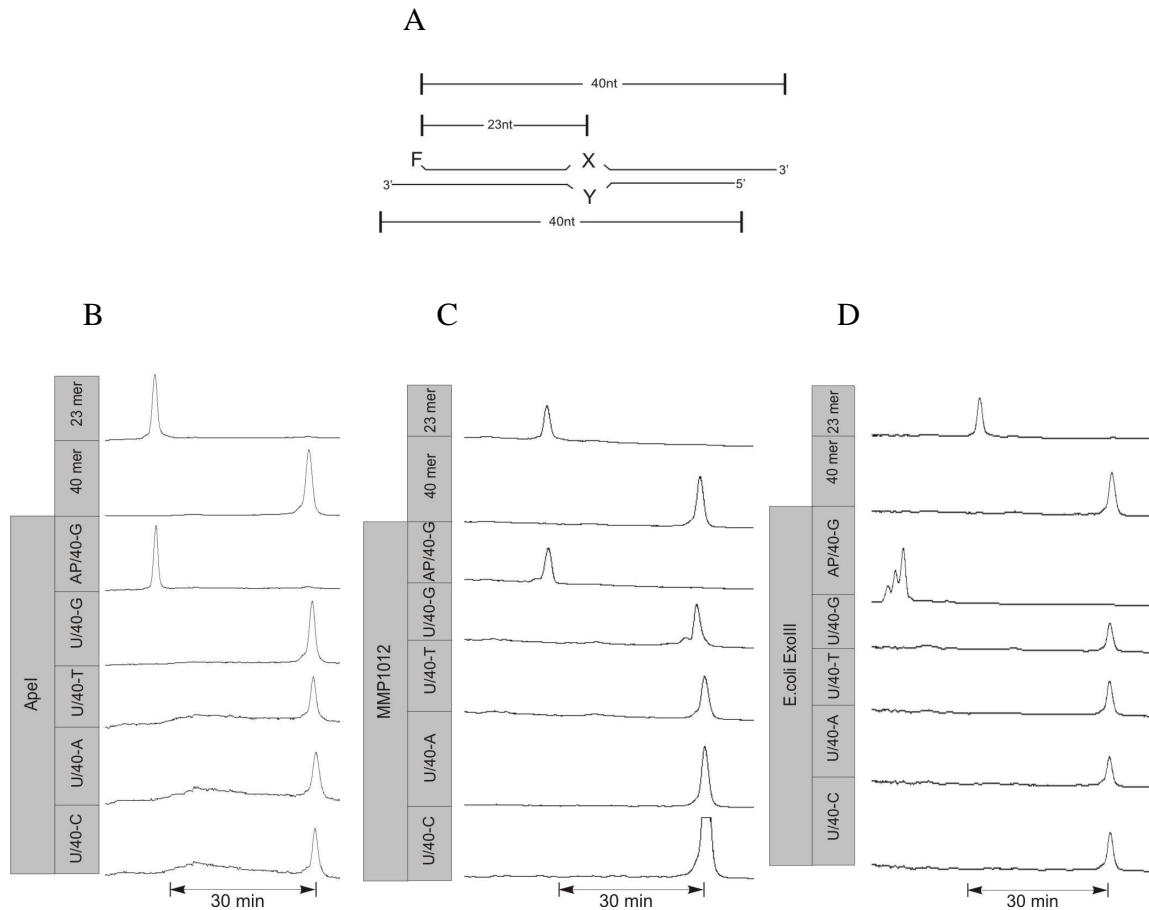


Abbildung 53: Test auf U-Aktivität von *E. coli_ExoIII*, ApeI (ExoIII-Homolog aus *H. sapiens* und MMP1012 (ExoIII-Homolog aus *M. maripaludis*).

(A) Schema des Oligonukleotidsubstrats. Details zum Substrat siehe Abbildung 13. (B-D) Analyse der Reaktionsprodukte mittels ALF-PAGE. (B) Messung der Aktivität von ApeI. Für die Reaktion wurden 1,5 u ApeI mit 0,12 pmol der angegebenen Substrate in 10µl Reaktionsbuffer (2.1.10) 5 min bei 37°C inkubiert. (C) Messung der Aktivität von MMP1012. Für die Reaktion wurden 0,24 pmol MMP1012 mit 0,12 pmol der angegebenen Substrate in 50µl 20mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 50mM KCl, 1mM $MgCl_2$ 40 min bei 37°C inkubiert. (D) Messung der Aktivität von *E. coli* ExoIII. Für die Reaktion wurden 1,5 u *E. coli* ExoIII mit 0,12 pmol der angegebenen Substrate in 10µl Reaktionsbuffer (2.1.10) 5 min bei 37°C inkubiert.

Unter den verwendeten Bedingungen erwiesen sich alle vier Enzyme als sehr aktive AP-Endonuklease (Abbildung 52, Abbildung 53, Spur AP/G). Die gegen den exonukleolytischen Abbau geschützten Substrate (U/40-X) haben die 3'→5' Exonuklease-Aktivität effektiv unterbunden. Wie erwartet, besitzt kein getestetes ExoIII-Homolog außer Mth212 eine U-Endo-Aktivität sowohl gegenüber U/G als auch U/C oder U/T.

2. Untersuchung der anderen Spezies der Gattung *Methanosarcina* auf Vorhandensein von TUDGA-Homologen.

Eventuell ist Mma3148 eine U-Endonuklease vom Mth212-Typ, deren U-Endoaktivität durch den Erwerb eines TUDGA-Homologs überflüssig geworden ist und diese durch genetische Drift verloren hat. Wenn das der Fall ist, sollten andere Spezies der Gattung *Methanosarcina* kein TUDGA besitzen. Bis jetzt wurden 3 Spezies der Gattung *Methanosarcina* sequenziert: *M. acetivorans* (Galagan *et al.*, 2002), *M. barkeri* (Maeder *et al.*, 2006) und *M. mazei* (Deppenmeier *et al.*, 2002). Bei allen drei Organismen wurde ein TUDGA-Homolog gefunden. Die Lokalisierung der 3 erwähnten TUDGA-Gene im Genom wurde untersucht (Abbildung 54).

Alle drei *Methanosarcina* TUDGA-Homologe haben eine ungefähr gleiche Lokalisation in den Genomen, was auf den ersten Blick einen lateralen Gentransfer unwahrscheinlich macht.

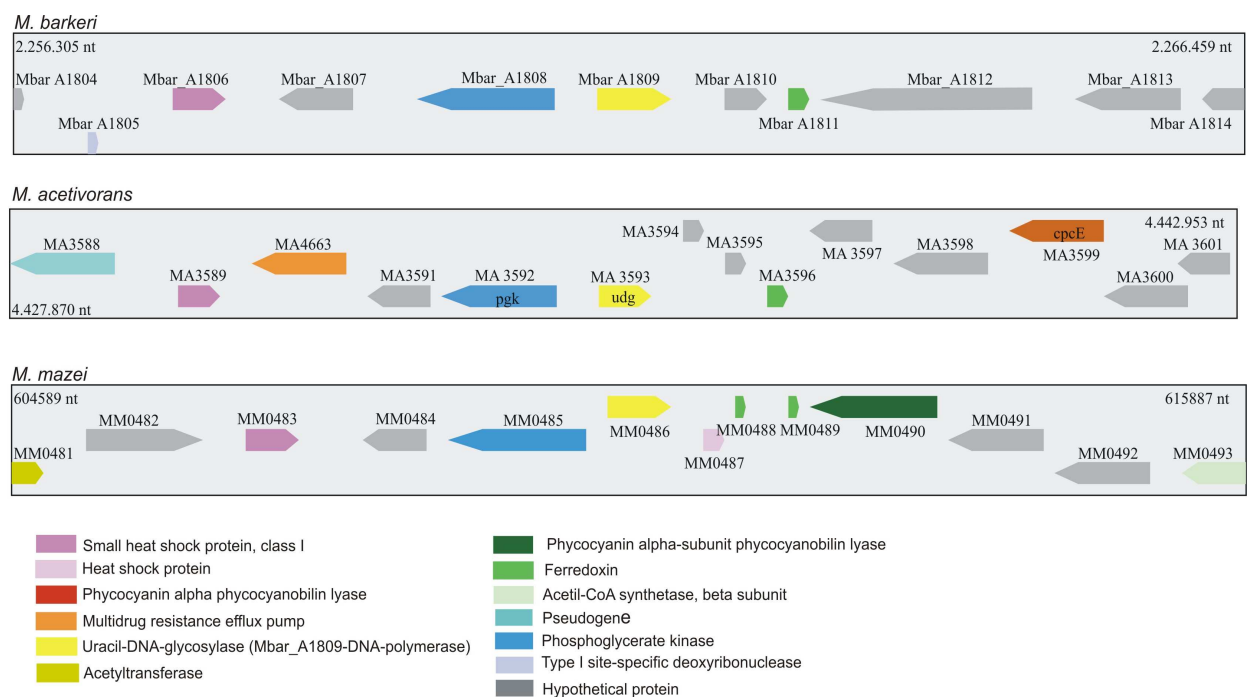


Abbildung 54: Lokalisierung der Gene für TUDGA-Homologe im Genom von *M. mazei*, *M. barkeri*, *M. acetivorans*.

Analyse der Umgebung der Gene für TUDGA-Homologe bei drei Vertretern der Gattung *Methanosarcina*. Die Gene, deren Produkte ähnliche Funktionen ausführen, sind in den gleichen Farben markiert.

3. Analyse der Stammbäume der bislang charakterisierten TUDGA- und ExoIII-Homologen

Der Stammbaum wurde mit bereits charakterisierten TUDGA aus *Thermotoga maritima* (Sandigursky and Franklin, 1999), *Thermus thermophilus* (Starkuviene and Fritz, 2002), *Pyrobaculum aerophilum* (Sartori, A.A., et al., 2002), *Archaeoglobus fulgidus* (Sandigursky and Franklin, 2000) und TUDGA aus drei Spezies der Gattung *Methanosarcina* aufgestellt (Abbildung 55).

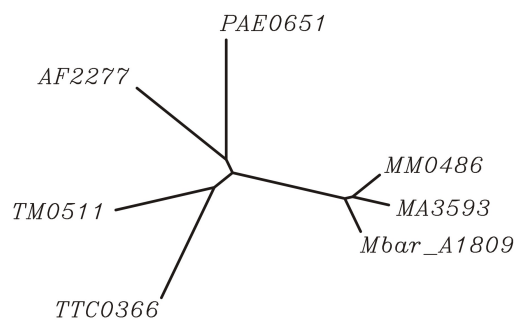


Abbildung 55: Stammbaum der tUDGA- Homologe.

Stammbaum der ExoIII-Homologe. Mbar_A1809-*Methanosarcina barkeri*, MA3593-*Methanocarcina acetivorans*, TM0511-*Thermotoga maritima*, MM0486-*Methanosarcina mazei*, TTC0366-*Thermus thermophilus*, AF2277-*Archaeoglobus fulgidus*, PAE0651-*Pyrobaculum aerophilum*. Die Stammbäume wurden mit dem Programm ClastalW erstellt (<http://align.genome.jp>)

Die Analyse des Stammbaums hat folgende Ergebnisse geliefert. Alle TUDGA-Homologe bilden drei Zweige aus. TM0511 (*Thermotoga maritima*) und TTC0366 (*Thermus thermophilus*) stehen für den bakteriellen Ast. Fünf andere Proteine gehören zu Archaea, aber die Proteine aus der Gattung *Methanosarcina* bilden einen weit entfernten Zweig und zeigen eine engere Verwandtschaft miteinander, als mit anderen TUDGA-Homologen, was nicht erstaunlich ist, weil sie zu einer Gattung gehören. Möglicherweise hat der laterale Gentransfer früher im Lauf der Evolution stattgefunden, bevor die Gattung *Methanosarcina* in drei Spezies geteilt wurde. Für die weitere Überprüfung der Arbeitshypothese ist es sinnvoll die ExoIII-Enzyme der anderen Spezies der Gattung *Methanosarcina* zu untersuchen. Nach dieser Vermutung sollten die erwähnten ExoIII-Proteine ähnliche Aktivität wie Mma3148 aufweisen.

Parallel wurde der Stammbaum der ExoIII-Homologe aufgestellt (Abbildung 56). Es wurden archaeale ExoIII-Homologe (Af_Exo: *A. fulgidus* (Schmidel, et al., 2009), MMP1012: *M. maripaludis* (Schomacher, 2007, diese Arbeit), Mth212: *M. thermotrophicus* (Georg, et al., 2006), Mma3148: *M. mazei* (Georg, et al., 2006, diese Arbeit), Mbar_A3242: *M. barceri*, MA2077: *M. acetivorans*, Tvo_Exo: *Thermoplasma volcanium* (Kaneda, et al., 2006)), bakterielle ExoIII (ExoIII: *E. coli* (Richardson and Kornberg, 1964) ExoA: *B. subtilis* (Shida, et al., 1999)) und das humane ExoIII (HAPI/ApeI) (Dempfle, B., et al., 1991) verglichen.

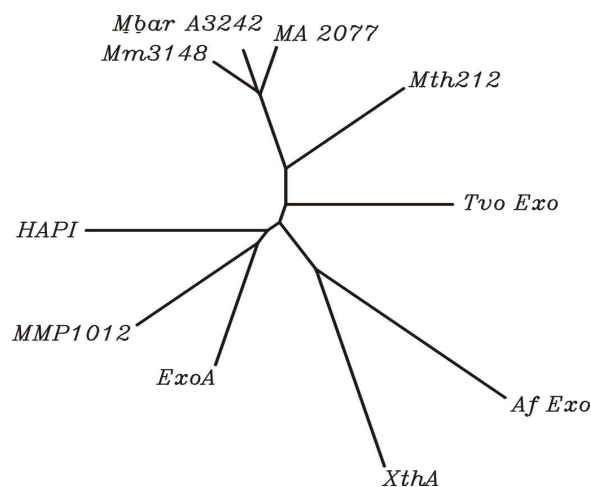


Abbildung 56: Stammbaum der ExoIII- Homologe.

Mma3148-Methanosarcina mazei, Mth212-Methanothermobacter thermotrophicus, ExoA-Bacillus subtilis, Ape1-Homo sapiens, Af_Exo-Archeoglobus fulgidus, XthA-Escherichia coli, MMP1012-Methanococcus maripaludis, Tvo_Exo-Thermoplasma volcanium. Die Stammbäume wurden mit dem Programm ClastalW erstellt (<http://align.genome.jp>)

Mth212, Mma3148, Mbar_A3242, MA2077 und Tvo_Exo bilden zusammen einen separaten Zweig, was für engere Verwandtschaft diese Proteine spricht (nicht erstaunlich, weil sie zu einer Domäne gehören). Tvo_ExoIII stammt aus einem thermophilen Archaeon und wurde als AP-Endo, 3'→5' Exonuklease beschrieben (Kaneda, et al., 2006a). Die Aktivität von Evo_ExoIII wurde aber nicht an U-haltigen Substraten geprüft (Kaneda, et al., 2006a). Der Hypothese nach (dass die DNA-U-Reparatur ursprünglich von dem ExoIII-Homolog ausgeführt wurde) soll Tvo_ExoIII auch U/G-Aktivität besitzen. Für die Überprüfung der in diesem Kapitel aufgestellten Arbeitshypothese ist es sinnvoll dieses Enzym an den U-haltigen Substraten zu testen. Erstaunlicherweise bildet das archaeelle ExoIII MMP1012 einen separaten Zweig mit dem bakteriellen Homolog (ExoA), genauso wie archaeelles ExoIII Af_Exo mit bakteriellem ExoIII.

Schlussfolgerung

Eventuell ist Mma3148 eine U-Endonuklease vom Mth212-Typ, deren U-Endoaktivität durch den Erwerb eines TUDGA-Homologs überflüssig geworden ist und diese durch genetische Drift verloren hat. Das TUDGA-Homolog könnte durch lateralen Gentransfer erworben worden sein, der möglicherweise früher im Lauf der Evolution stattgefunden hat, bevor die Gattung *Methanosarcina* in drei Spezies geteilt wurde.

4. Zusammenfassung

Eins der gravierendsten Probleme in jedem Organismus sind die spontane hydrolytische DNA-Schäden. Das Problem der DNA-U-Reparatur wurde bis heute sorgfältig in thermophilen und hyperthermophilen Archaeen untersucht. Dabei wurde ein neuartiger Reparaturweg entdeckt, der von einer DNA-U Endonuklease (Mth212, ein ExoIII Homolog) initiiert wird. Zum besseren Verständnis des möglichen evolutiven Weges der DNA-U-Reparatur sowie für die Aufklärung der Fragen, ob dieser Reparaturweg von den extremen Lebensbedingungen abhängig ist und welche strukturelle Besonderheit die U-Endonukleaseaktivität von Mth212 bestimmt, wurde ein mesophiles ExoIII-Homolog (Mma3148) mit hoher Sequenzverwandtschaft zu Mth212 untersucht. Das ExoIII-Homolog Mma3148 stammt aus dem mesophilen Archaeon *Methanosarcina mazei*. Die Untersuchung des Genoms von *M. mazei* hat folgende Ergebnisse geliefert. *M. mazei* ist mit zwei *open reading frames* ausgestattet, deren Produkte als Kandidaten für die Initiation der DNA-U-Reparatur betrachtet werden können: ein TUDGA-Homolog (Mma0486) (Familie 4) und ein ExoIII-Homolog (Mma3148). Das TUDGA-Homolog besitzt alle Eigenschaften der Uracil-DNA-Glykosylase Familie 4. Es ist allerdings erstaunlich, dass das Protein von 37°C bis zu 77°C aktiv bleibt. Mma3148 hat die typischen Eigenschaften eines ExoIII-Homologs. Zusätzlich zeigt das Protein Aktivität gegenüber biologisch irrelevanten U/T und U/C Fehlpaarungen, nicht aber gegenüber U/G. Aufgrund der Analyse eines *multiple sequence alignments* von Mth212 mit der ExoIII-Familie und der 3D Struktur bereits kristallisierter ExoIII-Enzyme wurden bei *M. mazei* ExoIII zwei Aminosäuren ausgetauscht, was zur generellen Steigerung aller Aktivitäten und damit zu einer schwachen, aber deutlich detektierbaren Aktivität gegenüber U/G geführt hat.

Für die Untersuchung, ob die Doppelmutante genetisch nachweisbar einen DNA-U-Reparaturweg *in vivo* einleiten kann, wurde ein U-DNA-Reparaturexperiment *in vivo* im heterologen *E. coli*-Hintergrund mit Hilfe eines M13-heteroduplex-DNA-Konstruktes durchgeführt. Zuerst wurde mit Hilfe eines Komplementationsexperimentes gezeigt, dass das archaeelle Protein in *E. coli* funktionsfähig ist. Das U-DNA-Reparaturexperiment hat einen schwachen Hinweis auf Beteiligung der Doppelmutante an der U/G-Reparatur ergeben.

In Zusammenarbeit mit Kristina Lakomek wurde die Arbeitshypothese zur Erkennung des Uracilrests durch Mth212 durch Austausch bestimmter Aminosäurereste untersucht. Daraus wurde folgende Schlussfolgerung gezogen: Die Insertion einer Argininseitenkette (Arg209) in die Basenstapelung spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Erkennung eines dU-Restes.

Im Licht dieser Befunde wurde die Evolution der DNA-U-Reparatur in der archaeellen Domäne folgenderweise betrachtet: Die DNA-U-Reparatur wurde ursprünglich von einem ExoIII-Homolog ausgeführt, dessen U-Endoaktivität durch den evolutiv späteren Erwerb eines TUDGA-Homologs überflüssig wurde und anschließend durch genetische Drift verloren ging. Da das Mma3148 Protein nur biologisch nicht relevante U-Aktivität besitzt, wurde dieses Enzym als eine evolutive Zwischenstufe betrachtet.

5. Anhang

5.1 Originaldaten zum U-DNA-Reparatur Experiment *in vivo* (Kapitell 3.6.2.4)

Tabelle 9: Originaldaten der blauen und farblosen Plaques.

Es sind die Ergebnisse von drei individuellen Experimenten angegeben. Die Originalzahlen beziehen sich auf 1/10 der Probe.

NM522				
Nummer des Experimentes	Anzahl von blauen Plaques	Prozentualer Anteil von blauen Plaques	Anzahl von farblosen Plaques	Prozentualer Anteil von farblosen Plaques
1	563	57,7	412	42,3
2	549	59,7	370	40,3
3	565	57,1	424	42,9
Mittelwert (%)		58,2		41,8

NM522Δung				
Nummer des Experimentes	Anzahl von blauen Plaques	Prozentualer Anteil von blauen Plaques	Anzahl von farblosen Plaques	Prozentualer Anteil von farblosen Plaques
1	134	22,1	473	77,9
2	170	25,2	504	74,8
3	130	22,5	448	77,5
Mittelwert (%)		23,3		76,7

NM522Δung/pKK223-3/ung				
Nummer des Experimentes	Anzahl von blauen Plaques	Prozentualer Anteil von blauen Plaques	Anzahl von farblosen Plaques	Prozentualer Anteil von farblosen Plaques
1	606	55,7	482	44,3
2	596	47,3	663	52,7
3	390	49,4	400	50,6
Mittelwert (%)		50,8		49,2

NM522Δung/pKK223-3/Mma3148				
Nummer des Experimentes	Anzahl von blauen Plaques	Prozentualer Anteil von blauen Plaques	Anzahl von farblosen Plaques	Prozentualer Anteil von farblosen Plaques
1	301	28,6	750	71,4
2	291	28,1	743	71,9
3	400	26,6	1102	73,4
Mittelwert (%)		27,7		72,2

NM522Δung/pKK223-3/Mma3148_A118M_M209Y				
Nummer des Experimentes	Anzahl von blauen Plaques	Prozentualer Anteil von blauen Plaques	Anzahl von farblosen Plaques	Prozentualer Anteil von farblosen Plaques
1	345	37,1	584	62,9
2	450	33,3	900	66,7
3	612	35,7	1100	64,3
Mittelwert (%)		35,4		64,6

5.2 Sequenzanhang (auf CD)

5.2.1 Vektorsequenzen

5.2.1.1 Vektorsequenz M13mp20

5.2.1.2 Vektorsequenz pET-28a

5.2.1.3 Vektorsequenz pCR-Blunt II-TOPO

5.2.1.4 Vektorsequenz pET_B_001

5.2.1.5 Vektorsequenz pKK223-3

5.2.1.6 Vektorsequenz pREP4

5.2.2 Sequenzdaten Mma0486 im pET_B_001

5.2.3 Sequenzdaten M13mp20/Stop/NcoI

5.2.4 Sequenzdaten Mma3148 im pKK223-3

5.2.5 Sequenzdaten Mma3148/A118M/M209Y im pET_B_001

5.2.6 Sequenzdaten Mma3148/A118M/M209Y im pKK223-3

5.2.7 Sequenzdaten Mth212/W205A, Mth212/W206A, Mth212/S207A, Mth212/Y208A und Mth212/R209A

5.2.8 Sequenzdaten XthA im pKK223-3

5.2.9 Sequenzdaten XthA_D151N im pKK223-3

5.2.10 Sequenzdaten XthA_W212A im pKK223-3

5.2.11 Sequenzdaten XthA_W212A_D151N im pKK223-3

5.2.12 Sequenzdaten Mma3148 im pET_B_001

5.2.13 Sequenzdaten Ung im pKK223-3

6. Abkürzungsverzeichnis

Ala/A	Alanin
Amp	Ampicilin
AP-Stelle	Apyrimidinische/apurinische Stelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg/R	Arginin
Asp/D	Asparaginsäure
Asn/N	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cm	Chloramphenicol
Cys/C	Cystein
DNA	Desoxyribonukleisäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double yeast tryptone</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
Gln/Q	Glutamin
Glu/E	Glutaminsäure
Gly/G	Glycin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure
HhH	<i>Helix-hairpin-helix</i>
His/H	Histidin
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
Leu/L	Leucin

Lys/K	Lysin
Met/M	Methionin
Mr	relative Molmasse
ml	Milliliter (10^{-3})
μ l	Mikroliter (10^{-6})
min.	Minute
nm	Nanometer (10^{-9})
μ m	Mikrometer (10^{-6})
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Phe/F	Phenylalanin
Pro/P	Prolin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser/S	Serin
sec	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenamin
Thr/T	Threonin
Trp/W	Tryptophan
Tyr/Y	Tyrosin
Val/W	Valin
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase

7. Literaturverzeichnis

- Aravind, L. and Koonin, E.V. (2000) The α/β fold Uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. *Genome Biol.*, 1(4), research 0007.1-0007.8.
- Babura, A.D. (2001) Aspekte der Koordinationchemie des Tinks mit Nucleobasen, Nucleosiden und deren Dervaten als Liganden. *Dissertation*. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Albert-Ludwids-Universität Freiburg im Breisgau.
- Barnes, D.E. and Lindahl, T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet*, **38**, 445-476.
- Bernstein, C. and Bernstein, H. (1991) Aging, Sex and DNA Repair. Academic Press, Inc., San Diego.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L. , Sauvaigo, S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.*, **424**, 9-12.
- Cherepanov, P.P and Wackernagel, W. (1995) Gene distruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, **158**, 9-14.
- Chung, J.H., Im, E.K., Park, H.Y., Kwon, J.H., Lee, S., Oh, J., Hwang, K.C., Lee, J.H and Jang, Y. (2003) A novel uracil-DNA glycosylase family related to the helix-hairpin-helix DNA glycosylase superfamily. *Nucleic Acidc Res.*, **31**, 2045-2055.
- Cone, R., Duncan, J., Hamilton, L., Friedberg, E.C. (1977) Partial purification and characterization of a uracil DNA N-glycosidase from Bacillus subtilis. *Biochemistry*, **16**, 3194-3201.
- Cunningham, R.P. (1997) DNA glycosylases. *Mutat Res*, **383**, 189-196.
- Cunningham, R.P., Saporito, S.M., Spitzer, S.G. and Weiss, B. (1986) Endonuclease IV (nfo) mutant of Escherichia coli. *J Bacteriol*, **168**, 1120-1127.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6640-6645.
- Demple, B., Herman, T., Chen, D.S. (1991) Cloning and expression of ApeI, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a famili of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11450-11454.

- Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R.A., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Baumer, S., Jacobi, C., Bruggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Bomeke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H.P., Gunsalus, R.P., Fritz, H.J. and Gottschalk, G. (2002) The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **4**, 453-461.
- Dianov, G. and Lindahl, T. (1994) Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.*, **4**, 1069-1076.
- Dianov, G.L., Sleeth, K.M., Dianava, I.I and Allinson, S.L. (2003) Repair of abasic sites in DNA. *Mutat. Res.*, **531**, 157-163.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
- Egger, R.I.L., Geerling, A.C.M., de Groot, P.W.J., Ludwig, W. and de Vos, W.M. (1992) Methanogenic Bacterium Gö1: An Acetoclastic Methanogen that is Closely to *Methanosarcina frisia*. *Syst. Appl. Microbiol*, **15**, 582-586.
- Franklin, W.A. and Lindahl, T. (1988) DNA deoxyribosephosphodiesterase. *EMBO J.*, **7**, 3617-3622.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) DNA Repair and Mutagenesis American Society for Microbiology 1325 Massachusetts Avenue, N.W. Washington, DC 20005.
- Galagan, J.E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M.G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R.D., Cann, I., Graham, D.E., Grahame, D.A., Guss, A.M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H.C., Krzycki, J.A., Leigh, J.A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J.N., Smith, K., Springer, T.A., Umayam, L.A., White, O., White, R.H., Conway de Macario, E., Ferry, J.G., Jarrell, K.F., Jing, H., Macario, A.J., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K.R., Swanson, R.V., Zinder, S.H., Lander, E., Metcalf, W.W. and Birren, B. (2002) The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res*, **12**, 532-542.
- Gabbara, S., Wyszynski, M. and Bhagwat, A.S. (1994) A DANN repair process in *Escherichia coli* corrects U:G and T:G mismatches to C:G at sites of cytosine methylation. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 244-248.

- Gallinari, P. and Jiricny, J. (1996) A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. *Nature*, **383**, 735-738.
- Georg, J., Schomacher, L., Chong, J.P., Majernik, A.I., Raabe, M., Urlaub, H., Muller, S., Ciirdaeva, E., Kramer, W. and Fritz, H.J. (2006) The Methanothermobacter thermotrophicus ExoIII homologue Mth212 is a DNA uridine endonuclease. *Nucleic Acids Res*, **34**, 5325-5336.
- Georg, J. (2005) Gentechnische Produktion und enzymologische Charakterisierung des ExoIII-Homologs von *Methanothermobacter thermotrophicus*. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.
- Goldmark, P.J. and Linn, S. (1972) Purification and properties of the *recBC* DNase of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.*, **247**, 1849-1860.
- Gorman, M.A., Morera, S., Rothwell, D.G., Fortelle, E. de L., Mol, C.D., Tainer, J.A., Guan, Y., Manuel, R.C., Arvai, A.S., Parikh, S.S., Mol, C.D., Miller, J.H., Lloyd, R.S. and Tainer, J.A. (1998) MutY catalytic core, mutant and bound adenine structure define specificity for DNA repair superfamily. *Nature Struct. Biol.*, **5**, 1058-1064
- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J. and Schär, P. (2003) The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res.*, **31**(9), 2261-2271.
- Haushalter, K.A., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., Verdine, G. (1999) Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Current Biology*, **9**, 174-185.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.-H., Jiricny, J., Bird, A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, **401**, 301-304.
- Hennecke, F., Kolmar, H., Bründl, K. and Fritz, H.-J. (1991) The *vsr* gene product of *E. coli* K-12 is a strand- and sequence-specific DNA mismatch endonuclease. *Nature*, **353**, 776-778.
- Hinks, J.A., Evans, M.C., De Miguel, Y., Sartori, A.A., Jiricny, J. and Pearl, L.H. (2002) An iron-sulfur cluster in the family 4 uracil-DNA glycosylases. *J Biol Chem*, **277**, 16936-16940.
- Hofacker, I.L. (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3429-3431.
- Hollis, T., Ichikawa, Y. and Ellenberger, T. (2000) DNA bending and flipout mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA. *EMBO J.*, **19**, 758-766.

- Horst, J.-P. and Fritz, H.-J. 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*, **15**(19) 5459-5469.
- Kaneda, K., Sekiguchi, J. and Shida, T. (2006b) Role of the tryptophan residue in the vicinity of the catalytic center of exonuclease III family AP endonucleases: AP site recognition mechanism. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1552-1563.
- Kaneda, K., Ohishi, K., Sekiguchi, J. and Shida, T. (2006a) Characterization of the AP Endonucleases from *Thermoplasma volcanium* and *Lactobacillus plantarum*: Contributions of Two Important Tryptophan Residues to AP Site Recognition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2213-2221.
- Karu, A.E., MacKay, V., Goldmark, P.J. and Linn, S. (1973) The recBC Deoxyribonuclease of *Escherichia coli* K-12. Substrate specificity and reaction intermediates. *J Biol Chem*, **248**, 4874-4884.
- Kelley, M.R., Kow, Y.W. and Wilson, D.W. III (2003) Disparity between DNA base excision repair in yeast and mammals: translational implications. *Cancer Res.*, **63**, 549-554.
- Kosaka, H., Hoseki, J., Nakagawa, N., Kuramitsu, S. and Masui, R. (2007) Crystal Structure of Family 5 Uracil-DNA Glycosylase Bound to DNA. *J. Mol. Biol.*, **373**, 839-850.
- Kramer, B., Kramer, W. and 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**, 879-887.
- Lakomek, K. (2009) Structural Characterization of the Lysosomal 66.3 kDA Protein and of the DNA Repair Rnzyme Mth212 by Means of X-Ray Crystallography Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen
- Lieb, M. and Bhagwat, A.S. (1996) Very short patch repair: reducing the cost of cytosine methylation. *Mol. Microbiol.*, **20**(3), 467-473.
- Lindahl, T. (1974) An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3649-3653.
- Lutsenko, E. and Bhagwat, A.S. (1999) The role of the *Escherichia coli* mug protein in the removal of uracil and 3,N(4)-ethenocytosine from DNA. *J Biol Chem*, **274**, 31034-31038.

- Maeder, D.L., Anderson, I., Brettin, T.S., Bruce, D.C., Gilna, P., Han, C.S., Lapidus, A., Metcalf, W.W., Saunders, E., Tapia, R. and Sowers, K.R. (2006) The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *J Bacteriol*, **188**, 7922-7931.
- Marnett, L.J. and Burcham, P.C. (1993) Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol*, **6**, 771-785.
- Marti, T.M. and Fleck, O. (2004) DNA repair nucleases. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 336-354.
- Masaoka, A., Matsubara, M., Hasagawa, R., Tanaka, T., Kurisu, S., Terato, H., Ohyama, Y., Karino, N., Matsuda, A. and Ide, H. (2003) Mammalian 5-Formyluracil-DNA Glycosylase. 2. Role of SMUG1 Uracil-DNA Glycosylase in Repair of 5-Formyluracil and Other Oxidized and Deaminated BAsE Lesions. *Biochemistry*, **42**, 5003-5012.
- Memisoglu, A. and Samson, L. (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*, **451**, 39-51.
- Mi, R., Dong, L., Kaulgud, T., Hackett, K.W., Dominy, B.N and Cao, W. (2009) Insights from Xanthine and Uracil DNA Glycosylase Activities of Bacterial and Human SMUG1: Switching SMUG1 to UDG. *J.Mol.Biol.*, **385**, 761-778.
- Miki, T., Yasukochi, T., Nagatani, H., Furuno, M., Orita, T., Yamada, H., Imoto, T. and Horiuchi, T. (1987) Construction of a plasmid vector for the regulatable high level expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*: an application to overproduction of chicken lysozyme. *Protein Eng*, **1**, 327-332.
- Moe, E., Leiros, I., Smalas, A.O. and McSweeney, S. (2006) The Crystal Structure of Mismatch-specific Uracil-DNA Glycosylase (MUG) from *Deinococcus radiodurans* Reveals a Novel Catalytic Residue and Broad Substrate Specificity. *J Biol Chem.*, **281**(1), 569-577.
- Mol, C.D., Izumi, T., Mitra, S. and Tainer, J.A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature*, **403**, 451-456.
- Mol, C.D., Kuo, C.F., Thayer, M.M., Cunningham, R.P. and Tainer, J.A. (1995) Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III. *Nature*, **374**, 381-386.

- Nash, H.M., Bruner, S.D., Schäfer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S. and Verdine, G.L. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.*, **6**, 968-980.
- Neddermann, P. and Jiricny, J. (1993) The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21218-21224.
- Neddermann, P. and 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. USA*, **91**, 1642-1646.
- Nilsen, H., Haushalter, K.A., Robins, P., Barner, D.E., Verdine, G.L., Lindahl, T. (2001) Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO*, **20**(15); 4278-4286.
- Olsen, L.C., Aasland, R., Wittwer, C.U., Krokan, H.E. and Helland, D.E. (1989) Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO*, **8**(10), 3121-3125.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4**, 2411-2423.
- Pearl, L.H. (2000) Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res*, **460**, 165-181.
- Pettersen, H.S., Sundheim, O., Gilljam, K.M., Slupphaug, G., Krokan, H.E. and Kavli, B. (2007) Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3879-3892.
- Podlutzky, A.J., Dianova, I.I., Podust, V.N., Bohr, V.A. and Dianov, G.L. (2001) Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J.*, **20**, 1477-1482.
- Rothwell, D. G.Hang, B.Gorman, M. A.Freemont, P. S.Singer, B.Hickson, I. D. (2000) Substitution of Asp-210 in HAP1 (APE/Ref-1) eliminates endonuclease activity but stabilises substrate binding. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2207-13.
- Richardson, C.C. and Kornberg, A. (1964) A Deoxyribonucleic Acid Phosphatase-Exonuclease from *Escherichia coli*. I. Purification of the enzyme and characterization of the phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, **239**, 242-250.
- Segher, D. and Strauss, B. (1983) Insertion of Nucleotides Opposite Apurinic/Apyrimidinic Sites in Deoxyribonucleic Acid during in Vitro Synthesis: Uniqueness of Adenine Nucleotides. *Biochemistry*, **22**, 4518-4526.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandigursky, M. and Franklin, W.A. (1999) Thermostable uracil-DNA glycosylase from *Thermotoga maritima* a member of a novel class of DNA repair enzymes. *Curr Biol*, **9**, 531-534.
- Sandigursky, M. and Franklin, W.A. (2000) Uracil-DNA glycosylase in the extreme thermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem*, **275**, 19146-19149.
- Sartori, A.A. and Jiricny, J. (2003) Enzymology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem*, **278**, 24563-24576.
- Sartori, A.A., Fitz-Gibbon, S., Yang, H., Miller, H.J., Jiricny, J. (2002) A novel uracil-DNA glycosylase with broad substrate specificity and an unusual active site. *EMBO*, **21**(12), 3182-3191.
- Sartori, A.A., Schär, P., Fitz-Gibbon, S., Miller, J.H., Jiricny, J. (2001) Biochemical Characterization of Uracil Processing Activities in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem*, **276**, 29979-29986.
- Schmiedel, R., Kuettner, E.B., Keim, A., Strater, N. and Greiner-Stoffele, T. (2009) Structure and function of the abasic site specificity pocket of an AP endonuclease from *Archaeoglobus fulgidus*. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 219-231.
- Schomacher, L., Chong, J.P., McDermott, P., Kramer, W. and Fritz, H.J. (2009a) DNA uracil repair initiated by the archaeal ExoIII homologue Mth212 via direct strand incision. *Nucleic Acids Res*, **37**, 2283-2293.
- Schomacher, L., Ciirdaeva, E., Smolorz, S., Ber, S., Kramer, W. and Fritz, H.-J. (2009b) Helix-hairpin-helix protein MJ1434 from *Methanocaldococcus jannaschii* and EndoIV homolog TTC0482 from *Thermus thermophilus* HB27 do not process DNA uracil residues. submitted to *Nucleic Acids Research*.
- Schomacher, L. (2007) Ein neu entdeckter Weg der Reparatur hydrolytisch geschädigter DNA-Cytosinreste, etabliert im thermophilen Archaeon *Methanothermobacter thermotrophicus* Δ H. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Shida, T., Noda, M. and Sekiguchi, J. (1996) Cleavage of single- and double-stranded DNAs containing an abasic residue by *Escherichia coli* exonuclease III (AP endonuclease VI). *Nucleic Acids Res*, **24**(22), 4572-4576.

- Shida, T., Ogawa, T., Ogasawara, N. and Sekiguchi, J. (1999) Characterization of *Bacillus subtilis* ExoA Protein: a Multifunctional DNA-repair Enzyme Similar to the Exonuclease III. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(9), 1528-1534.
- Shokolenko, I.N., Alexeyev, M.F., Robertson, F.M., LeDoux, S.P. and Wilson, G.L. (2003) The expression of Exonuclease III from *E. coli* in mitochondria of breast cancer cells diminishes mitochondrial DNA repair capacity and cell survival after oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 471-482.
- Slupska, M.M., Baikalov, S., Luther, W.M., Chiang, J., Wei, Y., Miller, J. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (/hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.*, **178**, 3885-3892.
- Starkuviene, V. and Fritz, H.J. (2002) A novel type of uracil-DNA glycosylase mediating repair of hydrolytic DNA damage in the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2097-2102.
- Staszewski, O. (2006) Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen über γ -H2AX Immunhistochemie nach Einwirkung genotoxischer Agenzien auf Säugerzellen. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Thayer, M.M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R.P. and Tainer, J.A. (1995) Novel DNA binding motifs in the DNA repair endonuclease III crystal structure. *EMBO J.*, **14**, 4108-4120.
- Tomasz, M. (1995) Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol*, **2**, 575-579.
- Wilson, D.M., 3rd and Bohr, V.A. (2007) The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 544-559.
- Womble, D.D. (2000) GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs. *Methods Mol. Biol.*, **132**, 3-22.
- Voet, J. and Voet, G. (1992) Biochemie. VCH, Verlagsgesellschaft mbH, D-6940, Weinheim.
- Yang, H., Fitz-Gibbon, S., Marcotte, E.M., Tai, J.H., Hyman, E.C. and Miller, J.H. (2000) Characterization of a thermostable DNA glycosylase specific for U/G and T/G mismatches from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Bacteriol*, **182**, 1272-1279.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz danke ich für die Überlassung dieses interessanten Projektes, für die Hilfe bei allen Problemen, die stetige Diskussionsbereitschaft, enorme Unterstützung, unendliche Geduld und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Herrn PD Dr. Wilfried Kramer danke ich für die Übernahme des Korreferates und hilfreiche Ratschläge bei der Lösung der praktischen und theoretischen Probleme.

Mein Dank gilt Lars Schomacher, Blagovesta Popava, Elena Ciirdaeva, Haliunaa Tseden, Kristina Lakomek, Christiane Preiß für die stetige Diskussionsbereitschaft und geduldige Beantwortung meinen Fragen.

Angelika Löffers danke ich für die tägliche Unterstützung der Laborarbeit.

Olaf Waase und Patrick Regin danke ich für die Beseitigung von technischen Problemen.

Jarek Sobkowiak danke ich für die Hilfe bei Soft- und Hardware Problemen.

Marita Kalck für die administrative Hilfe.

Den Mitgliedern des Göttinger Genomics Laboratory danke ich für die Sequenzierung meiner Plasmide.

Besonderer Dank gilt meinen Freunden, die gezwungen wurden, diese Arbeit zu lesen.

Ich danke meiner Familie, besonders herzlicher Dank gilt meinen Großeltern für ihre stetige Unterstützung, Geduld und finanzielle Hilfe.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Ber, Svetlana
Geburtsdatum: 31.12.1980
Geburtsort: Buguruslan / Russland
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: russisch

Schulbildung

1988 – 1998 Mittlere Schule Nr.1 in Buguruslan / Russland
09/1998 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1998 – 2003 Studium Biologie an der Staatlichen Universität zu Samara / Russland.
Abschluss: Diplom

09/2003-03/2005 Anreise nach Deutschland. Besuch von Sprachkursen.

03/2005 Deutschsprachprüfung für den Hochschulzugang ausländischer Studienbewerber (DSH).

2005-2006 Praktikum in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen.

Seit 2006 Promotion in der Abteilung für Molekular Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz.