

Identifikation und funktionelle Charakterisierung von TrpD2, einer neuen Klasse nukleinsäurebindender Proteine.

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg**



**Vorgelegt von
Daniel Schneider
aus Regensburg**

Oktober 2011

Promotionsgesuch eingereicht am: 5. Oktober 2011

Die Arbeit wurde eingeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sternner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Oberprieler

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sternner
2. Prüfer: PD Dr. Winfried Hausner
3. Prüfer: Prof. Dr. Herbert Tschochner

**„Es gibt wichtigeres im Leben,
als beständig dessen Geschwindigkeit zu erhöhen.“**

(Mahatma Gandhi)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2007 bis Oktober 2011 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität zu Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner durchgeführt. Von Juni 2010 bis Juli 2010 erfolgten Arbeiten in der Gruppe von Prof. Dr. Günter Mayer an der Universität Bonn.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGEN.....	IV
TABELLEN.....	VI
FORMELN	VII
ABKÜRZUNGEN.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 KONSEQUENZEN DES GENOMZEITALTERS	3
1.2 DIE TRP-D- UND NP-II-PROTEINFAMILIEN	5
1.3 DIE SOS-ANTWORT IN <i>E. COLI</i>	8
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	10
2 MATERIAL.....	11
2.1 CHEMIKALIEN	11
2.2 ANTIKÖRPER	11
2.3 KITS	11
2.4 ENZYME	12
2.5 BAKTERIENSTÄMME.....	13
2.6 PLASMIDE.....	14
2.7 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.....	16
2.8 MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	19
2.8.1 <i>Molekularbiologisches Arbeiten</i>	20
2.8.2 <i>Mikrobiologische Arbeiten mit E. coli</i>	21
2.8.3 <i>Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen</i>	22
2.8.4 <i>Arbeiten mit Proteinen</i>	22
2.8.5 <i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	23
2.8.6 <i>Lösungen für Silberfärbung</i>	24
2.8.7 <i>Puffer für Western blot</i>	24
2.9 SOFTWARE	24
2.9.1 <i>Lokale Anwendungen</i>	24
2.9.2 <i>Servergestützte Anwendungen</i>	25
3 METHODEN	26
3.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.1.1 <i>Vorbereitung von Geräten und Lösungen</i>	26
3.1.2 <i>Anzucht und Lagerung von E. coli-Stämmen</i>	26
3.1.3 <i>Transformation von E. coli</i>	26
3.1.4 <i>Absterbekurven von E. coli</i>	27
3.1.5 <i>Wachstumskurven von E. coli</i>	28

3.1.6	<i>Entsorgung von Mikroorganismen</i>	28
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
3.2.1	<i>Isolierung von chromosomaler DNA oder RNA aus E. coli</i>	28
3.2.2	<i>Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen</i>	29
3.2.3	<i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	29
3.2.4	<i>Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR</i>	29
3.2.5	<i>Kolonie-PCR</i>	30
3.2.6	<i>Gerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten mittels OE-PCR</i>	30
3.2.7	<i>Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus E. coli im analytischen Maßstab</i>	31
3.2.8	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	31
3.2.9	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	31
3.2.10	<i>Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen</i>	31
3.2.11	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	32
3.2.12	<i>DNA-Sequenzierung</i>	32
3.2.13	<i>Modifikation des E. coli-Genoms durch homologe Rekombination</i>	32
3.2.14	<i>Gentransfer mittels P1-Transduktion</i>	35
3.2.15	<i>Selektion von spezifischen Aptameren (SELEX)</i>	36
3.2.16	<i>RT-PCR</i>	38
3.2.17	<i>In vitro Transkription von dsDNA</i>	39
3.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	39
3.3.1	<i>Herstellung von Proben für vergleichende Proteomanalysen</i>	39
3.3.2	<i>Expression von Proteinen im analytischen Maßstab</i>	39
3.3.3	<i>Präparative Expression von ybiB, seinen Varianten und aatrpD2</i>	40
3.3.4	<i>Metallchelataffinitätschromatographie</i>	41
3.3.5	<i>StrepTactin-Affinitätschromatographie</i>	42
3.3.6	<i>Ionenaustauschchromatographie</i>	43
3.3.7	<i>Heparinchromatographie</i>	44
3.3.8	<i>Expression und Reinigung von YbiB Varianten unter Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure</i>	44
3.3.9	<i>Photoinduzierte Quervernetzung von YbiB mit einzelsträngigen Nukleinsäuren über pBPA</i> 46	46
3.3.10	<i>Dialyse von Proteinlösungen</i>	47
3.3.11	<i>Einkonzentrieren von Proteinlösungen</i>	48
3.3.12	<i>Lagerung von gereinigten Proteinen</i>	48
3.3.13	<i>Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen</i>	48
3.3.14	<i>Co-Immunpräzipitation</i>	48
3.4	ANALYTISCHE METHODEN	49
3.4.1	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie</i>	49
3.4.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	51
3.4.3	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	51
3.4.4	<i>Färbung von SDS Gelen mit Coomassie Brilliant Blue G250</i>	52
3.4.5	<i>Silberfärbung von SDS Gelen</i>	52
3.4.6	<i>Western blot</i>	52
3.4.7	<i>Immundetektion von Proteinen</i>	53

3.4.8	<i>Expressionsanalyse von ybiB</i>	54
3.4.9	<i>In vivo Formaldehyd crosslinking</i>	54
3.4.10	<i>Nukleosid-Präparation für HPLC-Analytik</i>	55
3.4.11	<i>High performance liquid chromatography (HPLC)</i>	56
3.4.12	<i>Messung der Bindung von YbiB und aaTrpD2 an Nukleinsäuren</i>	57
3.4.13	<i>Phylogenetische Analysen verschiedener Proteine</i>	62
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	63
4.1	ALLGEMEINE CHARAKTERISIERUNG DER TRPD2-PROTEINE	63
4.1.1	<i>Bioinformatische Analyse der TrpD2-Proteinfamilie</i>	63
4.1.2	<i>Genomischer Kontext und Regulation in E. coli</i>	66
4.1.3	<i>Vergleichende Proteomanalyse von E. coli</i>	67
4.1.4	<i>Kristallisation und Strukturanalyse von YbiB</i>	71
4.2	ANALYSE DER NUKLEINSÄUREBINDUNG AN TRPD2-PROTEINE	74
4.2.1	<i>Untersuchungen zur Affinität, Stöchiometrie und Spezifität</i>	75
4.2.2	<i>Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Bindungseigenschaften von YbiB</i>	80
4.2.3	<i>Untersuchung der Sequenzspezifität von YbiB durch SELEX</i>	84
4.3	KRISTALLISATION VON YBI B IM KOMPLEX MIT NUKLEINSÄUREN	91
4.3.1	<i>Strategie</i>	91
4.3.2	<i>Auswahl und Evaluierung der YbiB-pBPA Varianten</i>	92
4.3.3	<i>Präparative Reinigung des Komplexes zur Kristallisation</i>	94
4.4	FUNKTIONSANALYSE VON YBI B	97
4.4.1	<i>Suche nach Interaktionspartnern</i>	98
4.4.2	<i>Ansätze zur Funktionsaufklärung in vitro</i>	100
4.4.3	<i>In vivo Formaldehyd crosslinking von Nukleinsäuren an YbiB und deren Analyse</i>	102
4.4.4	<i>Wachstumsverhalten verschiedener E. coli-Stämme unter mutagenen Bedingungen</i>	108
5	ABSCHLIEßENDE DISKUSSION	115
5.1	NUKLEINSÄUREBINDUNG AN YBI B	115
5.2	STRUKTUR UND EVOLUTION DER TRPD2-ENZYME	116
5.3	PUTATIVE FUNKTION DER TRPD2-PROTEINE	118
5.4	EVOLUTIONÄRE IMPLIKATIONEN	121
6	LITERATUR	123
7	ANHANG	134
7.1	BINDUNGSSSTUDIEN VON YBI B-VARIANTEN MIT EINEM 12B DT-OLIGONUKLEOTID DURCH SPR ...	134
7.2	HPLC-ANALYSE VON STANDARDNUKLEOSIDEN	135
7.3	WACHSTUMSANALYSE VERSCHIEDENER E. COLI DM49-VARIANTEN	135
DANKSAGUNG		137
EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG		139

TAGUNGSBEITRÄGE.....	140
----------------------	-----

Abbildungen

ABBILDUNG 1.1: ENTWICKLUNG DER ANZAHL DER EINTRÄGE IN VERSCHIEDENEN DATENBANKEN SEIT 1997.	3
ABBILDUNG 1.2: REAKTION DER ANTHRANILAT-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (TRPD).	5
ABBILDUNG 1.3: BÄNDERDARSTELLUNG VON TRPD AUS <i>SULFOLOBUS SOLFATARICUS</i> (PDB: 1ZYK) MIT DEN GEBUNDENEN SUBSTRATEN ANTHRANILAT (AA-I UND AA-II) UND PRPP.	6
ABBILDUNG 1.4: REAKTION DER NP-II-ENZYME AM BEISPIEL DER THYMIDIN-NUKLEOSID-PHOSPHORYLASE.	7
ABBILDUNG 1.5: STRUKTURELLER VERGLEICH DER THYMIDIN-NUKLEOSID-PHOSPHORYLASE UND TRPD.	7
ABBILDUNG 1.6: REGULATION DER SOS-ANTWORT IN <i>E. COLI</i> DURCH ZUSAMMENWIRKEN VON LEXA UND RECA.	9
ABBILDUNG 3.1: HERSTELLUNG EINES <i>E. COLI</i>-STAMMS MIT GENOMISCHEN MODIFIKATIONEN DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION.	33
ABBILDUNG 3.2: HERSTELLUNG EINES <i>E. COLI</i>-STAMMS MIT GENOMISCHEM SSTRPD AN DER STELLE VON YBIB DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION.	34
ABBILDUNG 3.3: SELEKTION VON APTAMEREN DURCH SELEX.	36
ABBILDUNG 3.4: PRINZIP DER METHODE FÜR DEN EINBAU NICHTNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN VIVO.	45
ABBILDUNG 3.5: REAKTIONSMECHANISMUS DES PHOTOINDUZIERTEN CROSSLINKING ÜBER PBPA.	47
ABBILDUNG 3.6: ANORDNUNG DER KOMPONENTEN IN DER BLOT-APPARATUR.	53
ABBILDUNG 3.7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER INTERAKTIONSMESSUNG MIT SPR.	60
ABBILDUNG 4.1: PHYLOGENETISCHE ANALYSE VON VERTRETERN DER TRPD-, TRPD2- UND NP-II-PROTEINFAMILIEN.	64
ABBILDUNG 4.2: STRUKTURBASIERTES SEQUENZALIGNMENT VON YBIB AUS <i>E. COLI</i> (ECYBIB, STRUKTUR: ABBILDUNG 4.7), <i>S. SOLFATARICUS</i> TRPD (SSTRPD, PDB: 1O17) UND <i>E. COLI</i> THYMIDIN NP (ECTNP, PDB: 1AZY).	65
ABBILDUNG 4.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON YBIB UND SEINER UMGEBUNG IM <i>E. COLI</i> GENOM.	66
ABBILDUNG 4.4: EXPRESSIONSANALYSE VON YBIB UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN DURCH WESTERN BLOT.	67
ABBILDUNG 4.5: ABLAUF EINER VERGLEICHENDEN PROTEOMANALYSE MIT 2D-GELEKTROPHORESE.	68
ABBILDUNG 4.6: VERGLEICHENDE PROTEOMANALYSE VON <i>E. COLI</i> MG1655 WILDTYP UND MG1655 ΔYBIB.	69
ABBILDUNG 4.7: BÄNDERMODELL DES DIMEREN YBIB UND SUPERPOSITIONIERUNG MIT TRPD AUS <i>SULFOLOBUS SOLFATARICUS</i>.	72

ABBILDUNG 4.8: OBERFLÄCHENDARSTELLUNG VON YBiB MIT FARBLICH MARKIERTEN KONSERVIERTEN RESIDUEN.....	73
ABBILDUNG 4.9: STRUKTUR VON YBiB MIT MODELLIERTEM DNA-EINZELSTRANG (STUTZ, 2007).....	74
ABBILDUNG 4.10: ELECTRO MOBILITY SHIFT ASSAY VON YBiB (A) UND TRPD AUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE (B).	75
ABBILDUNG 4.11: BINDUNGSKURVEN VON OLIGONUKLEOTIDEN AN YBiB.....	76
ABBILDUNG 4.12: EINFLUSS VON PHOSPHAT AUF DIE INTERAKTION VON YBiB MIT EINEM 22 B DT OLIGONUKLEOTID.....	78
ABBILDUNG 4.13: VERGLEICH DER BINDUNG VON ssRNA UND ssDNA AN YBiB.....	79
ABBILDUNG 4.14: VERGLEICH DER BINDUNG VON ZWEI ssDNA-OLIGONUKLEOTIDEN AN YBiB UND AATRPD2.....	80
ABBILDUNG 4.15: BÄNDERMODELL VON YBiB MIT MARKIERUNG DER GEGEN ALANIN AUSGETAUSCHTEN AMINOSÄUREN.	81
ABBILDUNG 4.16: ANALYSE DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON YBiB WT (A) UND YBiB Y207A (B) AN EIN 12 B DT-OLIGONUKLEOTID MIT SPR.....	82
ABBILDUNG 4.17: ANALYSE DER SELEX-ANREICHERUNG IN NEUN SELEKTIONSRUNDEN.....	86
ABBILDUNG 4.18: ANALYSE DER SELEX-ANREICHERUNG AUS DER D3-BIBLIOTHEK BIS SELEKTIONSRUNDE 12.....	87
ABBILDUNG 4.19: MULTIPLES SEQUENZALIGNMENT DER AUS DEN BEIDEN SELEX EXPERIMENTEN ISOLIERTEN VARIANTEN.	88
ABBILDUNG 4.20: BESTIMMUNG DER AFFINITÄT ISOLIERTER ssRNA-SEQUENZEN FÜR YBiB DURCH FILTERBINDUNG.	89
ABBILDUNG 4.21: BESTIMMUNG DER AFFINITÄT ISOLIERTER ssDNA-SEQUENZEN FÜR YBiB DURCH FILTERBINDUNG.	90
ABBILDUNG 4.22: LAGE DER GEGEN PBPA AUSGETAUSCHTEN RESIDUEN IN YBiB.	93
ABBILDUNG 4.23: CROSSLINK DER YBiB-VARIANTEN MIT EINEM 12 B DT-OLIGONUKLEOTID.	94
ABBILDUNG 4.24: OPTIMIERTE EXPRESSION UND REINIGUNG VON YBiB H204pBPA ÜBER METALLCHELAT-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.	95
ABBILDUNG 4.25: ABLAUF DER REINIGUNG DES QUERVERNETZTEN YBiB-DNA-KOMPLEXES.	96
ABBILDUNG 4.26: REINIGUNG DES KOMPLEXES AUS YBiB-H204pBPA MIT QUERVERNETZTEM 12 B DT-OLIGONUKLEOTID.	96
ABBILDUNG 4.27: OBERFLÄCHENSTRUKTUR VON <i>E. COLI</i> GRE A (PDB: 1GRJ).	99
ABBILDUNG 4.28: EXPRESSIONSANALYSE VON YBiB-FLAG DURCH WESTERN BLOT.	99
ABBILDUNG 4.29: MÖGLICHER ABLAUF DER REPARATUR VON DNA-SCHÄDIGUNGEN DURCH YBiB.	101
ABBILDUNG 4.30: ABLAUF DES <i>IN VIVO</i> FORMALDEHYD CROSSLINKS MIT ANSCHLIEßENDER ANALYTIK.	102
ABBILDUNG 4.31: REINIGUNG VON YBiB NACH <i>IN VIVO</i> QUERVERNETZUNG MIT FORMALDEHYD.	103
ABBILDUNG 4.32: ANALYSE DES <i>IN VIVO</i> CROSSLINKS DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT EINER HEPARINSÄULE.	104
ABBILDUNG 4.33: HPLC-ANALYSE DER MIT YBiB UND DEOA IN <i>E. COLI</i> QUERVERNETZTEN NUKLEINSÄUREN.	105
ABBILDUNG 4.34: EXPRESSIONSANALYSE VON GENOMISCH CODIERTEM YBiB UND ssTRPD IN <i>E. COLI</i> MG1655 ZELLEN.	106

ABBILDUNG 4.35: HPLC-ANALYSE DER MIT GENOMISCH CODIERTEM YBIB UND SSTRPD IN <i>E. COLI</i> QUERVERNETZTEN NUKLEINSÄUREN.....	106
ABBILDUNG 4.36: ANALYSE DER MNASE-BEHANDLUNG VON YBIB H204PBPA MIT KOVALENT VERKNÜPFTEM 50 B DT-OLIGONUKLEOTID.	107
ABBILDUNG 4.37: ÜBERLEBENSRATE VON <i>E. COLI</i> MG1665 ΔYBIB (SCHWARZ) UND <i>E. COLI</i> MG1655 (ROT) UNTER DEM EINFLUSS VERSCHIEDENER MUTAGENE.....	109
ABBILDUNG 4.38: EXPRESSIONSANALYSE VON YBIB UND DEOA IN <i>E. COLI</i> DM49-ZELLEN MITTELS WESTERN BLOT.....	110
ABBILDUNG 4.39: WACHSTUMSKURVEN VON <i>E. COLI</i> DM49 pTNA_YBIB UND KONTROLLEN IN LB_{AMP}-MEDIUM.....	111
ABBILDUNG 4.40: WACHSTUMSANALYSE VON <i>E. COLI</i> DM49 pTNA_YBIB UND KONTROLLEN UNTER ZUSATZ VON MITOMYCIN C.....	111
ABBILDUNG 4.41: WACHSTUMSANALYSE VON <i>E. COLI</i> DM49 pTNA_YBIB UND DER KONTROLLE DM49 pTNA_DEOA UNTER ZUSATZ VON MMS UND H₂O₂.....	112
ABBILDUNG 4.42: EXPRESSIONSANALYSE VERSCHIEDENER YBIB VARIANTEN IN <i>E. COLI</i> DM49-ZELLEN DURCH WESTERN BLOT.....	114
ABBILDUNG 5.1: MÖGLICHE BINDUNGSKONFORMATION VON ZWEI EINZELSTRÄNGEN SIMULTAN AN DAS YBIB-DIMER.....	117
ABBILDUNG 5.2: SCHEMATISCHER ABLAUF DER MÖGLICHEN REPARATUR BESCHÄDIGTER dsDNA DURCH YBIB.....	118
ABBILDUNG 5.3: MÖGLICHE SCHÄDIGUNG VON DNA DURCH ALKYLIERUNG MIT MITOMYCIN C.	119
ABBILDUNG 7.1: ANALYSE DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON YBIB E54A (A), E58A (B), H204A (C), L224A (D), E229A (E) UND E231A (F) AN EIN 12 B DT-OLIGONUKLEOTID MIT SPR.....	134
ABBILDUNG 7.2: HPLC-ANALYSE DER VIER NATÜRLICH VORKOMMENDEN RIBONUKLEOSIDE AUF EINER BISCHOFF KROMASIL100 C18 5 μM, 250 x 4 MM SÄULE.....	135
ABBILDUNG 7.3: HPLC-ANALYSE DER VIER NATÜRLICH VORKOMMENDEN DESOXYRIBONUKLEOSIDE (A) UND RIBONUKLEOSIDE (B) AUF EINER PHENOMENEX LUNAPPF 3 μM, 150 x 3 MM SÄULE.135	
ABBILDUNG 7.4: WACHSTUMSANALYSE VON <i>E. COLI</i> DM49-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN YBIB-VARIANTEN UND KONTROLLEN UNTER ZUSATZ VON MITOMYCIN C.	136

Tabellen

TABELLE 2.1: ÜBERSICHT DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME	13
TABELLE 2.2: ÜBERSICHT DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN PLASMIDE.....	14
TABELLE 2.3: ÜBERSICHT DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.	17
TABELLE 3.1: BEDINGUNGEN BEI DEN VERSCHIEDENEN SELEX-RUNDEN MIT ssDNA UND ssRNA.	38
TABELLE 3.2: MOLEKÜLARGEWICHT (M_R), MOLARER EXTKINTIONSKOEFFIZIENT (ε₂₈₀) UND SPEZIFISCHER EXTKINTIONSKOEFFIZIENT (0,1% A₂₈₀) DER VERWENDETEN PROTEINE (INKL. TAG).	50
TABELLE 3.3: GRADIENTEN ZUR TRENNUNG VON NUKLEOSIDEN.....	57
TABELLE 4.1: DIFFERENZIELL HERGESTELLTE PROTEINE VON <i>E. COLI</i> MG1655 WT UND MG1655 ΔYBIB. ..	70

TABELLE 4.2: DISSOZIATIONSKONSTANTEN UND STÖCHIOMETRIEN DER BINDUNG VON VERSCHIEDENEN OLIGONUKLEOTIDEN AN YBiB UND AATrpD2, GEMESSEN MIT FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE UND FLUORESZENZPOLARISATION.....	77
TABELLE 4.3: ERGEBNIS DER FLUORESZENZTITRATION VON YBiB-VARIANTEN MIT EINEM 12 B dT-OLIGONUKLEOTID.....	82
TABELLE 4.4: GESCHWINDIGKEITSKONSTANTE K_d FÜR DIE DISSOZIATION VERSCHIEDENER YBiB-VARIANTEN VON EINEM IMMOBILISIERTEN 12 B dT-OLIGONUKLEOTID.....	84
TABELLE 4.5: RELATIVE FITNESS VERSCHIEDENER <i>E. coli</i> DM49 STÄMME GEGENÜBER MITOMYCIN C ..	113

Formeln

FORMEL 1: BERECHNUNG DES MOLAREN EXTINKTIONS Koeffizienten E_{280}	49
FORMEL 2: BERECHNUNG DES SPEZIFISCHEN EXTINKTIONS Koeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$	49
FORMEL 3: BERECHNUNG DER PROTEINKONZENTRATION MIT HILFE DES SPEZIFISCHEN EXTINKTIONS Koeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$	50
FORMEL 4: BERECHNUNG DER PROTEINKONZENTRATION C [MG/ML] NACH BRADFORD	51
FORMEL 5: ABHÄNGIGKEIT DER GEMESSENEN FLUORESZENZ VON DER ZUTITRIERTEN LIGANDENMENGE	58

Abkürzungen

Å	Ångström 10^{-10} m
A	Absorption; Ampere
AA	Anthranilat
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
bp	Basenpaare
c	Konzentration
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
d	Schichtdicke der Küvette

Da	Dalton [g/mol]
d. h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N = A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EtBr	Ethidiumbromid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KP	Kaliumphosphat Puffer
LB	Luria-Bertani-Medium, Vollmedium für <i>E. coli</i>
LS	Längenstandard
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
MW	Molekulare Masse
N-terminal	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
NP	Natriumphosphat Puffer
nt	Nukleotide
OD _x	optische Dichte bei x nm
OE	<i>overlap extension</i>
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextrakts)
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
pAzF	para-Azidophenylalanin
pBPA	para-Benzoylphenylalanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PRPP	1'-Phosphoribosyl-5'-pyrophosphat
r.m.s.d.	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
T _A	annealing Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T _M	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
U	Unit, 1 U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt
Ü	Überstand (lösliche Fraktion eines Zellextrakts)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen
λ	Wellenlänge

Zusammenfassung

Die funktionelle Charakterisierung von unbekannten Proteinen ist eine der wichtigsten Aufgaben des Post-Genom-Zeitalters. Auch wenn bereits erfolgversprechende computergestützte Verfahren zur Funktionszuweisung entwickelt wurden, sind biochemische und molekulargenetische Analysen weiterhin unumgänglich, um die physiologische Aufgabe solcher Proteine zweifelsfrei zu bestimmen. Die funktionelle Annotation kann dabei durch die Einbeziehung von Vorinformationen wesentlich vereinfacht werden. So kann man sich beispielsweise zunutze machen, dass sich neue Proteinfunktionen oft durch Genduplikation und anschließende Diversifikation, ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer, entwickelt haben. Von einem bereits gut charakterisierten homologen Protein kann also auf eine mögliche Funktion des Untersuchungsobjekts geschlossen werden.

Ein Beispiel für solche Proteine unbekannter Funktion ist die TrpD2-Familie. Diese Proteine sind nahe verwandt zur Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD), einem homodimeren Enzym der Tryptophan-Biosynthese. Eine entferntere Verwandtschaft besteht außerdem zu den Nukleosid-Phosphorylasen der Klasse II (NP-II), die eine wichtige Rolle im Nukleotid-*salvage-pathway* spielen. Bisher sind etwa 140 Vertreter der TrpD2-Proteine bekannt, die ausschließlich in Bakterien zu finden sind. Sie zeigen im Durchschnitt etwa 17 % Sequenzidentität zu TrpD und 10 % Sequenzidentität zu NP-II Enzymen, können aber deren Reaktionen nicht katalysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der TrpD2-Proteinfamilie mit Methoden der Bioinformatik, Strukturbioologie, Biochemie, Mikrobiologie und Genetik analysiert. Wegen der einfachen Handhabung und der genetischen Zugänglichkeit wurden die meisten Untersuchungen am TrpD2-Protein aus *E. coli*, YbiB, durchgeführt. Zunächst wurde dessen Röntgenstruktur in Kooperation mit Prof. Olga Mayans gelöst. Dabei zeigte das Protein eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu TrpD und ebenso eine homodimere Quartärstruktur. Allerdings enthält YbiB zusätzlich eine positiv geladene Oberflächenfalte, die in der TrpD-Struktur fehlt. Die Lysin- und Argininresiduen in dieser Falte sind in der gesamten TrpD2-Proteinfamilie strikt konserviert. Aus der Form dieser Vertiefung und der Anordnung der positiven Ladungen wurde geschlossen und später experimentell bestätigt, dass Nukleinsäuren von YbiB gebunden werden können. Direkt an diese Nukleinsäurebindestelle grenzt eine Grube mit dem postulierten aktiven Zentrum an, in der sich gehäuft weitere vollständig konservierte Residuen befinden. Die genaue strukturelle Kenntnis des YbiB-Nukleinsäure-Komplexes könnte die Funktionsaufklärung von YbiB maßgeblich unterstützen. Nachdem alle konventionellen Ansätze zur Cokristallisation fehlgeschlagen waren, wurde eine Methode zur

kovalenten Fixierung und Reinigung des Komplexes durch Einsatz von nichtnatürlichen Aminosäuren entwickelt. Darauf aufbauend können nun neue Kristallisationsansätze mit höherer Erfolgswahrscheinlichkeit durchgeführt werden.

Die Bindung von einzelsträngigen Oligonukleotiden an YbiB und das TrpD2-Protein aus *Aquifex aeolicus* wurde mittels *electro mobility shift assays* (EMSA), Fluoreszenzspektroskopie, Fluoreszenzpolarisation und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) unabhängig voneinander bestätigt und quantifiziert. Für die Bindung von einzelsträngigen DNA-Fragmenten an YbiB ergaben sich K_D -Werte zwischen 6 und 60 nM, ohne erkennbare Sequenzspezifität. Einzelsträngige RNA wird vom Protein gleichermaßen gut gebunden, dagegen ist die Affinität für doppelsträngige DNA um ca. zwei Größenordnungen verringert. Durch SELEX konnten Aptamere isoliert werden, die eine erhöhte Affinität zu YbiB zeigen. Ihre derzeit laufende Charakterisierung wird zeigen, ob die gefundenen Sequenzmotive tatsächlich eine funktionelle Relevanz haben.

Das *ybiB*-Gen ist, wie alle *trpD2*-Gene, außerhalb des Tryptophan-Operons zu finden und bildet in *E. coli* ein LexA-kontrolliertes Operon mit der DNA-Helikase *dinG*. Dies, wie auch vergleichende Proteomanalysen in *E. coli*, deutet auf eine Beteiligung des Proteins an der SOS-Antwort und somit der Reaktion auf DNA-schädigende Bedingungen hin. Die gezielte Expression von *ybiB* in einem SOS-Antwort-defizienten *E. coli*-Stamm führte spezifisch zu einer gesteigerten Resistenz der Zellen gegenüber dem zytotoxischen und mutagenen Agens Mitomycin C, nicht aber gegenüber anderen mutagenen Stoffen. Bei YbiB und der gesamten TrpD2-Proteingruppe handelt es sich also wahrscheinlich um eine neue Klasse von Reparaturenzymen, deren Mitglieder Mitomycin C-typische Schäden, wie z. B. Strang-Quervernetzungen erkennt. Die evolutionäre Verwandtschaft mit den Nukleosid-Phosphorylasen lässt vermuten, dass die TrpD2-Enzyme quervernetzte Basen phosphorolytisch aus dem Genom entfernen könnten. Diese Hypothese soll nun durch *in vitro* Experimente mit Mitomycin C-geschädigten Nukleinsäuren überprüft werden.

1 Einleitung

1.1 Konsequenzen des Genomzeitalters

Die technische und methodische Optimierung des DNA-Sequenzierungsprozesses hat seit 1995 zu einem annähernd exponentiellen Wachstum der entschlüsselten Genomsequenzen geführt. So enthält die TrEMBL-Datenbank gegenwärtig (26. Juli 2011) über 16 Millionen Gensequenzen, was einem mehr als hundertfachen Zuwachs seit 1997 entspricht (**Abbildung 1.1**).

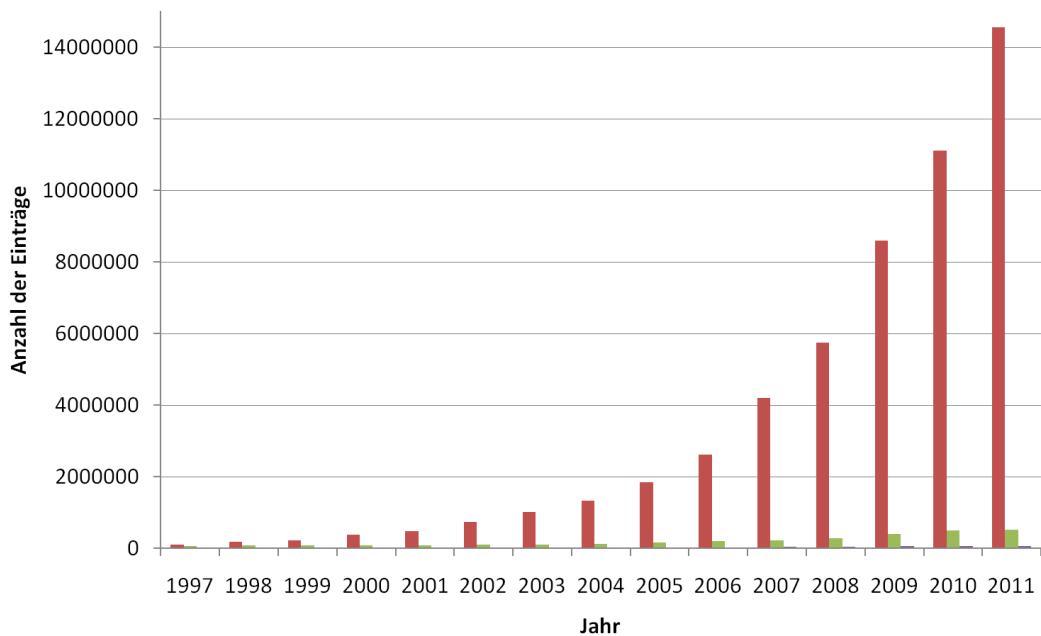


Abbildung 1.1: Entwicklung der Anzahl der Einträge in verschiedenen Datenbanken seit 1997. Die roten Balken zeigen die Zunahme der Einträge in die TrEMBL-Datenbank von 1997 bis 2011. Die grünen und violetten Balken symbolisieren die Einträge der UniProt- bzw. PDB-Datenbank.

Erkenntnisse über die codierten Proteinfunktionen sind jedoch deutlich schwieriger zu erlangen, nachdem ihre Aufklärung bei weitem nicht mit der gegenwärtigen Geschwindigkeit der Genomsequenzierung Schritt halten kann. So enthält die manuell überprüfte, nicht redundante und wissensbasierte UniProt-Proteindatenbank nur ca. 500 000 Einträge (**Abbildung 1.1**). Für lediglich 27 % der dortigen Einträge ist die Expression tatsächlich auf Protein- oder Transkriptionsebene nachgewiesen, für 70 % ist die Existenz des Proteins nur aufgrund von Homologie vorhergesagt. Nur ca. 120 000 Proteine wurden bisher also von Wissenschaftlern eingehender untersucht. Die strukturelle Analyse der Genprodukte deckt, mit 70 000 Einträgen in der pdb-

Datenbank, nur noch eine verschwindend kleinen Anteil der sequenzierten *open readings frames* (ORFs) ab (**Abbildung 1.1**). Diese Daten zeigen deutlich die Begrenztheit unseres gegenwärtigen Wissens über die natürlich vorkommende Vielfalt an Proteinfunktionen. Es ist folglich nicht verwunderlich, dass die automatisierte Annotation neu sequenziertener Gene, lediglich basierend auf der Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion, fehleranfällig ist (Gerlt and Babbitt, 2000). So legen selbst vorsichtige Schätzungen im Moment nahe, dass mindestens einem Drittel aller sequenzierten Gene eine ungewisse, unbekannte oder falsche Funktion zugewiesen wurde (Friedberg et al., 2006). Es gilt also, noch eine immense funktionelle, regulatorische und metabolische Diversität zu entdecken, bis ein umfassendes Verständnis der zellulären Vorgänge, ausgehend von der Genomsequenz eines Organismus, erlangt werden kann. Die korrekte Annotation dieser immensen Zahl von Proteinen stellt somit eine der größten Herausforderungen für die Biologie im Post-Genom-Zeitalter dar.

Ein gängiger Ansatz zur Funktionszuweisung ist es, systematisch *knockouts* von uncharakterisierten Genen in einem Organismus zu erstellen und anschließend diesen Stämmen einen Phänotypen zuzuordnen. Unterschiede z.B. im Auftreten einzelner Metabolite in Vergleich zum Wildtyp erlauben es dann, die katalysierte Reaktion des untersuchten Proteins zu identifizieren (Guldan et al., 2011). Dies kann gesteigert werden zum sogenannten *metabolomic profiling*, bei dem mittlerweile sogar die Zusammensetzung des gesamten Metaboloms von *knockout*- und Wildtyp-Zellen analysiert wird (Beckonert et al., 2007; Saito et al., 2009; de Carvalho et al., 2010). Die Annotation von uncharakterisierten ORFs kann auch durch biochemisches *screening* nach bereits bekannten oder leicht modifizierten, bekannten katalytischen Aktivitäten erfolgen (Ballschmiter et al., 2006). Auch mit Hilfe von *in silico ligand screening* konnten bereits einige Enzymfunktionen aufgeklärt werden. Dafür sind jedoch eine Röntgenstruktur des betreffenden Proteins (Hermann et al., 2007) oder ein sehr präzises Homologiemodell (Song et al., 2007), sowie strukturelle Vorkenntnisse über die möglichen Substrate notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein integrativer Ansatz zur funktionellen Annotation von Enzymen angewendet. Dabei sollte durch die Kombination von bioinformatischen Analysen und strukturellen Untersuchungen, sowie Methoden der Genetik, Mikrobiologie und Biophysik die umfassende Charakterisierung eines unbekannten *open reading frames* durchgeführt werden. Bei der Auswahl von geeigneten Proteinen wurde sich zusätzlich auf evolutionär nahe Verwandte zu den in der Arbeitsgruppe Sterner gut charakterisierten Enzymen der Tryptophan- oder Histidinbiosynthese beschränkt. Aus solchen evolutionären Beziehungen lassen sich oft erste Ideen über die katalysierte Reaktion oder die möglichen Substrate des unbekannten Proteins ableiten (Chiang et al., 2008). So war durch bioinformatische Analysen auch das Studienobjekt dieser Arbeit, die funktionell uncharakterisierte Proteingruppe TrpD2, identifiziert

worden (Dr. Patrick Babinger), die eine hohe Ähnlichkeit zu den Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) zeigt.

1.2 Die TrpD- und NP-II-Proteinfamilien

Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) katalysieren den zweiten Schritt der Tryptophan-Biosynthese, die irreversible Kondensation von Anthranilat (AA) und 5'-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP) zu N-5'-Phosphoribosylanthranilat (PRA) und Pyrophosphat (PP_i) (**Abbildung 1.2**).

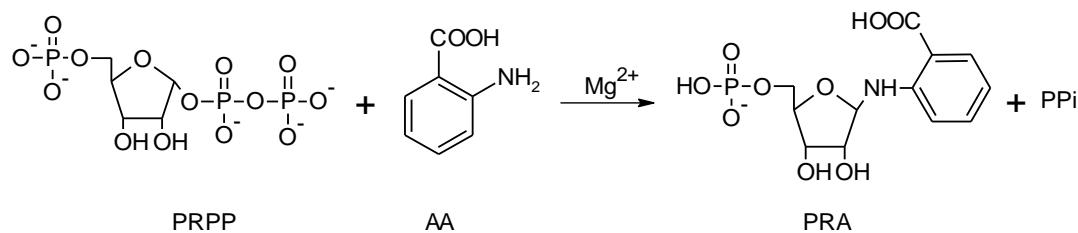


Abbildung 1.2: Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD).

Magnesium ist dabei ein essentieller Kofaktor der Reaktion, da nur der Komplex aus PRPP und Magnesium (PRPP- Mg^{2+}) vom Enzym umgesetzt werden kann (Schlee et al., 2009). Beim nukleophilen Angriff des Stickstoffs des Anthranilat am C1-Atom von PRPP kommt es zur Abspaltung des aktivierte Phosphodiester Pyrophosphat (PP_i), wodurch die Rückreaktion des Produkts PRA verhindert wird.

Alle bisher gefundenen *trpD*-Gene sind Teil des Tryptophanbiosynthese-Operons (Yanofsky, 1999). Die Proteine liegen, bis auf sehr wenige Ausnahmen, stets als Homodimere vor (Schwab, 2010). Die Röntgenstruktur von TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* (Mayans et al., 2002) zeigte, dass jede Untereinheit jeweils aus einer kleineren N-terminalen α -helikalen Domäne (α 1- α 4, α 8, α 9) und einer größeren C-terminalen α / β Domäne mit einem zentralen β -Faltblatt besteht (**Abbildung 1.3**).

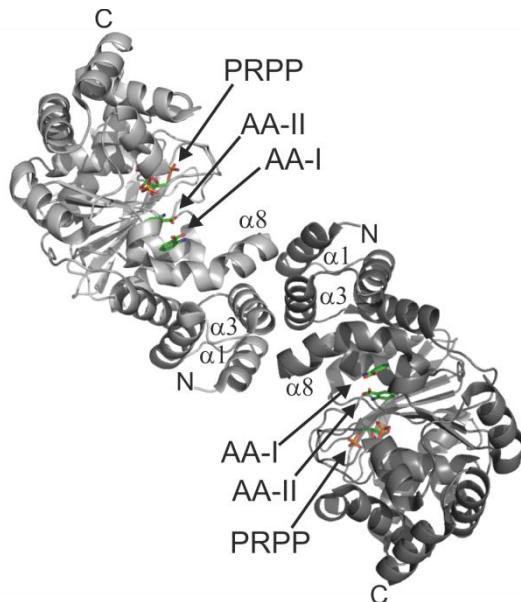


Abbildung 1.3: Bänderdarstellung von TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* (pdb: 1ZYK) mit den gebundenen Substraten Anthranilat (AA-I und AA-II) und PRPP. Die beiden Untereinheiten des homodimeren Proteins sind in unterschiedlichen Grautönen gefärbt. Die Helices α_1 , α_3 und α_8 bilden dabei die Kontaktfläche aus. N- und C-Termini der Protomere sind gekennzeichnet.

Zwischen den beiden Domänen befindet sich eine Scharnierregion, die deren räumliche Annäherung während der Katalyse ermöglicht (Marino et al., 2006). In diesem Bereich ist das aktive Zentrum des Enzyms lokalisiert. Die Homodimerisierung der Untereinheiten wird durch hydrophobe Interaktionen der α -Helices α_1 , α_3 und α_8 in den N-terminalen Domänen erreicht. Die Dimerisierung scheint ausschließlich der Stabilisierung der Untereinheiten zu dienen. So ergab die Charakterisierung einer künstlich hergestellten, monomeren TrpD-Variante vergleichbare katalytische Parameter wie beim Wildtyp-Enzym, jedoch eine deutlich verringerte Thermostabilität (Schwab et al., 2008).

Die strukturelle Analyse zeigte außerdem, dass es sich bei den TrpD-Enzymen um eine separate Klasse von Phosphoribosyltransferasen (PRTs) handelt, die wenig strukturelle Ähnlichkeit zu den beiden bereits charakterisierten PRT-Klassen aufweist (Kim et al., 2002; Mayans et al., 2002). Zu den bekanntesten Vertretern der Klasse I zählen dabei die Orotat-, Uracil-Phosphoribosyltransferasen (Ozturk et al., 1995; Scapin et al., 1995; Schumacher et al., 2002), während Quinolat- und Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferasen die zweite strukturelle Familie dieser Enzyme repräsentieren (Eads et al., 1997; Cao et al., 2002).

Interessanterweise zeigte sich für TrpD eine ähnliche Faltung wie bei den Nukleosid-Phosphorylasen der Klasse II (NP-II) (Mayans et al., 2002; Marino et al., 2006). Dies belegte die Verwandtschaft der beiden Enzymklassen, was bereits vorher durch Vergleich ausgewählter Sequenzabschnitte postuliert worden war (Mushegian and Koonin, 1994).

Die NP-II-Enzyme katalysieren die reversible phosphorolytische Spaltung von Nukleosiden zu Ribose-1-Phosphat und einer freien Pyrimidinbase (**Abbildung 1.4**).

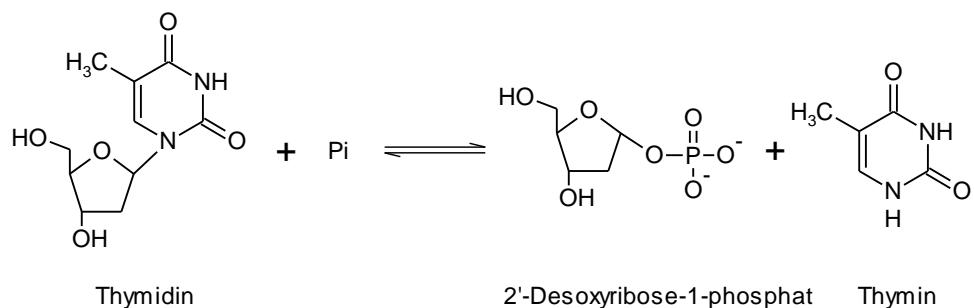


Abbildung 1.4: Reaktion der NP-II-Enzyme am Beispiel der Thymidin-Nukleosid-Phosphorylase.

Dabei akzeptieren einige Vertreter der NP-II-Proteinfamilie sowohl Uridin als auch Thymidin als Substrat, während andere spezifisch nur die Umsetzung von Thymidin katalysieren (Pugmire and Ealick, 2002). Unter physiologischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite des gespaltenen Nukleosids. Diese Proteine nehmen eine wichtige Aufgabe in den *salvage pathways* für Nukleotide ein, da sie aufgrund ihrer Aktivität eine Alternative für die Bereitstellung von Pyrimidinen im Vergleich zur *de novo*-Synthese darstellen.

Strukturen verschiedener NP-II-Enzyme zeigten, dass sie, wie TrpD, aus zwei Domänen bestehen, wobei sich die N-terminalen, α -helikalen Domänen sehr stark ähneln (Walter et al., 1990; Pugmire and Ealick, 1998; Mayans et al., 2002). Die C-terminale α/β -Domäne ist bei den NP-II-Proteinen allerdings aufgrund einer Insertion unbekannter Funktion etwas größer (**Abbildung 1.5**).

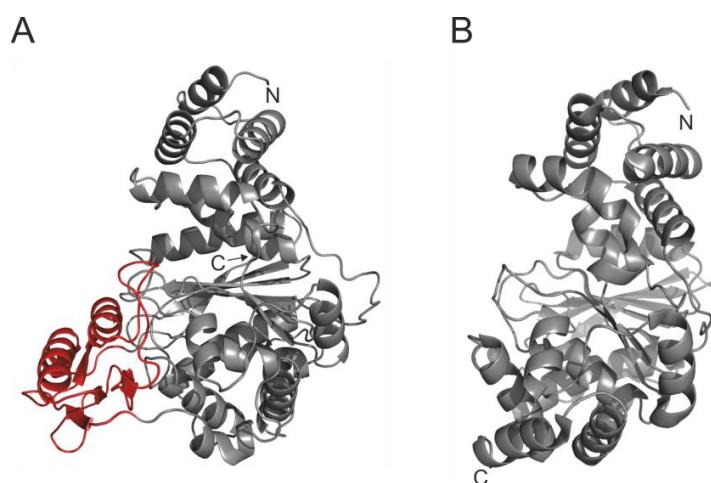


Abbildung 1.5: Struktureller Vergleich der Thymidin-Nukleosid-Phosphorylase und TrpD. (A) Bänderdarstellung einer Untereinheit der dimeren Thymidin-Nukleosid-Phosphorylase aus *E. coli* (pdb: 2TPT). Der zusätzliche Bereich ist rot markiert. (B) Bänderdarstellung einer Untereinheit des dimeren TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* (pdb: 1ZYK). N- und C-Termini der Proteine sind gekennzeichnet.

Die Gesamttopologie beider Enzymfamilien ist sehr ähnlich, so bilden beispielsweise alle bisher untersuchten NP-II-Enzyme ebenfalls homodimere Quartärstrukturen aus (Pugmire et al., 2002). Hier scheint die Dimerisierung jedoch, im Gegensatz zur TrpD-Familie, funktionelle Gründe zu haben. Während der Katalyse treten *hinge*-Bewegungen innerhalb der beiden Untereinheiten auf (Pugmire et al., 1998), so dass in der geschlossenen Konformation des Enzyms vermutlich Interaktionen zwischen der α/β -Domäne eines Protomers und der α -Domäne des anderen Protomers gebildet werden (Pugmire et al., 1998).

1.3 Die SOS-Antwort in *E. coli*

Die Ergebnisse aus durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass *ybiB* zusammen mit *dinG* ein LexA-kontrolliertes Operon bildet und somit vermutlich Teil der SOS-Antwort von *E. coli* ist (siehe 4.1.2). Dabei handelt es sich um die zelluläre Reaktion auf DNA-schädigende Bedingungen, mit dem Ziel, die Integrität des Genoms wieder herzustellen und so das Überleben des Organismus zu sichern (Radman, 1975; Sutton et al., 2000). Die Expression der beteiligten Gene wird durch das Zusammenwirken der beiden Proteine LexA und RecA kontrolliert, wobei LexA durch Bindung an eine Operatorsequenz in der Nähe des Transkriptionsstarts unter normalen Wachstumsbedingungen als Repressor wirkt. RecA ermöglicht die Induktion der SOS-Antwort durch Stimulation der autoproteolytischen Spaltung von LexA (Little, 1984) und seiner damit verbundenen Dissoziation vom regulatorischen Sequenzbereich. Diese Aktivität besitzt RecA allerdings nur in einem ternären Komplex zusammen mit ssDNA und ATP. Die so gebildeten Nukleo-Protein-Filamente stabilisieren eine Konformation von LexA, in der Autoproteolyse möglich ist und beschleunigen so seinen Abbau (Roland et al., 1992). Primäres Signal für die Induktion der SOS-Antwort *in vivo* sind somit ungewöhnlich hohe Mengen an einzelsträngiger DNA, die entweder beim Abbrechen der Replikation an beschädigter DNA als *template* oder durch Doppelstrangbrüche im Genom entstehen. Die Expression von *recA* und *lexA* wird ebenfalls durch den LexA-Repressor kontrolliert, was zu Beginn der SOS-Antwort ein positives *feedback* und eine schnelle Induktion der entsprechenden Gene zur Folge hat. Durch voranschreitende DNA-Reparatur und den erhöhten Mengen an LexA kommt es nach gewisser Zeit wieder zur Repression (**Abbildung 1.6**).

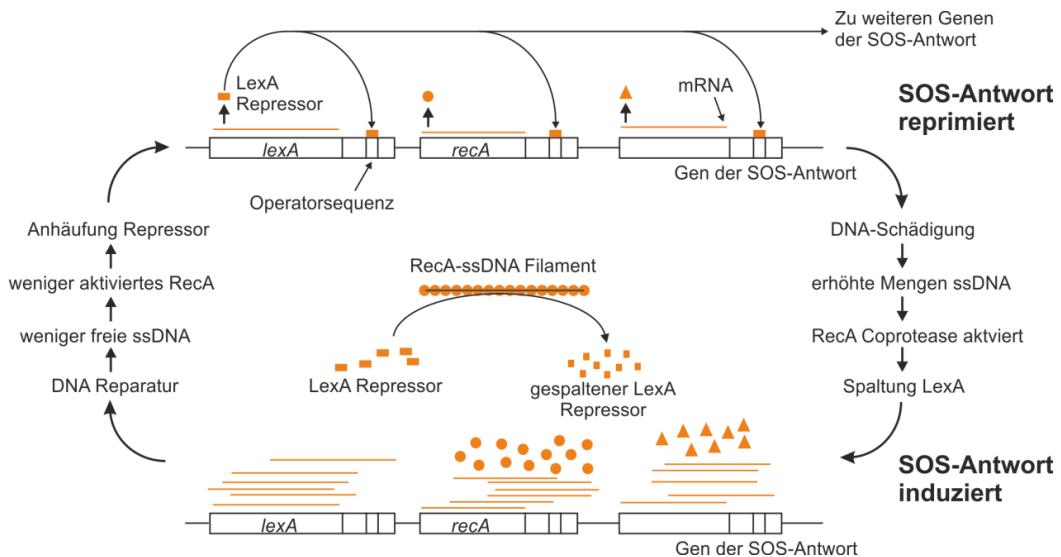


Abbildung 1.6: Regulation der SOS-Antwort in *E. coli* durch Zusammenwirken von LexA und RecA. Adaptiert nach Friedberg et al. (2006).

An der SOS-Antwort sind in *E. coli* mehr als 40 Proteine beteiligt (Fernandez de Henestrosa et al., 2000; Courcelle et al., 2001), deren Menge nach Derepression durch die Affinität von LexA für die verschiedenen Operatorsequenzen und die Stärke der jeweiligen Promotorregionen individuell reguliert werden kann. Für *sulA* kommt es beispielsweise zu einer mehr als 100-fachen Induktion, während bei anderen Genen nur eine 4-fache Zunahme der Expression gefunden wurde (Courcelle et al., 2001). Durch unterschiedliche Bindungsstärken von LexA an die Operatorsequenzen kann auch der Induktionszeitpunkt einzelner Gene während der SOS-Antwort eingestellt werden.

Um für die Wiederherstellung des Genoms mehr Zeit zu schaffen, wird im Verlauf der SOS-Antwort die Zellteilung durch Expression von *sulA* vorübergehend inhibiert. Die Reparatur beschädigter Basen wird durch Induktion der Photolyase und des *nucleotide excision repair*-Systems erheblich beschleunigt. Außerdem werden Gene zur homologen Rekombination exprimiert, die für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, sowie von kollabierten und angehaltenen Replikationsgabeln verantwortlich sind. Dabei nimmt RecA eine zentrale Rolle ein, das so neben seiner Rolle als Induktor der SOS-Antwort auch direkt an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist. Zu einem späteren Zeitpunkt in der SOS-Antwort werden zusätzlich spezielle DNA-Polymerasen der Y-Familie (Ohmori et al., 2001) exprimiert, die sich durch eine geringe Prozessivität und Genauigkeit auszeichnen (Tang et al., 2000). Diese sind allerdings im Gegensatz zu normalen Polymerasen in der Lage, auch beschädigte DNA als *template* zu nutzen und so die Blockaden der Replikation zu überwinden, wobei es zur Einführung von Mutationen ins *E. coli* Genom kommt. Dieser Prozess wird als *translesion synthesis* bezeichnet. Alle drei Systeme können unabhängig voneinander agieren, müssen aber für die Reparatur bestimmter Schäden zusammenwirken, um die korrekte Wiederaufnahme der DNA-Replikation zu erreichen. In *E. coli* werden alle Mechanismen zur DNA-Reparatur durch das RecA-LexA-System kontrolliert, bis auf die *base excision repair*.

Die dafür verantwortlichen DNA-Glycosylasen stellen einen basalen Schutz gegen Beschädigungen des Erbmaterials dar und werden bei gravierenden Schäden durch andere Systeme ergänzt.

Auch in anderen bakteriellen Spezies konnten vergleichbare Systeme zur Induktion verschiedener Gene als Reaktion auf DNA-schädigende Bedingungen identifiziert werden. So wurde durch genetische *screens* in 30 verschiedenen gram-negativen Bakterien mit einem *broad host range* Plasmid bis auf wenige Ausnahmen stets die Repression einer *recA::lacZ*-Fusion unter normalen Wachstumsbedingungen gefunden (Fernandez de Henestrosa et al., 1991). Daneben zeigen auch einige gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* (Love and Yasbin, 1984) und *Bacillus thuringiensis* (Auffray and Boutibonnes, 1987) eine induzierbare Antwort auf DNA-schädigende Bedingungen. Obwohl einige bakterielle Spezies nicht über eine SOS-Antwort zu verfügen scheinen (Black et al., 1998), zeigt die weite Verbreitung deutlich ihre Wichtigkeit bei der Reparatur des Erbmaterials. Mit Rad51 und Dmc1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und RadA aus *Sulfolobus solfataricus* konnten zudem sowohl in Eukaryoten wie auch Archaeen Homologe des RecA-Proteins identifiziert werden, die ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt sind.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische Funktion der uncharakterisierten TrpD2-Proteinfamilie am Beispiel von YbiB aus *E. coli* untersucht werden.

Durch bioinformatische und strukturelle Analysen sollten zunächst Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen YbiB und den nächsten verwandten Proteingruppen TrpD und NP-II herausgearbeitet werden. Im Weiteren sollten Untersuchungen zur Regulation von *ybiB* in *E. coli*, die biochemische Charakterisierung der Bindung an Nukleinsäuren und *in vitro* Tests möglicher Substrate weitere Hinweise auf seine Funktion liefern. Schließlich sollte die phänotypische Charakterisierung verschiedener *E. coli* Stämme in An- und Abwesenheit von *ybiB* eine überzeugende Hypothese über die physiologische Funktion von YbiB ermöglichen.

Parallel sollte versucht werden, den Komplex aus YbiB und ssDNA zu kristallisieren, um seine Struktur mittels Röntgenkristallographie zu lösen und so weitere Hinweise auf die möglichen Substrate von YbiB durch *molecular docking* zu erhalten.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

APPLICHEM GMBH, Darmstadt	HARTMANN ANALYTIC, Braunschweig
BIO101 Inc., Carlsbad, CA, USA	MERCK, Darmstadt
BIORAD LABORATORIES, München	MP BIOMEDICALS, Illkirch, Frankreich
BIOZYM, Hessisch Oldendorf	NATIONAL DIAGNOSTICS, Simerville, USA
BODE CHEMIE, Hamburg	OXOID, Wesel
BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
DIFCO, Dreieich	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
FLUKA, Neu-Ulm	ROTH, Karlsruhe
GE HEALTHCARE, München	SERVA, Heidelberg
GERBU Biotechnik GmbH, Gailberg	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
GIBCO/BRL, Eggestein	VWR, Leuven, Belgien

2.2 Antikörper

Anti-His ₆ , Peroxidase-konjugiert	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Anti-Flag M2	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Anti- <i>mouse</i> -IgG; Peroxidase konjugiert	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
<i>rabbit</i> -Serum	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Anti-Strep monoklonaler Antikörper	QIAGEN, Hilden

2.3 Kits

Gene JET TM Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
CloneJET TM PCR Cloning Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot

Nucleo Spin® Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren
Super Signal West Pico Kit	PIERCE, Rockford, USA
TOPO® TA Cloning® Kit	INVITROGEN, Carlsbad, USA
SuperSignal West Pico	THERMO SCIENTIFIC, Bonn
Chemiluminescent Substrate	

2.4 Enzyme

CIP alkalische Phosphatase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main PROMEGA, Madison, USA
DNA-Polymerasen	
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	PROMEGA, Madison, USA
Pfu DNA-Polymerase	STRATAGENE, La Jolla, USA
Pwo DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
T4-Polynukleotidkinase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
Nuklease P ₁ (aus <i>Penicillium citronum</i>)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Phosphodiesterase I (aus <i>Crotalus atrox</i>)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
DNase I	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
RNase A	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
Superscript II Reverse Transkriptase	INVITROGEN, Carlsbad, USA
T7 RNA Polymerase	PROMEGA, Madison, USA

2.5 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften ¹	Herkunft Referenz	Anmerkung
<i>E. coli</i> DH5 α	[F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk-), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal ^R), <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15]	Hanahan (1983)	Klonierungsstamm
<i>E. coli</i> NEBa F ⁺ I ^q	F ^r <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q (Δ <i>lacZ</i>)M15 zzf::Tn10 (Tet ^R)/ <i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) U169 (Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15) <i>glnV44</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	NEW ENGLAND BIOLABS	Klonierungsstamm, Resistenz gegen den Bacteriophagen T1
<i>E. coli</i> NEB Turbo	F ^r <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>fhuA2</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>glnV gal</i> R(zgb-210::Tn10) Tet ^S <i>endA1</i> <i>thi-1</i> Δ (<i>hsdS-mcrB</i>)	NEW ENGLAND BIOLABS	Klonierungsstamm. Resistenz gegen den Bacteriophagen T1, beschleunigtes Wachstum
<i>E. coli</i> NEB T7 Express I ^q	<i>fhuA2</i> <i>lacZ</i> ::T7 gene1 [lon] <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>sulA11</i> R(<i>mcr-73</i> :: <i>miniTn10</i> -Tet ^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10-Tet ^S) <i>endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) 114::IS10 <i>lacI</i> ^q (Cam ^R)	NEW ENGLAND BIOLABS	Expressionsstamm, Resistenz gegen den Bacteriophagen T1, Proteasedefizienz
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	QIAGEN	Expressionsstamm; dichtes Expressionssystem durch trans-Codierung des <i>lac</i> -Repressors
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ lambda ⁻ <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph-1</i>	Guyer et al. (1981)	Wildtyp-Stamm
<i>E. coli</i> MG1655 <i>ybiB</i> :: <i>flag cat</i>	F- lambda- <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph-1</i> , <i>ybiB</i> :: <i>flag cat</i>	Diese Arbeit	3'-terminale Fusion von <i>ybiB</i> mit <i>flag-tag</i>
<i>E. coli</i> MG1655 <i>ybiB</i> :: <i>his</i> ₆ <i>cat</i>	F- lambda- <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph-1</i> , <i>ybiB</i> :: <i>his</i> ₆ <i>cat</i>	Diese Arbeit	3'-terminale Fusion von <i>ybiB</i> mit <i>his</i> ₆ -tag
<i>E. coli</i> MG1655 <i>ybiB</i> :: <i>strep cat</i>	F- lambda- <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph-1</i> , <i>ybiB</i> :: <i>strep cat</i>	Diese Arbeit	3'-terminale Fusion von <i>ybiB</i> mit <i>strep-II</i> [®] -tag

<i>E. coli</i> MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 sstrpD::strep rph-1, ΔybiB(::sstrpD-cat</i>	Diese Arbeit	Austausch von <i>ybiB</i> gegen <i>sstrpD</i> mit <i>strep-II®-tag</i>
<i>E. coli</i> MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 ΔybiB rph-1 ΔybiB</i>	Lehrstuhl Biochemie II	<i>Markerless ybiB knockout</i>
<i>E. coli</i> BW25113	F- <i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) lambda- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514</i>	Datsenko and Wanner (2000)	Wildtyp-Stamm
<i>E. coli</i> BW25113	F- <i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) lambda- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔybiB</i>	KEIO collection	<i>Markerless ybiB knockout</i>
<i>E. coli</i> DY329	W3110-Derivat <i>ΔlacU169 nadA::Tn10 gal490 [λcl857Δ(cro-bioA)]</i>	Yu et al. (2000)	Trägt λ-Prophagen im Genom; erleichtert homologe Rekombination
<i>E. coli</i> DM49	F- <i>thr-1 araC14 leuB6(Am) Δ(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 qsr'-0 glnV44(AS) galK2(Oc), lambda- Rac-0 hisG4(Oc) rfbC1 mgl-51 rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 argE3(Oc) thi-1 lexA3(Ind)</i>	Mount et al. (1972)	Gehemmte Induktion der SOS Antwort durch Mutation im <i>lexA</i> Gen
<i>E. coli</i> TOP10		INVITROGEN	Klonierungsstamm

¹Genetische Nomenklatur nach Bachmann (1990).

2.6 Plasmide

Tabelle 2.2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Name	Marker ²	Herkunft/Referenz	Anmerkungen
pAzF	cat	Chin et al. (2002)	Arabinose-induzierbare Suppression des <i>amber</i> Stoppcodons unter Einbau von pAzF.
pET28a	kan	NOVAGEN	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, 3'-terminaler <i>his6-tag</i>

pET28a_aatrpD2	kan	Lehrstuhl Biochemie II (M. Deuss)	Expression von TrpD2 aus <i>Aquifex aeolicus</i>
pEVOL	cat	Young et al. (2010)	Arabinose-induzierbare Suppression des <i>amber</i> Stoppcodons unter Einbau von pBPA
pJET 1.2 CloneJET	bla	NOVAGEN	Klonierungsvektor, linearisiert, <i>blunt end</i>
pKD3	cat	Datsenko and Wanner (2000)	pANTS γ -Derivat; <i>template</i> für homologe Rekombination
pKD4	kan	Datsenko and Wanner (2000)	pANTS γ -Derivat; <i>template</i> für homologe Rekombination
pQE40_sstrpD	bla	Schwab (2010)	Expression von TrpD aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>
pQE60	bla	QIAGEN	Expressionsvektor, IPTG-induzierbar, 3'-terminaler <i>His₆tag</i>
pQE60_ybiB	bla	Dr. Patrick Babinger	Expression von YbiB Wildtyp
pQE60_ybiB Strep	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB Wildtyp mit 3'-terminalem Strep-II- <i>tag</i>
pQE60_ybiB E54A	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation E54A
pQE60_ybiB E58A	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation E58A
pQE60_ybiB H204A	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation H204A
pQE60_ybiB Y207A	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation Y207A
pQE60_ybiB L224A	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation L224A
pQE60_ybiB E229A	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation E229A
pQE60_ybiB H204TAG	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> Stoppcodon an Position 204
pQE60_ybiB Y207TAG	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> Stoppcodon an Position 207
pQE60_ybiB L40E H204TAG	bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit der Mutation L40E und einem <i>amber</i> Stoppcodon an der Position 204

pQE70	bla	QIAGEN	Expressionsvektor, IPTG-induzierbar, 3'-terminaler <i>His₆tag</i>
pQE70_deoA	bla	Diese Arbeit	Expression von DeoA Wildtyp
pTNA	bla	Prof. C. Yanofsky (Stanford University, USA)	Schwach konstitutive Expression von Genen durch den Tryptophanase-Promotor
pTNA_deoA	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von DeoA Wildtyp
pTNA_ybiB	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB Wildtyp
pTNA_ybiB E54A	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB mit der Mutation E54A
pTNA_ybiB E58A	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB mit der Mutation E58A
pTNA_ybiB H204A	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB mit der Mutation H204A
pTNA_ybiB Y207A	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB mit der Mutation Y207A
pTNA_ybiB L224A	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB mit der Mutation L224A
pTNA_ybiB E229A	bla	Diese Arbeit	Schwach konstitutive Expression von YbiB mit der Mutation E229A
pCR®2.1-TOPO®	bla	INVITROGEN	Klonierungsvektor mit AT-Überhängen für PCR-Produkte

² Genetische Nomenklatur nach Novick et al. (1976)

2.7 Oligodesoxyribonukleotide

Alle aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide wurden entweder von der Firma METABION, Martinsried oder der Firma BIOMERS, Ulm bezogen. Die Position von Mutationen und Schnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Tabelle 2.3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide.

Name	Sequenz, 5'→3'	Verwendung
CyRI	TCACGAGGCCCTTCGTCTT	Sequenzierungsprimer
CyPstI	TCGCCAAGCTAGCTTGGATTCT	pQE-Vektoren
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierungsprimer
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET-Vektoren
pJET <i>forward</i>	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierungsprimer
pJET <i>reverse</i>	AAGAACATCGATTTCCATGGCAG	pJET 1.2 Vektor
M13 <i>forward</i>	GTAAAACGACGCCAGT	Sequenzierungsprimer
M13 <i>reverse</i>	AACAGCTATGACCATG	pCR®2.1-TOPO®
ybiB_1_5	CACGTCCCATGGACTATCGCAAAATCAT	Amplifikation von <i>ybiB</i>
ybiB_1_3	CTAGATCTAAATGCCTGATTAACGCGCG	
5'deoA_PciI	TACCAGACATGTTCTCGCACAGAAATTATTC G	Amplifikation von <i>deoA</i>
3'deoA_BglII	ATTTAATAAGATCTTCGCTGATACGGCGATAGA	
ybiB E54A f	CGTATCAAAGGAGCGGGGGAAAGCAGAG	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB E54A r	CTCTGCTTCCCCGCTCCTTGATACG	
ybiB E58A f	GAGAAGGGAAAGCAGCGATGCTCGGCTTTAC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB E58A r	GTAAAAGCCGAGCATCGCTGCTTCCCCTCTC	
ybiB Y88A f	GTCATCCCCAGTGCAGACGGCGCGTAAAC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB Y88A r	GTTCACGCGCGCCGTTCGCACTGGGATGAC	
ybiB N89A f	CATCCCCAGTTACGCAGGGCGCGTAAAC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB N89A r	GTTCACGCGCGCCGCGTAACCTGGGATG	
ybiB L100A f	CAACCTGACGCCGGCGTGGCGATTCTC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB L100A r	GAGAATGCCAACGCCGGCGTCAGGTTG	
ybiB Y182A f	GCGAACAGTGCAGCGACCCTGGCGAAAC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB Y182A r	GTTCGCCAGGGTCGCTGCACTGTTACGC	
ybiB H204A f	CTTCCAGCGTTCGCGCCGAAATACATTGG	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB H204A r	CCAATGTATTCCGGCGCCGAAACGCTGGAAAG	
ybiB Y207A f	GTTCGCATCCGAAGCGATTGGACGCGTC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB Y207A r	GACCGTCCAATCGCTTCCGGATGCGAAAC	
ybiB L225A f	GGCGGGCGCTAGCGATGCATGGTACTG	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB L225A r	CAGTACCATGCATCGCTAGCGCCCGCC	
ybiB E230A f	CTAATGCATGGTACTGCCGGTGAAGTGTATG	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB E230A r	CATACACTCACCCGCACTACCATGCATTAG	
ybiB E232A f	GGTACTGAAGGTGCGGGTATGCTAATC	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB E232A r	GATTAGCATACACCGCACCTCAGTACC	

ybiB Q295A f	GCAGCAAGCCATCGCGATTTCAGCGATT	Mutagenese von <i>ybiB</i>
ybiB Q295A r	GAATCGCTGAAAATCGCGATGGCTTGCTGC	
H204amber up	TCCAATGTATTCCGGCTACGAAACGCTGGAAAG	Mutagenese von <i>ybiB</i>
H204amber down	CTTCCAGCGTTTCGTAGCCGAATACATTGGA	
Y207amber up	GACGCGTCCAATCTATTCCGGATGCAG	Mutagenese von <i>ybiB</i>
Y207amber down	TCGCATCCGAATAGATTGGACGCGTC	
ybiB 5'flag	TCAGCGACGGCCTGGCGCGCTTAATCAAGCAT TTGACTACAAGGACGACGATGACAAATAAGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC	
5'flag_50b	GTGAAGCGGCAACTATCAGCGACGGCCTGGCG CGCGTTAACGACATTGACTACAAGGACGAC GATGACAAATAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
5'HisTag_50b	GTGAAGCGGCAACTATCAGCGACGGCCTGGCG CGCGTTAACGACATTGACTACAAGGACGAC CACTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	3'-terminale, genomische Modifikation von <i>ybiB</i> durch homologe Rekombination
ybiB Strep-tag ps1	GTGAAGCGGCAACTATCAGCGACGGCCTGGCG CGCGTTAACGACATTGACTACAAGGACGAC TTCGAAAAATAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
3'ybiB_ps2	ATAAAGATGCAGGAATTTCATATTGCGGTGGGG TAAAAGCCGGATGACATCATATGAATATCCTCC TTAG	
5'ssTrpD_BamHI	TCAGGATCCACGCCGTCGGCGCGTTAATGAT GTGAGTCAGTAAGGAGTCGTAATGAATATA AATGAGATTCTTAAAAAA	
3'ssTrpD_Strep	TTATTTTCGAACTCGGGTGGCTCCAACCACT ACTTTCACCACTA	Austausch von <i>ybiB</i> gegen <i>sstrpD</i> mit 3'- terminalem strep-Tag im <i>E.coli</i> Genom durch homologe Rekombination
5'catR ps1	ACCCGCAGTTGAAAAATAAGTGTAGGCTGG GCTGCTTC	
3'catR ps2 BglIII	TACAGATCTATAAAGATGCAGGAATTTCATATT GCGGTGGGTAAAAGCCGGATGACATCATATG AATATCCTTAG	
c1	TTATACGCAAGGCAGCAAGG	
c2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG	
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	
k2	CGGTGCCCTGAATGAAC	
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	
ybiBRT_u2	AACTCGGTTTCCTGTGGTG	Analyse der homologen Rekombinationen im <i>E. coli</i> Genom
ybiBRT_d2	TTGCTGTGGCAGTAAC	
ybiBRT_u3	TGAAAAGCCTCAACCGCTAT	
ybiBRT_u4	CGAGTTACTGCCACAAGCAA	
ybiBRT_d4	CGAGTTACTGCCACAAGCAA	
Sonde 10b	GCTTTGATG	
Sonde 20b	GCTTTGATGTACCAATGCA	

Sonde 22b	GCTTTGATGTACCAATGCATC	
Sonde 25b	GCTTTGATGTACCAATGCATCACC	
Sonde 28b	GGTCAGCCGGTGGGCCGCTGGTG	
Sonde 58b	GCTTTGATGTACCAATGCATCACCATCACCAT CAGGAAATGGGTAAGATGCTTGTAG	
10b dT	TTTTTTTTTT	
12b dT	TTTTTTTTTTTT	
14b dT	TTTTTTTTTTTTTT	
16b dT	TTTTTTTTTTTTTTTT	Test der Nukleinsäurebindungs- eigenschaften von YbiB und aaTrpD2
18b dT	TTTTTTTTTTTTTTTT	
20b dT	TTTTTTTTTTTTTTTT	
22b dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	
25b dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
26b dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	
27b dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	
RNA 12b U	UUUUUUUUUUU	
RNA 20b U	UUUUUUUUUUUUUUUUUU	
12b dT Biotin	Biotin-TTTTTTTTTTT	
12b dT- Fluorescein	Fluorescein-TTTTTTTTTTT	
14b dT Fluorescein	Fluorescein-TTTTTTTTTTT	
D3 library	GCTGTGTGACTCCTGCAA(N) ₄₃ GCAGCTGTATCT TGTCTCC	Bibliothek für ssDNA SELEX
D3r.polyA	GGCGCGATCGTAAGATGCCAAAAAAA (Spacer18)GGAGACAAAGATAACAGCTGC	Amplifikation der D3.library
D3.f	GCTGTGTGACTCCTGCAA	Amplifikation der D3.library
A50.library	CCCTCTCCTCCCTTCAGATGTAGAA(N) ₅₀ TCTAA AGACCTCAAATGCTTCGAA	Bibliothek für ssRNA SELEX
A50.47	ATAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAG GGAAGTCTACATCTT	Amplifikation der A50.library
A50.21	AAGCTTCGTCAACTCCAGAAA	Amplifikation der A50.library

2.8 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisation 20min bei 121°C autoklaviert. Antibiotika und andere hitzelabile Medienzusätze wurden nach Abkühlung der Medien aus steril filtrierten Stammlösungen zugegeben. Soweit nicht anders angegeben, wurden die

verwendeten Puffer filtriert (ME24 Ø47mm; 0,2 µm Porengröße; SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde gefiltertes (MilliQ Advantage A10 System, MILLIPORE GMBH, Schwalbach) bzw. bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.8.1 Molekularbiologisches Arbeiten

PCR-dNTP-Stammlösung (25 mM bzw. 2mM)

Je 25 mM bzw. 2mM dNTP (N=A, C, G oder T) in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

Agarosegelektrophorese

Agarose (2,5 % bzw. 1 %)

2,5 % bzw. 1 % Agarose (w/v) in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und bei 60°C gelagert.

Sukrose Farbmacher

60 % (w/v) Sukrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 0,5x TBE.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml in Wasser gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

TBE (5x)

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris-HCl, pH 8,15.

Gentransfer mittels P1 Transduktion

CaCl₂ (1 M)

1 M CaCl₂ in Wasser gelöst, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

P1-Saline

145 mM NaCl und 50 mM Na₃Citrat in Wasser gelöst, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Selektion von Aptameren für YbiB

DEPC-behandeltes Wasser

1 ml DEPC pro Liter destilliertes Wasser zugegeben, 2 h gerührt, anschließend autoklaviert und bei RT gelagert.

10x PCR Reaktionspuffer

0,1 % (v/v) Triton X-100, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0 bei RT.

RT-PCR Mastermix

2,1 mM Tris-HCl pH 9,0 bei RT, 21 mM Tris-HCl pH 8,3 bei RT, 41,7 mM KCl, 2,8 mM MgCl₂, 4,15 mM DTT, 0,021 % (v/v) Triton X-100, 0,625 mM dNTPs, je 2,1 µM 5'- und 3'-Primer.

Der Mastermix wurde in PCR-Reaktionsgefäß in Portionen zu je 48 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

***In vitro* Transkription Mastermix**

46 mM Tris-HCl pH 7,9 bei RT, 5,75 mM DTT, 17,25 mM MgCl₂, 2,9 mM NTPs

Der Mastermix wurde in PCR-Reaktionsgefäß in Portionen zu je 87 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.8.2 Mikrobiologische Arbeiten mit *E. coli*

Die kurzfristige Lagerung von Antibiotika-Stammlösungen erfolgte bei 4°C, die langfristige bei -20°C.

Ampicillin-Stammlösung (1000fach)

150 mg/ml Ampicillin (Natriumsalz) in Wasser gelöst und steril filtriert.

Chloramphenicol-Stammlösung (1000fach)

30 mg/ml Chloramphenicol in 70 % Ethanol gelöst und steril filtriert.

Kanamycin-Stammlösung (1000 fach)

75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und steril filtriert.

Streptomycin-Stammlösung (1000 fach)

50 mg/ml Streptomycin in Wasser gelöst und steril filtriert.

IPTG-Stammlösung (0,5 M)

0,5 M IPTG in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Phosphate buffered saline (PBS; 10x)

91 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄, 1,5 M NaCl, pH 7,4 mit NaOH eingestellt.

2.8.3 Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

TFB I

100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin;
die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4°C gelagert und der Puffer unmittelbar vor der Verwendung frisch angesetzt.

TFB II

100 mM Tris-HCl pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂;
die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4°C gelagert und der Puffer unmittelbar vor der Verwendung frisch angesetzt.

2.8.4 Arbeiten mit Proteinen

Kaliumphosphat (KP)

1 M K₂HPO₄, 1 M KH₂PO₄;

Der gewünschte pH-Wert wurde über das Mischungsverhältnis der beiden Komponenten eingestellt.

Tris-HCl Puffer

1 M Tris wurde mit rauchender HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Aufschlusspuffer I

50 mM KP pH 7,5, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol

Aufschlusspuffer II

50 mM NP pH 8,0, 300 mM NaCl

Dialyse- und Lagerungspuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM KP pH 7,5

Co-Immunpräzipitationspuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,0 bei RT, 150 mM NaCl,
1 % NP-40 (Nonylphenylpolyethylen-glykol)

Aufschlusspuffer für die Proteomanalysen von *E. coli* (TUCD-Puffer)

2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 1 % DTT, 30 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei RT

2.8.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ammoniumperoxodisulfid (APS)

10 % APS-Stammlösung in Wasser; Lagerung bei -20°C.

ProtogelTM

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid

SDS-PAGE

Trenngelpuffer

0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 bei RT

Sammelgelpuffer

0,4 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 bei RT

Laupuffer

0,1 % (w/v) SDS, 0,025 M Tris-HCl, pH 8,5 bei RT, 0,2 M Glycin

Probenpuffer (6-fach)

5 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 3,75 M Tris-HCl, pH 6,8 bei RT

SDS-PAGE Sammel- und Trenngel (12,5 %)

Die Angaben beziehen sich auf 13 Gele.

	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer	7,38 ml	-
Trenngelpuffer	-	19,5 ml
Protogel TM Acrylamid/Bisacrylamid	5,9 ml	26,2 ml
H ₂ O	15,95 ml	31,58 ml
TEMED	0,089 ml	0,089 ml
APS-Stammlösung (10 %)	0,029 ml	0,195 ml

Coomassie-Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert

2.8.6 Lösungen für Silberfärbung

Fixierlösung I

30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig.

Fixierlösung II

30 % (v/v) Ethanol, 0,5 M NaOAc pH 6,0, je 50 ml Zusatz von 1 ml Glutardialdehyd (25 %) und 0,1 g Na₂S₂O₃.

Silbernitratlösung

0,1% (w/v) AgNO₃, je 50 ml Zusatz von 27 µl Formaldehyd (37%).

Entwicklerlösung

2,5 % (w/v) Na₂CO₃, je 50 ml Zusatz von 14 µl Formaldehyd (37%).

Stopplösung

1 % (v/v) Eisessig.

2.8.7 Puffer für Western blot

2x Transfer-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 8,5 bei RT, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS.

Waschpuffer PBS-T

1x PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween-20.

Blockierungspuffer PBST-M

PBS-T mit 5 % (w/v) Milchpulver.

2.9 Software

2.9.1 Lokale Anwendungen

ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318) © 2004 GE HEALTHCARE

Biacore X100 Control Software 2.0 © 2009GE HEALTHCARE

Biacore X100 Evalution Software 2.0 © 2009 GE HEALTHCARE

Cary Eclipse Version 1.1 (175) © 2002 VARIAN Australia Pty Ltd.

Cary Win UV Version 3.0 (182)	© 2002 VARIAN Australia Pty Ltd.
ChemStation for LC 3D Systems	© 2001-2008 AGILENT TECHNOLOGIES
Corel Draw Version 14	© COREL Corp.
Deep View Swiss PDB Version 3.7	© Guex and Peitsch, 1997
DocIt Version 2.3.0	©2003 UVP Inc.
EndNote Version 14.0	© 2010 WINTERTREE Software Inc.
GeneDoc	© 2000 Karl Nicholas
Gina Star 4.07	© 2008 RAYTEST
ISIS Draw Version 2.3	© 2000 MDL INFORMATION SYSTEMS
Magellan 7	© 2010 TECAN AUSTRIA GmbH
MS Office 2007	© 1983-2007 MICROSOFT CORPORATION
OptiQuant 02.50	© 1997 Packard Instrument Co.
PyMol	© 2006 DELANO SCIENTIFIC LLC.
Sigma Plot Version 12.0	© 2011 SYSTAT SOFTWARE Inc.
Spectra Manager	© 2009 JASCO COPERATION
Splits Tree 4.4.6	© Huson and Bryant, 2006

2.9.2 Servergestützte Anwendungen

DaliLite	http://www.ebi.ac.uk/DaliLite
ProtParam tool	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
SIB BLAST Network Service	http://www.expasy.org/tools/blast/
T-COFFEE	Notredame et al., 2000 http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Lösungen, sowie alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen hingegen wurden mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0,22 µm steril filtriert. Glaswaren wurden zur Sterilisation vier Stunden bei 200°C ausgebacken.

3.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden, falls nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln (150-200 rpm) angezogen. Für Stämme mit Selektionsmarker wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Stammlösung zugegeben. Die Endkonzentration betrug bei Ampicillin 150 µg/ml, bei Chloramphenicol 30 µg/ml, bei Kanamycin 75 µg/ml und bei Streptomycin 50 µg/ml. Das Wachstum der Zellen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gegen Medium am Photometer verfolgt. Eine $OD_{600} = 1$ entspricht dabei ca. $3,2 \cdot 10^8$ Zellen/ml.

Zur Anzucht von Einzelkolonien wurde die Zellsuspension auf entsprechenden Selektivagarplatten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die dauerhafte Lagerung der *E. coli*-Stämme erfolgte als Glycerinkultur bei -80°C. Dazu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur in einem Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel zu gleichen Teilen (v/v) mit 87 % Glycerin gemischt.

3.1.3 Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach Inoue et al. (1990) wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und üN unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Aus einer Vorkultur wurde 11 LB-Medium auf $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bei 37°C unter Schütteln erneut inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,6-0,8$ wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt, anschließend geerntet (30 min, 3200g, 4°C, SORVALL GS3-Rotor), in 100 ml eiskaltem TFB I-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert (15 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R). Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert und in Aliquots von je 100 µl bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zur Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen: 20 µl) für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock von 45 s bei 42°C und anschließend eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Bei Verwendung von Ampicillin als Selektionsmarker wurden die Zellen sofort auf LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert, da Ampicillin nur sich teilende Zellen abtötet. Wurde dagegen ein anderer Selektionsmarker (Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin) verwendet, so wurden die Zellen zur Ausbildung der entsprechenden Resistenz zunächst mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (1 min, 4500 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415 R), der Überstand abgegossen, das Pellet im verbleibenden Restvolumen (ca. 150 µl) resuspendiert und ausplattiert.

Elektrokompetente Zellen

Für die Präparation elektrokompetenter Zellen nach Yu et al. (2000) wurden 50 ml LB-Medium mit 250 µl aus einer üN-Kultur angeimpft, die Zellen entweder bei 32°C (DY329) oder 37°C (alle anderen) unter Schütteln bis OD₆₀₀ = 0,4-0,6 inkubiert und anschließend abzentrifugiert (8 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810 R). Das Pellet wurde zunächst einmal in 30 ml, abschließend noch zweimal mit 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 250-300 µl Wasser resuspendiert und in Aliquots zu je 50 µl auf Eis gelagert.

Zur Transformation durch Elektroporation nach Yu et al. (2000) wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis mit etwa 10-600 ng DNA vermischt, der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Schichtdicke) überführt und dieses einem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) ausgesetzt. Zum Regenerieren wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium gemischt und unter Schütteln für 1 h bei 32°C (DY329) bzw. 37°C inkubiert, anschließend auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 32°C bzw. 37°C bebrütet.

3.1.4 Absterbekurven von *E. coli*

Um zu testen, ob verschiedene *E. coli*-Stämme unterschiedliche Resistenzen gegen schädliche Einflüsse aufweisen, wurde das Absterbeverhalten bei Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an cytotoxischen Substanzen beobachtet. Dazu wurden *E. coli*-Kulturen entweder nach Inkubation bei 37°C üN oder bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,5 geerntet (10 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810 R) und in 1x PBS-Puffer aufgenommen. Jeweils 2·10⁸ Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit verschiedenen Mengen H₂O₂ oder MitomycinC (MMC) für 15 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen dieser Reaktionsansätze in 1:10-Schritten bis zu einem Verdünnungsfaktor 10⁻⁶ in 1x PBS-Puffer hergestellt. Von Verdünnungen, bei denen erfahrungsgemäß das Zählen von Einzelkolonien möglich war, wurden jeweils 100 µl auf LB-Platten ausplattiert und diese üN bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt und so

die Überlebensrate der verschiedenen *E. coli*-Stämme unter Einfluss von H₂O₂ oder MMC bestimmt.

3.1.5 Wachstumskurven von *E. coli*

Eine andere Möglichkeit, die Widerstandsfähigkeit von *E. coli*-Stämmen gegen Umwelteinflüsse zu überprüfen, ist das Erstellen von Wachstumskurven. Bei der manuellen Messung wurden 50 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀=0,05 angeimpft. Als Vorkultur diente dabei entweder eine stationäre üN-Kultur oder eine *E. coli*-Kultur, die sich am Ende der logarithmischen Wachstumsphase, also bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 befand. Anschließend wurden die Kulturen mit verschiedenen Mengen von H₂O₂, MMC oder Methylmethansulfonat (MMS) versetzt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Wachstumsverhalten der Kulturen wurde durch Messung ihrer Zelldichte alle 30 min verfolgt.

Bei der Messung von Wachstumskurven am *platereader* (TECAN Infinite® M200 Pro) wurden zunächst die *E. coli*-Stämme mit LB_{Amp}-Medium auf eine Zelldichte von 1·10⁸ Zellen/ml verdünnt. Als Vorkultur dienten dabei, analog zur manuellen Messung, entweder stationäre Kulturen oder solche, die sich am Ende der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Anschließend wurden die unterschiedlichen Stämme zusammen mit verschiedenen Mengen H₂O₂, MMC oder MMS in die *wells* einer sterilen 24-well Platte (GREINER) pipettiert. Dabei betrug das Gesamtvolumen in jedem *well* 1,5 ml. Die Platte wurde dann mit Deckel im *platereader* bei 37°C und unter Schütteln (orbital, maximale Umdrehung) für acht Stunden inkubiert. Alle 15 min wurde die OD₆₀₀ in jedem *well* gemessen und so das Wachstum der *E. coli*-Zellen verfolgt.

3.1.6 Entsorgung von Mikroorganismen

Nicht mehr benötigte Kulturen, sowie mit Bakterien in Kontakt gekommene Lösungen wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA oder RNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus *E. coli*-Zellen wurden 5 ml einer frischen üN-Kultur durch Zentrifugation geerntet (10 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810 R) und in 1,5 ml LB-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1,5 Vol Phenol (pH 5 für RNA-Isolation, pH 7,5 für DNA-Isolation) und Mischen aufgeschlossen. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 3200g,

20°C, EPPENDORF Centrifuge 5810 R) und anschließend die wässrige Phase abgenommen. Nach einer zweiten Extraktion mit Phenol wurde zur Entfernung des restlichen Phenols 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gut gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 3200g, 20°C, EPPENDORF Centrifuge 5810 R).

Die wässrige Phase wurde abgenommen und die enthaltenen Nukleinsäuren durch Ethanolfällung (3.2.2) weiter gereinigt und konzentriert.

3.2.2 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Um Nukleinsäuren zu reinigen, umzupuffern oder zu konzentrieren, wurde die Ethanolfällung verwendet. Dazu wurden der Lösung 0,1 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 3 Volumen absoluter Ethanol zugegeben und für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 800 µl eiskaltem 75%-igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und nach Abpipettieren des Ethanol getrocknet. Das Pellet wurde im gewünschten Puffer im Kühlschrank üN gelöst, kurz zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die isolierten Nukleinsäuren wurden bei -20°C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde spektroskopisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm bestimmt (EPPENDORF UV-vis Biophotometer). Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml, einer ssDNA-Konzentration von 33 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 35 µg/ml. Eine reine DNA-Lösung zeigt keine Absorption oberhalb von 300 nm und weist einen OD^{260}_{280} -Quotienten von mindestens 1,8 auf. Bei reiner RNA beträgt der OD^{260}_{280} -Quotient ca. 2,0.

3.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird die enzymatische Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro* ermöglicht (Saiki et al., 1985; Mullis and Falloona, 1987).

Die PCR-Reaktion wurde standardmäßig in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in einem Thermocycler (Mastercycler personal, EPPENDORF) mit 105°C Deckeltemperatur durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus jeweils 50 pmol beider Primer, 1-10 ng zu amplifizierender DNA-Matrize, je 200 nM dNTPs und 1-2 U thermostabiler DNA-Polymerase im Reaktionspuffer (nach Herstellerangaben). Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten für eine spätere Klonierung und Expression kam

ein 1:1 Gemisch aus GoTaq® und Pwo-Polymerase zum Einsatz. Dieses Gemisch gewährleistet zum einen eine hohe Geschwindigkeit der Reaktion und zum anderen eine geringe Fehleranfälligkeit der Amplifikation, aufgrund der 3'→5' Exonuklease-Aktivität der Pwo-Polymerase.

Ein Standard PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Initiale Denaturierung	95°C, 5 min
2. Denaturierung	95°C, 45 s
3. <i>Annealing</i>	T _A °C, 45 s
4. Extension	72°C, 1 min/kb
5. Finale Extension	72°C, 10 min
6. Lagerung	4°C, ∞

Die *annealing*-Temperatur T_A wurde dabei an die Schmelztemperatur der Primer angepasst. Die Schritte 2-4 wurden 30-35x zyklisch wiederholt.

Bei stark unterschiedlichen Schmelztemperaturen ($\Delta T_M > 10^\circ\text{C}$) oder beim Auftreten von unspezifischen PCR-Produkten wurde eine Gradienten-PCR gewählt, um die optimale *annealing*-Temperatur zu ermitteln. Dafür wurden in einem Thermocycler mit Gradientenfunktion (Mastercycler gradients, EPPENDORF) mehrere Reaktionen gleichzeitig bei verschiedenen *annealing*-Temperaturen durchgeführt. Die Analyse der Ansätze auf einem Agarosegel (3.2.8) zeigte dann die optimale *annealing*-Temperatur.

3.2.5 Kolonie-PCR

Um den Erfolg von Klonierungen und Transformationen zu überprüfen, wurden auf Selektivagar gewachsene Kolonien mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 30 µl LB-Medium resuspendiert. Davon wurde anschließend 1 µl als *template* zu 19 µl eines PCR-Ansatzes mit GoTaq®-Polymerase gegeben und die PCR gemäß 3.2.4 durchgeführt. Die dabei eingesetzten Primer waren entweder spezifisch für das klonierte Zielgen oder für Vektorbereiche, flankierend zur *multiple cloning site* (MCS).

3.2.6 Gerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten mittels OE-PCR

Bei der *overlap Extension* (OE)-PCR zur gerichteten Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in getrennten PCR-Ansätzen mit diesen Primern in Kombination mit je einem genflankierenden Primer von der gleichen Matrize zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und mittels präparativer Gelelektrophorese (3.2.8) gereinigt. Diese Fragmente überlappen im Bereich der ausgetauschten Nukleotide und dienen in einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit genflankierenden Primern das vollständige Gen mit den ausgetauschten Nukleotiden zu amplifizieren.

Die Amplifikationsschritte erfolgten mittels Standard-Protokoll wie in 3.2.4 beschrieben.

3.2.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus *E. coli* im analytischen Maßstab

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit* (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot). Dazu wurde eine 5 ml üN-Kultur in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 1500 g, RT, EPPENDORF Centrifuge 5415D). Die Extraktion der DNA aus den Zellpellets erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 30 µl ddH₂O. Die Plasmidpräparation wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau verwendet. Je nach Größe des zu analysierenden DNA-Fragments wurden entweder 1 % oder 2,5 % Agarose in 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf 60°C mit ca. 1/100 Volumen der Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt und die Agaroselösung in die Gelkammer gegossen. Das Gel wurde nach dem Erstarren mit 0,5x TBE Puffer überschichtet und die DNA-Proben in Sukrose-Farbmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 170 V. Dabei wandert die negativ geladene DNA zur Anode, wobei eine Auftrennung der DNA-Fragmente abhängig von ihrer Länge erfolgt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente mit eingelagertem Ethidiumbromid sichtbar (Sharp et al., 1973) und ihre Größe anhand eines Längenstandards (MBI FERMENTAS, GeneRulerTM 1 kb Plus DNA Ladder) abgeschätzt. Die Dokumentation der Gele erfolgte über den UV-Transilluminator des *Multi-Doc-it Digital Imaging Systems* (UVP inc.).

3.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurden die gewünschten Fragmentbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten und gemäß Herstellerangabe mit dem *Nucleo Spin Extract II Kit* (MACHEREY-NAGEL, Düren) gereinigt. Die Elution erfolgte mit 20-50 µl ddH₂O, abhängig von der im Gel sichtbaren DNA-Menge.

3.2.10 Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen

Pro µg zu spaltender DNA wurden jeweils 10 U Enzym in den Restriktionsverdau eingesetzt. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz wurde unter 10% des Gesamtvolumens gehalten, da der glycerinhaltige Lagerungspuffer der Enzyme ihre

Aktivität beeinflussen kann. Die Reaktionen erfolgten 1-3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur im empfohlenen Puffer.

3.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden mit Restriktionsenzymen gespaltener Vektor und Insert in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2U T4-DNA-Ligase und dem Puffer nach Herstellerangabe entweder für 10 h bei 16°C oder für 1 h bei RT. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde direkt zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nukleotidsequenzen erfolgte durch Auftragssequenzierungen bei der Firma GENEART, Regensburg (<http://www.geneart.com>). Ein Sequenzieransatz (Vol. = 8 µl) enthielt standardmäßig 150-300 ng Plasmid-DNA und 1,25 µM Primer.

3.2.13 Modifikation des *E. coli*-Genoms durch homologe Rekombination

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere gezielte Veränderungen des *E. coli* Genoms vorgenommen. Dies erfolgte unter Verwendung des λ-Red-Rekombinasesystems, das die drei Gene γ , β und *exo* umfasst (Datsenko et al., 2000; Yu et al., 2000). Gamma inhibiert die Exonuklease V des Wirtsorganismus, wodurch der Abbau von linearer dsDNA verzögert wird. Beta und Exo binden dann an das für die homologe Rekombination benötigte lineare dsDNA-Fragment und können die Rekombination initiieren. Dabei arbeitet Exo als dsDNA-abhängige Exonuklease, während Beta als ssDNA-bindendes Protein den *annealing*-Vorgang zwischen komplementären DNA-Strängen steuert. In **Abbildung 3.1** ist das Vorgehen zur Herstellung eines *E. coli*-Stamms mit genomicscher Modifikation schematisch dargestellt.

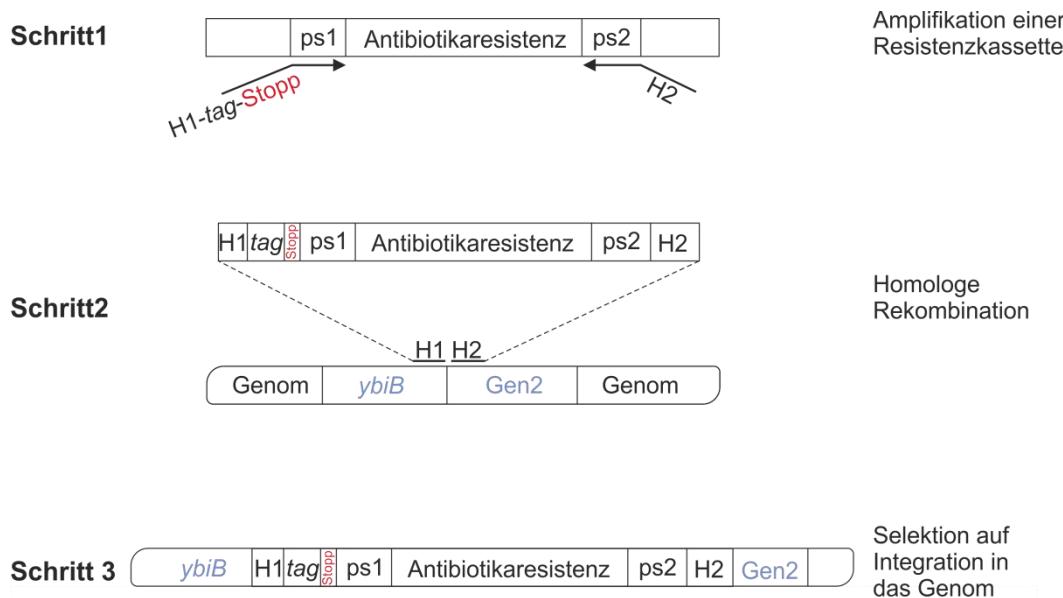


Abbildung 3.1: Herstellung eines *E. coli*-Stamms mit genomischen Modifikationen durch homologe Rekombination. Gezeigt ist das 3'-seitige Einführen eines *tags* an *ybiB*. H1 und H2 bezeichnen die für die Rekombination nötigen homologen Bereiche, ps1 und ps2 sind die *priming sites* zur Amplifikation der Resistenzkassette. Die genaue Beschreibung des Vorgehens befindet sich im Text.

In dem gezeigten Beispiel wurde eine 3'-seitige Modifikation von *ybiB* durchgeführt (vgl. **Abbildung 3.1**). Dabei wurde zunächst durch PCR ausgehend von einem pKD3- oder pKD4-Vektor (Datsenko et al., 2000) als *template* eine Chloramphenicol- bzw. Kanamycin-Resistenzkassette amplifiziert. Dabei enthielt der *forward*-Primer der Reihe nach einen 50 nt langen, zum Ende von *ybiB* homologen Sequenzbereich H1, einen Sequenzabschnitt, der entweder für den *flag*-, *his6*- oder den *strept-tag* codierte, ein Stopcodon, sowie die *priming site 1* (ps1) der pKD-Vektoren. Der *reverse* Primer codierte einen 50 nt langen Sequenzbereich H2, der homolog zum *E. coli* Genom *downstream* des Stopcodons von *ybiB* war und die *priming site 2* (ps2) des entsprechenden Vektors. Für die homologe Rekombination wurde der *E. coli*-Stamm DY329 verwendet. Dieser trägt im Genom integriert einen λ -Prophagen, von dem lediglich noch die Gene für das Red-Rekombinase-System erhalten sind. Sie werden dort durch einen temperatursensitiven Promotor reguliert, der ihre selektive Expression bei einer Temperatur von 42°C erlaubt (Sawitzke et al., 2007).

Beim Austausch von *ybiB* gegen *sstrpD* mit 3'-terminalem *strept-tag* musste eine Strategie gewählt werden, um ein für die homologe Rekombination geeignetes PCR-Produkt zu erzeugen (**Abbildung 3.2**).

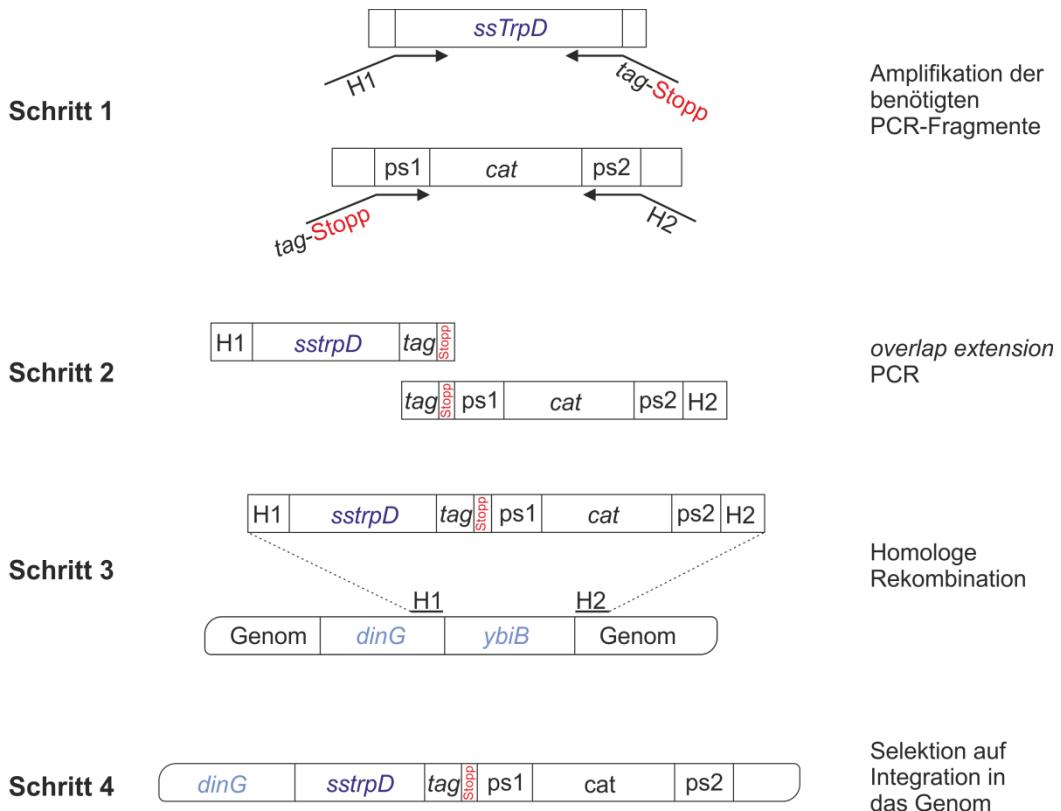


Abbildung 3.2: Herstellung eines *E. coli*-Stamms mit genomischem *sstrpD* an der Stelle von *ybiB* durch homologe Rekombination. Gezeigt ist der Ersatz von *ybiB* durch *sstrpD* unter zusätzlicher Einführung eines 3'-terminalen *tags* an *sstrpD*. H1 und H2 bezeichnen die für die Rekombination nötigen homologen Bereiche, ps1 und ps2 sind die *priming sites* zur Amplifikation der Chloramphenicolresistenz (*cat*). Die genaue Beschreibung des Vorgehens befindet sich im Text.

Im ersten Schritt wurde das *sstrpD*-Gen ausgehend vom Expressionsplasmid pQE40_*sstrpD* (Schwab, 2010) amplifiziert. Der *forward* Primer enthielt hier eine 50 nt lange Sequenz H1, die homolog zur Region unmittelbar *upstream* des Startcodons *ybiB* war, sowie den Anfang des *sstrpD*-Gens. Der *reverse* Primer enthielt neben dem Ende von *sstrpD* den *strep-tag* und ein Stopcodon. Anschließend wurde ausgehend vom pKD3-Vektor die Chloramphenicolresistenz amplifiziert. Hier enthielt der *forward* Primer einen, zum Ende des *sstrpD*-PCR Produkts komplementären Bereich, sowie die ps1 des pKD3-Vektors. Der *reverse*-Primer codierte einen 50 nt langen Sequenzbereich H2, der homolog zum *E. coli*-Genom *downstream* des Stopcodons von *ybiB* war und die ps2 des Vektors. Beide PCR-Produkte wurden nun mittels *overlap-extension*-PCR (OE-PCR) zu einem dsDNA Fragment verbunden, das so für die geplante Modifikation des *E. coli* Genoms geeignet war.

Nach der Reinigung der PCR-Produkte wurde mit *DpnI* verdaut, um selektiv die methylierte *template*-DNA, nicht aber das nicht-methylierte PCR-Produkt zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurde der *E. coli*-Stamm DY329 mit den entsprechenden PCR-Produkten transformiert. Zur Präparation von elektrokompetenten DY329-Zellen

wurden zunächst 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml üN-Kultur angeimpft und bei 32°C unter Schütteln bis zu einer $OD_{600} = 0,4 - 0,5$ inkubiert. Die nachfolgende Inkubation der Kultur bei 42°C für 15 min in einem Wasserbadschüttler diente zur Induktion der Rekombinase-Gene. Die anschließenden Schritte wurden gemäß 3.1.3 durchgeführt, wobei bei der Elektrotransformation 50-600 ng PCR-Produkt eingesetzt wurden. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und 2-3 h bei 32°C unter Schütteln inkubiert, um die Ausbildung der Antibiotika-Resistenz zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten mit Chloramphenicol (*template* Plasmid pKD3) bzw. Kanamycin (*template* Plasmid pKD4) ausplattiert und bei 32°C inkubiert. Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.5) und Sequenzierung (3.2.12) analysiert und so die korrekte Modifikation des *E. coli* Genoms verifiziert.

3.2.14 Gentransfer mittels P1-Transduktion

Mittels P1-Transduktion kann ein Genomabschnitt zwischen Bakterienstämmen übertragen werden. Das Prinzip beruht auf dem lytischen Vermehrungszyklus des Phagen P1. Nachdem der Phage eine Wirtszelle infiziert hat, werden Phagen-DNA und -Proteine gebildet und das Wirts-Genom zerstückelt. Bei der Assemblierung neuer P1-Phagen wird mit einer Häufigkeit von 0,3 % durch fehlerhafte Verpackung bakterielle DNA (ca. 100 kbp), anstatt P1-DNA in die Phagenhülle verpackt. Diese transduzierenden Phagen sind nicht mehr vermehrungsfähig, aber infektiös, wodurch in eine neu infizierte Wirtszelle veränderte Genomabschnitte übertragen werden können. So konnten im Stamm DY329 erzeugte genomische Modifikationen in andere *E. coli*-Stämme überführt werden.

Eine üN-Kultur des Spender-Stamms (*E. coli* DY329) wurde 1:5 mit LB-Medium (enthält 2,5 mM CaCl₂) verdünnt. In ein Wassermannröhrchen wurden 250 µl der verdünnten üN-Kultur, 100 µl P1-Lysat ($1,14 \cdot 10^9$ pfu/ml) und 2,5 ml Weichagar gegeben. Die Ansätze wurden bei 50°C in einem Wasserbad pipettiert, anschließend gemischt und auf LB-Platten gegossen. Die Platten wurden bei 37°C für 3-6 h inkubiert, bis nach dem Anwachsen der *E. coli* Zellen, als Konsequenz der vollständigen Lyse, die Platten wieder klar wurden. Danach wurden die Platten mit 3 ml LB-Medium überschichtet und üN bei 4°C inkubiert, um die Phagen aus dem Agar zu lösen. Am folgenden Tag wurde das Lysat von den Platten abpipettiert, zentrifugiert (10 min, 3220 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R) und der Überstand mit 0,5 ml Chloroform versetzt (Morse et al., 1956).

Eine üN-Kultur des *E. coli*-Zielstamms (MG1655) wurde auf $2 \cdot 10^9$ Zellen/ml in LB-Medium mit 2,45 mM CaCl₂ verdünnt. Je 0,8 ml dieser verdünnten Kultur wurden mit 0,4 ml unverdünntem oder 1:10 verdünntem P1-Lysat aus dem Spender-Stamm versetzt. Als Negativkontrolle wurde den *E. coli*-Zellen 0,4 ml LB-Medium zugegeben. Zur Infektion wurden die Ansätze 20 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 5 ml P1-Saline zugegeben, um die Absorption der Phagen zu

stoppen und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3200 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R). Das Pellet wurde in 100 µl P1-Saline aufgenommen und auf Selektivagar ausplattiert (Morse et al., 1956). Nur von transduzierenden Phagen infizierte Zellen, in die der modifizierte Genomabschnitt inklusive Resistenzkassette übertragen wurde, konnten auf den Platten Kolonien ausbilden.

3.2.15 Selektion von spezifischen Aptameren (SELEX)

Bei Aptameren handelt es sich um kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die eine definierte dreidimensionale Struktur besitzen und so in der Lage sind, andere Moleküle spezifisch zu erkennen und zu binden. Dabei kann es sich sowohl um Proteine (Tuerk and Gold, 1990), als auch um kleine Moleküle, beispielsweise Nukleotide oder Farbstoffe (Ellington and Szostak, 1990), handeln. Das Verfahren, mit dem Aptamere gegen ein spezifisches Ziel (*target*) selektiert werden, bezeichnet man als SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment; **Abbildung 3.3**).

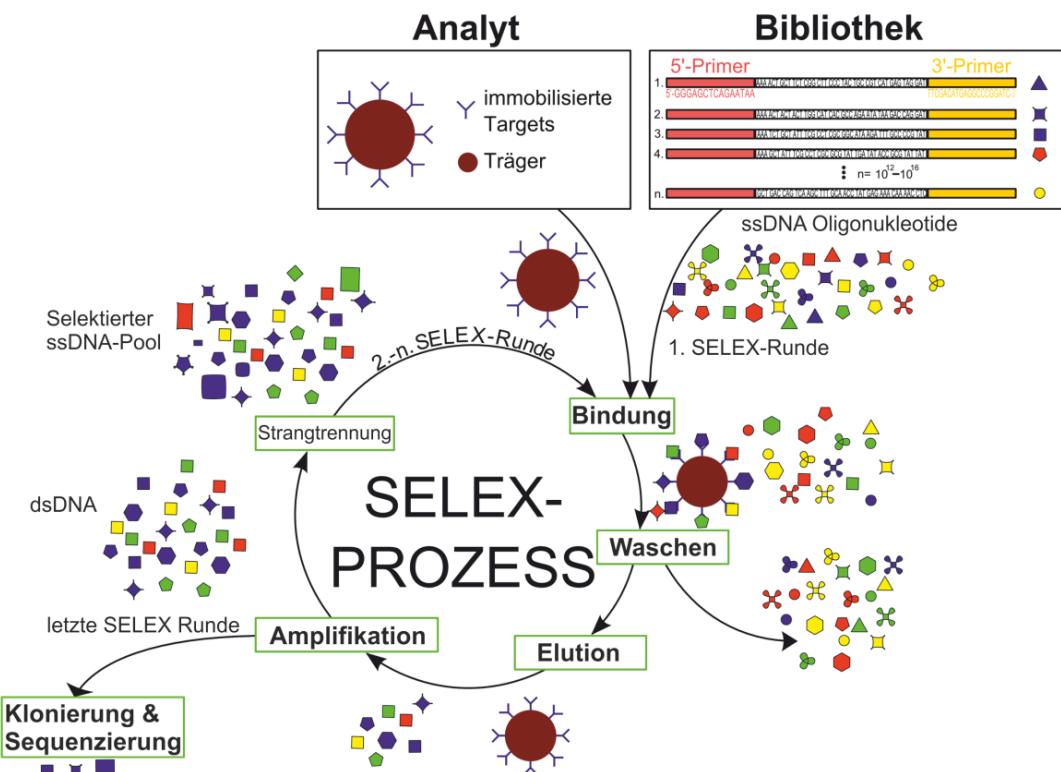


Abbildung 3.3: Selektion von Aptameren durch SELEX. Modifiziert nach <http://de.wikipedia.org/wiki/SELEX>. Die genaue Beschreibung des Vorgehens findet sich im Text.

Dabei wird das *target* auf einem Trägermaterial immobilisiert und mit einer Bibliothek aus einzelsträngigen Oligonukleotiden inkubiert. Durch Waschen werden nicht spezifisch bindende Oligonukleotide entfernt, nur die stärker bindenden bleiben am *target* und somit am Trägermaterial fixiert. Anschließend werden die noch gebundenen

Oligonukleotide eluiert und als *template* für eine PCR verwendet. Die dabei entstandene dsDNA wird wieder in ihre Einzelstränge dissoziiert und diese in eine neue Selektionsrunde eingesetzt. Durch mehrmalige Wiederholung der Selektion mit anschließender Amplifikation kommt es zur Anreicherung von stark an das *target* bindenden Sequenzmotiven. Diese werden nach Abschluss der letzten Selektionsrunde kloniert und durch Sequenzierung analysiert.

In dieser Arbeit wurde die SELEX-Technik verwendet, um spezifische Aptamere für YbiB zu selektieren und so zu überprüfen, ob das Protein eine Spezifität für bestimmte Sequenzmotive aufweist. Die Arbeiten wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Günter Mayer an der Universität Bonn durchgeführt. Dabei wurde nach dem dort etablierten Protokoll vorgegangen (Mayer and Höver, 2009), mit folgenden Abweichungen:

Es wurden parallel zwei Selektionen mit unterschiedlichen Bibliotheken, einer ssRNA-Bibliothek (A50) und einer ssDNA-Bibliothek (D3), durchgeführt. Dabei wurde YbiB für die Kopplung an die als Träger verwendeten Dynabeads nicht biotinyliert, sondern stattdessen YbiB mit C-terminalem *strep-II®-tag* verwendet. Zur Herstellung der Analyt-Suspension wurden 100 µg Protein an 5 mg Dynabeads gebunden und die Mischung dreimal mit 1 ml 1,25x PBS-Puffer, 1 mg/ml BSA gewaschen und abschließend in 1,5 ml des Puffers aufgenommen. Als Selektionspuffer wurde 1x PBS, 3 mM MgCl₂, 0,8 mg/ml BSA verwendet.

Die erste Selektionsrunde wurde bei beiden Bibliotheken mit 1 nmol Nukleinsäuren und 80 µl der Analyt-Suspension durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Selektionsansatzes betrug stets 100 µl. In der ersten Selektionsrunde wurden die *beads* zweimal mit 200 µl Selektionspuffer gewaschen und anschließend die verbliebenen Nukleinsäuren in 50 µl H₂O eluiert.

Um einzelsträngige DNA für die nächste Selektionsrunde zu erzeugen, wurde bei der D3-Bibliothek zunächst mit den eluierten Oligonukleotiden als *template* eine PCR durchgeführt (*annealing*-Temperatur: 50°C, Elongationszeit: 90 s). Initial wurden bei der Amplifikation der gebundenen Nukleinsäuren 12 Zyklen durchgeführt und die PCR-Reaktion anschließend mittels Agarosegelektrophorese analysiert (3.2.8). Konnte noch keine Bande detektiert werden, wurden zwei zusätzliche Zyklen durchgeführt und die PCR erneut analysiert. Dies wurde solange wiederholt, bis die gewünschte Menge an Produkt hergestellt war. Einzelsträngige DNA, für die folgende Selektionsrunde mit der D3-Bibliothek, wurde dann durch denaturierende PAGE (Sambrook et al., 1989) erzeugt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA daraus durch Schütteln in 300 mM NaOAc pH 5,3 für 2 h bei 65°C gelöst. Nach einer Ethanolfällung (3.2.2) wurde die ssDNA in H₂O aufgenommen und in die nächste Selektionsrunde eingesetzt.

Bei der A50-Bibliothek wurde die ssRNA nach der Selektion zunächst durch RT-PCR (3.2.16) in DNA umgeschrieben und durch eine angepasste Zyklenzahl vervielfältigt,

wie für ssDNA beschrieben. Die ssRNA für die nächste SELEX-Runde wurde aus diesem PCR-Produkt durch *in vitro*-Transkription (3.2.17) erzeugt.

In den nächsten SELEX-Runden wurden jeweils 20 µl so erzeugte einzelsträngige Nukleinsäure eingesetzt. Die Stringenz der Selektion wurde für beide Bibliotheken durch Anpassen der eingesetzten Mengen an Dynabeads und Nukleinsäure (Bibliothek) sowie durch Intensivierung der Waschschrifte wie in **Tabelle 3.1** beschrieben erhöht.

Tabelle 3.1: Bedingungen bei den verschiedenen SELEX-Runden mit ssDNA und ssRNA.

SELEX-Runde	Analyt-Suspension	Bibliothek	Waschschrifte	Anmerkung
1	80 µl	1 nmol	2x 200µl	
2	80 µl	20 µl	2x 200µl	
3	40 µl	20 µl	2x 200µl	
4	40 µl	20 µl	2x 200µl	
5	40 µl	20 µl	3x 200 µl	
6	40 µl	20 µl	3x 200 µl	
7	40 µl	10 µl	3x 200 µl	
8	40 µl	10 µl	3x 200 µl	prä-Selektion ¹
9	40 µl	10 µl	3x 200 µl	Ende Selektion A50
10	40 µl	10 µl	6x 200 µl	
11	40 µl	10 µl	6x 200 µl	
12	40 µl	10 µl	6x 200 µl	Ende Selektion D3

¹gemäß Mayer et al. (2009): Punkt 3.6.1, Schritte 1 und 2.

Nach Beendigung der Selektion wurde die Anreicherung von spezifischen Aptameren mittels Filterbindung überprüft (3.4.12). Konnte eine verbesserte Bindung gezeigt werden, wurde die dsDNA der entsprechenden Selektionsrunden in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor (INVITROGEN) nach Angaben des Herstellers kloniert und mit diesem Konstrukt chemisch kompetente TOP10®-Zellen transformiert (3.1.3). Einzelklone wurden mittels Sequenzierung analysiert und die Bindungseigenschaften der einzelnen Aptamere erneut mittels Filterbindung getestet (3.4.12).

3.2.16 RT-PCR

Bei einer RT-PCR wird einzelsträngige RNA als *template* eingesetzt. Diese muss zunächst in ssDNA überschrieben werden (reverse Transkription), die im Anschluss als Matrize für die PCR dient. In dieser Arbeit wurde die Superscript II reverse-Transkriptase (INVITROGEN) verwendet. Für die Reaktion wurden 48 µl RT-PCR Mastermix (2.8.1), 5 U Taq Polymerase, 2 U reverse Transkriptase und ca. 1 pmol

ssRNA als Matrize zugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde mit DEPC behandeltem Wasser auf 100 μ l eingestellt. Die reverse Transkription erfolgte dann für 10 min bei 54°C. Danach wurde eine Standard-PCR wie beschrieben durchgeführt (3.2.4).

3.2.17 *In vitro* Transkription von dsDNA

Bei der *in vitro* Transkription wird doppelsträngige DNA mit einer RNA-Polymerase in einzelsträngige RNA umgeschrieben. Dies wurde bei der Selektion von spezifischen Aptameren eingesetzt (3.2.15). Für die Reaktion wurden 87 μ l Transkriptionsmastermix, 10 μ l aus dem Reaktionsansatz der vorher durchgeföhrten RT-PCR und 40 U RNase Inhibitor (RNasin®; PROMEGA) zugegeben. Die Transkription (15 min bei 37°C) wurde durch Zugabe von 100 U T7 RNA-Polymerase gestartet. Die Lagerung der Ansätze bis zu ihrer weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proben für vergleichende Proteomanalysen

Zur Anzucht wurden der *E. coli* MG1655 Wildtyp- und der entsprechende *E. coli* Δ ybiB-Stamm aus einer frischen üN-Kultur in je 50 ml M9⁻-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,4$ wurden die Zellen geerntet und in 700 μ l eines speziellen Aufschlusspuffers für die 2D-Gelelektrophorese (TUCD-Puffer, 2.8.4) aufgenommen. Dieser enthielt Harnstoff, Thioharnstoff und DTT, um möglichst alle zellulären Proteine zu solubilisieren. Zum Schutz gegen proteolytischen Abbau wurde den Proben zusätzlich 1/10 Volumen CompleteTM Protease-Inhibitor (ROCHE) zugegeben. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall (BRANSON Sonifier 250D, Mikrospitze, 20 % Leistung, 2 min, 2 s Leistung/2 s Pause). Die Zelllysate wurden nochmals zentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und die Überstände zur 2D-Gelelektrophorese verwendet. Diese wurde ebenso wie die Analyse der Daten und die massenspektrometrische Untersuchung interessanter Proteinspots von Dr. Astrid Bruckmann (AG Deutzmann) durchgeführt.

3.3.2 Expression von Proteinen im analytischen Maßstab

Für jedes zu exprimierende Gen wurde eine analytische Probeexpression in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Herstellung einer möglichst großen Menge an löslichem Protein zu finden.

Dazu wurden 5 ml Vorkultur mit einer Transformante angeimpft und üN unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Aus der Vorkultur wurden zwei Kolben mit je 50 ml LB-Selektivmedium auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und parallel bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Sobald die Kulturen eine $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ erreicht hatten, wurde einer Kultur zur Induktion der Genexpression 0,5 mM IPTG zugegeben. Die Kulturen wurden weiter bei 37°C inkubiert und nach 3-6 h die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R) geerntet. Die Pellets wurden in jeweils 700 µl Aufschlusspuffer resuspendiert und durch Sonizierung (BRANSON Sonifier 250D, Mikrospitze, 20 % Leistung, 1,5 min, 2 s Leistung/2 s Pause) auf Eis aufgeschlossen. Zur Abtrennung der löslichen Fraktion wurde das Lysat erneut zentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 700 µl Aufschlusspuffer aufgenommen, und Aliquots beider Fraktionen wurden mit 6-fach SDS Probenpuffer versetzt und erhitzt (5 min, 95°C). Die Analyse mittels SDS-PAGE (3.4.3) erlaubte es, den löslichen und unlöslichen Anteil des rekombinanten Proteins abzuschätzen.

Falls sich die Ausbeute an löslichem Protein bei 37°C als unbefriedigend erwies, wurden erneut analytische Expressionen bei niedrigeren Inkubationstemperaturen (30°C, 25°C und 20°C) durchgeführt, um die Aggregation des Zielproteins zu unterdrücken. Nach der Analyse der löslichen und unlöslichen Zellfraktion bei den verschiedenen Temperaturen mittels SDS-PAGE wurde anhand der Menge an löslichem Zielprotein die optimale Expressionstemperatur ermittelt.

3.3.3 Präparative Expression von *ybiB*, seinen Varianten und *aatrpD2*

E. coli *ybiB*-Wildtyp, die *ybiB*-Alaninvarianten, sowie TrpD2 aus *Aquifex aeolicus* (aaTrpD2) wurden im pQE60 bzw. pET28a-Vektor in *E. coli* rekombinant exprimiert. Dazu wurde 1 l vorgewärmtes LB_{Amp}-Medium aus einer frischen Vorkultur auf $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bei 37°C und 150 rpm unter Beobachtung der Zelldichte inkubiert. Sobald die Kultur eine $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ erreicht hatte, wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde weiter bei 37°C unter Schütteln üN inkubiert (*ybiB*-Alaninvarianten: 25°C über Nacht) und am folgenden Tag die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15min, 4000 rpm, 4°C, SORVALL GS3-Rotor) und das Zellpellet in 30-40 ml Aufschlusspuffer I (2.8.4) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (BRANSON Sonifier 250D, Makrospitze), gepulst bei einer Amplitude von 40% 2,5 min auf Eis. Zur Abtrennung der Zellreste wurde das Lysat erneut zentrifugiert (40 min, 13000 rpm, 4°C, SORVALL SS34-Rotor). Das jeweilige Zielprotein wurde aus der löslichen Fraktion mittels Säulenchromatographie (Äkta Basic 10 better Systems, GE HEALTHCARE) gereinigt. Bei YbiB-Wildtyp, seinen Varianten und aaTrpD2, die alle als Fusion mit einem C-terminalen *his6-tag* vorlagen, erfolgte die Reinigung mittels Metallchelataffinitätschromatographie (3.3.4).

Für die Selektion von spezifischen Aptameren (3.2.15) wurde *ybiB*-Wildtyp als Fusion mit einem C-terminalen *strep-II[®]-tag* benötigt. Die Expression erfolgte analog zu YbiB mit *his₆tag*, lediglich Aufschlusspuffer II (2.8.4) wurde verwendet, um das Zellpellet zu resuspendieren. Die Reinigung des Proteins erfolgte über Affinitätschromatographie an einer StrepTactin-Säule (3.3.5).

3.3.4 Metallchelataffinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mittels Metallchelataffinitätschromatografie wurde an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE HEALTHCARE) mit der HisTrapCrude FF 5 ml-Säule (GE HEALTHCARE; Säulenvolumen (CV): 5 ml; max. Druck: 0,5 MPa) durchgeführt. Diese Säulen bestehen aus Sepharose 6 (FastFlow)-Medium und dem daran gebundenem Chelator Iminodiessigsäure (IDA). An IDA können mittels dreifacher Koordinierung Metallionen (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Fe^{3+}) gebunden. Die drei noch freien Koordinationsstellen der Metallionen stehen weiterhin für die Komplexierung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem *his₆tag* fusioniert wurden, binden nach Beladung der Säule mit Metallionen (in dieser Arbeit wurde stets Ni^{2+} verwendet) sehr spezifisch an die Säule, da die Metallionen zusätzliche Koordinationsstellen für die Histidine bereitstellen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt durch einen Imidazolgradienten, wobei die Imidazolmoleküle mit den chemisch äquivalenten Imidazolringen der Histidin-Reste des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren. In den Auftragspuffern dürfen sich keine größeren Mengen an EDTA oder DTT befinden. EDTA würde die gebundenen Nickelionen komplexieren und damit von der Säule entfernen, während DTT die Ionen zu elementarem Nickel reduzieren würde.

Die Reinigung von YbiB, seinen Varianten und aaTrpD2 wurde nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate:	5 ml/min
Äquilibrierung:	50 mM KP pH 7,5, 300 KCl, 10 mM Imidazol für 5 CV
Beladen:	Probe in 50 mM KP pH 7,5, 300 KCl, 10 mM Imidazol
Waschen:	50 mM KP pH 7,5, 300 KCl, 10 mM Imidazol für 10 CV
Eluieren:	0 – 750 mM Imidazol über 20 CV
Reinigung der Säule:	1 M Imidazol für 10 CV

Spülen und Lagerung der Säule: spülen mit 10 CV H₂O; Lagerung in 20 % EtOH

Der Lauf wurde über Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm verfolgt und die Elutionsfraktionen anschließend mittels SDS-PAGE (3.4.3) weiter analysiert. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Dialyse (3.3.10) in den gewünschten Puffer überführt.

3.3.5 StrepTactin-Affinitätschromatographie

Neben anderen Techniken der Affinitätschromatographie können Proteine auch durch die N- oder C-terminale Fusion mit dem 8 Aminosäure langen *strep-II[®]-tag* (Sequenz: WSHPQFEK) selektiv gereinigt werden. Dieser wird sehr stark und hochspezifisch in der Biotinbindetasche von StrepTactin, einer verkürzten und durch Protein-*engineering* modifizierten Version von Streptavidin, gebunden. Die Elution erfolgt anschließend mittels eines Gradienten von d-Biotin oder seinem Analogon d-Desthiobiotin, welche mit dem Protein um die Bindestellen an StrepTactin konkurrieren. Anschließend muss zur Regenerierung das d-Biotin bzw. d-Desthiobiotin, durch einen Überschuss an 4-Hydroxyazobenzen-2-carboxylsäure (HABA), vom StrepTactin entfernt werden. Nach Äquilibrierung mit Puffer können dann weitere Proteine durch Affinitätschromatographie am StrepTactin gereinigt werden.

Die Reinigung von YbiB mit C-terminalem *strep-II[®]-tag* wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung der ÄKTA Basic 10 better Chromatographie-Anlage (GE HEALTHCARE) und einer Strep-Tactin Superflow Plus 1 ml Säule (QIAGEN; Säulenvolumen (CV): 1 ml; max. Druck: 0,5 MPa) durchgeführt. Dabei wurde nach folgender Methode vorgegangen:

Flussrate:	1 ml/min
Äquilibrierung:	50 mM NP pH 8,0, 300 NaCl, für 10 CV
Beladen:	Probe in 50 mM NP pH 8,0, 300 NaCl
Waschen:	50 mM NP pH 8,0, 300 NaCl, für 10 CV
Eluieren:	0 – 2,5 mM d-Desthiobiotin über 20 CV
Regenerieren der Säule:	50 mM NP pH 8,0, 300 NaCl, 1 mM HABA für 10 CV
Spülen und Lagerung der Säule:	spülen mit 10 CV 50 mM NP pH 8,0, 300 mM NaCl; Lagerung in diesem Puffer bei 4°C

Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.4.3). Fraktionen,

die gereinigtes YbiB enthielten, wurden vereinigt und mittels Dialyse (3.3.10) in den gewünschten Puffer überführt.

3.3.6 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung von geladenen Molekülen, wobei diese mit Salzionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauschmatrix konkurrieren. Zuerst bindet das geladene Molekül an die fixierten Ladungen des Trägermaterials. Im Anschluss daran erfolgt dessen Verdrängung und Elution entweder durch eine steigende Salzkonzentration oder durch die Änderung des pH-Wertes. Bei Trägermaterialien, die selbst positive Ladungen aufweisen und Anionen zu binden vermögen, spricht man von Anionenaustauschern, während man bei negativ geladenem Trägermaterialien, welche Kationen binden können, von Kationenaustauschern spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Anionenaustauschersäule MonoQ 5/50 GL (GE HEALTHCARE, CV: 1 ml) gearbeitet. Diese wurde verwendet, um nach dem UV-vermittelten *crosslink* (3.3.9) YbiB und freie DNA vom kovalent verknüpften Komplex zu trennen und diesen so für die Co-Kristallisation zu reinigen. Dabei wurde ausgenutzt, dass sich freies YbiB, der Protein-DNA Komplex und die DNA deutlich in ihrer Nettoladung unterscheiden und somit nacheinander von der Anionenaustauschersäule eluieren.

Die Reinigung wurde an der Chromatographieanlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate:	1 ml/min
Äquilibrierung:	100 mM KP pH 7,5 für 5 CV
Beladen:	Probe in 50 mM TrisHCl, 100 mM KP pH 7,5
Waschen:	100 mM KP pH 7,5 für 10 CV
Eluieren:	0 – 350 mM KCl über 25 CV
Reinigung der Säule:	1 M NaCl für 10 CV
Spülen und Lagerung der Säule:	spülen mit 10 CV H ₂ O; Lagerung in 20 % EtOH

Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.4.3). Fraktionen, die den gereinigten YbiB-DNA Komplex enthielten, wurden vereinigt, einkonzentriert (3.3.11) und über Dialyse (3.3.10) in den gewünschten Puffer überführt.

3.3.7 Heparinchromatographie

Bei Heparin handelt es sich um ein Polysaccharid mit variabler Kettenlänge und einer molaren Masse zwischen 4 und 40 kDa. Jede Untereinheit ist zusätzlich mit einer Sulfatgruppe funktionalisiert, was dem Molekül eine polyanionische Gesamtladung verleiht. Heparin zeigt somit eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum Rückgrat von Oligonukleotiden. Proteine, die aufgrund von ionischen Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren interagieren, werden somit auch von Heparin gebunden und können so selektiv gereinigt werden. Dazu wird Heparin auf einem Trägermaterial immobilisiert und das Nukleinsäuren-bindende Protein daran gebunden. Im Anschluss erfolgt dessen Verdrängung und Elution durch eine steigende Salzkonzentration.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Chromatographie mit einer Heparin-Sepharose-Säule zur weiteren Trennung und Analyse des Formaldehyd vermittelten *crosslinks* von YbiB mit Nukleinsäuren *in vivo* verwendet (4.4.3). Dazu wurde zunächst ausgehend vom Heparin-Sepharose-CL6B-Säulenmaterial (GE HEALTHCARE) nach Herstellerangaben eine Säule mit einem Gesamtvolumen von ca. 1 ml gegossen.

Die Reinigung wurde an der Chromatographieanlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate:	0,4 ml/min
Äquilibrierung:	50 mM KP pH 7,5 für 5 CV
Beladen:	Probe in 50 mM KP pH 7,5
Waschen:	50 mM KP pH 7,5 für 5 CV
Eluieren:	0 – 2 M NaCl über 15 CV
Reinigung der Säule:	2 M NaCl für 10 CV
Spülen und Lagerung der Säule:	spülen mit 10 CV H ₂ O; Lagerung in 20 % EtOH

Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.4.3).

3.3.8 Expression und Reinigung von YbiB Varianten unter Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure

Zur Vorbereitung der Expression von rekombinanten Proteinen unter Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren nach der von Wang und Schultz (2001) entwickelten Methode (**Abbildung 3.4**), mussten Doppeltransformanten hergestellt werden, die das Hilfsplasmid (codiert das Paar orthogonaler Aminoacyl-tRNA-Synthetase und die

entsprechende tRNA) und das Expressionsplasmid (enthält das Gen mit der TAG Mutation) enthalten.

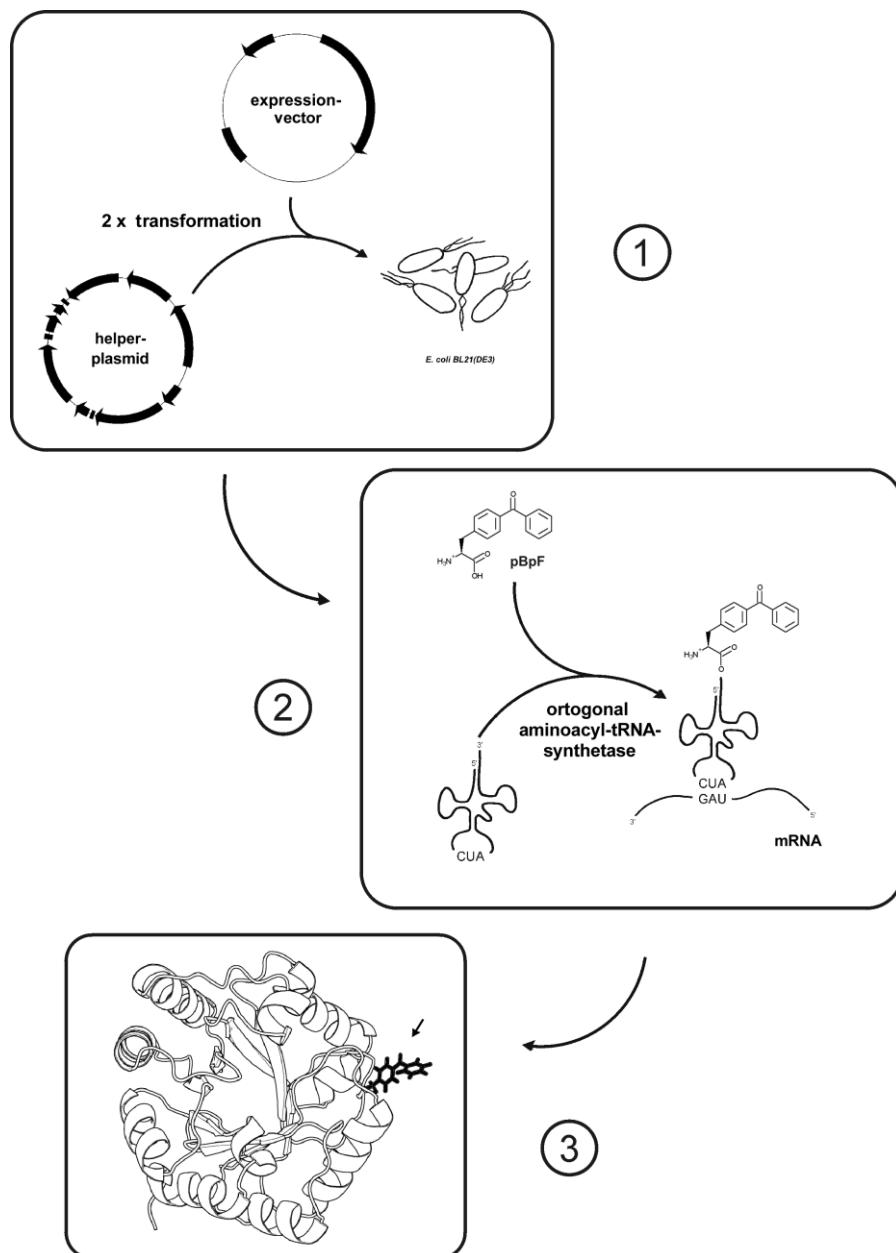


Abbildung 3.4: Prinzip der Methode für den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren *in vivo*. Schritt 1: Der *E. coli* Expressions-Stamm wird mit dem Helperplasmid und dem Expressionsplasmid transformiert. Das Helperplasmid enthält die orthogonale Suppressor-tRNA_{CUA} und die zugehörige orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Das Expressionsplasmid enthält die Gensequenz mit dem Stop-Codon TAG an der Position, an der die nichtnatürliche Aminosäure (hier p-Benzoyl-L-Phenylalanin) eingebaut werden soll. Schritt 2: Die orthogonale Suppressor-tRNA_{CUA} wird durch die zugehörige Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit der nichtnatürlichen Aminosäure beladen. Schritt 3: Die nichtnatürliche Aminosäure wird kotranslational an der durch das Stop-Codon TAG spezifizierten Position eingebaut (Pfeil). Abbildung modifiziert nach Peterhoff (2009).

Zunächst wurden die beiden *ybiB*-Varianten mit TAG-Mutationen an den für H204 und Y207 codierenden Positionen mittels OE-PCR hergestellt (3.2.6). Diese Konstrukte wurden anschließend über die *Nco*I- und *Bgl*II-Schnittstelle in das pQE60-Expressionsplasmid ligiert (3.2.11) und mit diesen Konstrukten *E. coli* NEB turbo-Zellen transformiert (3.1.3). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR (3.2.5) und Sequenzierung (3.2.12) überprüft. Positive Klone mit einem Insert korrekter Sequenz wurden für die weiteren Schritte verwendet.

Chemisch kompetente *E. coli* M15-Zellen wurden zunächst mit dem Hilfsplasmid (pEVOL) transformiert (3.1.3). Eine Einzelkolonie wurde dann in 50 ml LB-Medium angezogen, daraus elektrokompetente Zellen hergestellt und diese anschließend mit dem Expressionsplasmid transformiert (3.1.3). Der Erfolg der Doppeltransformation wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (3.2.5).

Bei der Proteinexpression zum Einbau von p-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBPA) wurde die nichtnatürliche Aminosäure in einer Endkonzentration von 1mM dem Medium zugesetzt. Dafür wurde die entsprechende Menge pBPA eingewogen, in einem geeigneten Volumen 1 M HCl (steril filtriert) gelöst und sofort dem entsprechenden Volumen LB-Medium zugegeben. Um den pH-Wert des Mediums wieder zu neutralisieren, wurde anschließend eine der Salzsäure entsprechende Menge 1 M NaOH zugegeben. Der korrekte pH-Wert des Mediums (zwischen 7 und 8) wurde überprüft und erst im Anschluss die benötigten Antibiotika Amipicillin und Chloramphenicol zugegeben.

Die präparative Expression der *ybiB* Varianten zum Einbau von pBPA erfolgte in einem Volumen von 1 bis 5 l. Im Unterschied zum *ybiB* Wildtyp wurden die Kolben nach der Induktion mit 0,5 mM IPTG bei 37°C für 6 h oder bei 20°C üN unter Schütteln inkubiert. Ansonsten wurden die Varianten wie unter 3.3.3 beschrieben exprimiert und über ihren *his6-tag* gereinigt (3.3.4).

3.3.9 Photoinduzierte Quervernetzung von YbiB mit einzelsträngigen Nukleinsäuren über pBPA

Proteine, die die nichtnatürliche Aminosäure pBPA tragen, können durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge um $\lambda = 366$ nm mit anderen Proteinen oder Liganden wie Nukleinsäuren kovalent verknüpft werden (Kauer et al., 1986; Dorman and Prestwich, 1994; Chin et al., 2002). Der Mechanismus dieser Reaktion ist in **Abbildung 3.5** dargestellt. Als Reaktionspartner von pBPA können dabei alle C-H-Bindungen dienen, die sich in einem Abstand von 2,5-3,1 Å zur nichtnatürlichen Aminosäure befinden (Dorman et al., 1994).

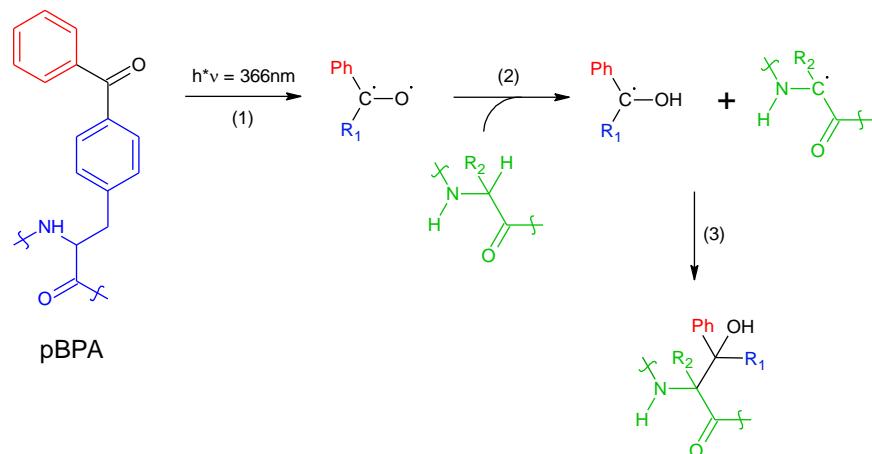


Abbildung 3.5: Reaktionsmechanismus des photoinduzierten *crosslinking* über pBPA. (1) Absorption eines Photons bei etwa 366 nm und Anregung der π -Bindung. (2) Das halbbesetzte n-Orbital des Sauerstoffatoms verhält sich elektrophil und interagiert mit einer schwachen C-H- σ -Bindung unter Abstraktion des Wasserstoffatoms (hier beispielhaft das Wasserstoffatom des α -Kohlenstoffatoms einer Aminosäure aus einem Protein). (3) Die entstandenen Ketetyl- und Alkyl-Radikale rekombinieren zu einer neuen C-C- σ -Bindung (Dorman et al., 1994). Abbildung modifiziert nach Peterhoff (2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde pBPA genutzt, um YbiB kovalent mit einzelsträngigen Nukleinsäuren zu verknüpfen und so die Kristallisation dieses Komplexes zu ermöglichen. Dazu wurde YbiB (10-30 μ M) mit einem zweifachen molaren Überschuss eines 12b dT Oligonukleotids in 50 mM Tris-HCl, 2 mM KP pH 7,5 gemischt und dieser Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einer 96-well-Platte zu je 20 μ l aliquotiert, für 10-15 min direkt unter einer UV-Handlampe platziert und bestrahlt. Die Proben wurden nun wieder vereinigt. Bei größeren Volumina wurde das Protein-Nukleinsäure-Gemisch in eine Petrischale pipettiert und dort bestrahlt.

Die Auswertung der Quervernetzung erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE (3.4.3). Sollte der quervernetzte Komplex zwischen YbiB und der ssDNA gereinigt werden (3.3.6) wurde dem Reaktionsansatz Kaliumphosphat in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. So konnten nichtkovalente Bindungen zwischen YbiB und dem Oligonukleotid gelöst werden, wodurch eine selektive Reinigung des Komplexes möglich war.

3.3.10 Dialyse von Proteinlösungen

Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden nach der chromatographischen Reinigung und auch zum Wechsel der Pufferbedingungen gegen ein mindestens 100-faches des Probenvolumens an gewähltem Puffer dialysiert. Dazu wurde die Probe in einem nach Herstellerangaben mit EDTA ausgekochten und in Pufferlösung äquilibrierten Dialyseschlauch (SERVA) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa unter Rühren zweimal für je 6-8 h bei 4°C dialysiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine gegen 50 mM Tris-HCl, 2 mM KP, pH 7,5 dialysiert und in diesem Puffer gelagert.

3.3.11 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe der AMICON MW-15 Zentrifugenröhren über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben durch Ultrafiltration (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Ausgangsvolumen der zu konzentrierenden Proteinlösung und dem gewünschten Endvolumen.

3.3.12 Lagerung von gereinigten Proteinen

Die konzentrierte Proteinlösung wurde in kleinen Volumina (10-20 µl) in flüssigen Stickstoff eingetropft und als feste Kügelchen bei -80°C gelagert.

3.3.13 Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen

Um Proteine quantitativ aus einer Lösung zu entfernen, wurden sie mit Aceton gefällt. Dazu wurden der Probe vier Volumen -20°C kaltes Aceton zugegeben, gemischt und die Lösung für 1 h bei -20°C inkubiert. Die aggregierten Proteine wurden durch Zentrifugation (45 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und weiter verarbeitet.

3.3.14 Co-Immunpräzipitation

Proteine können durch ihre Interaktion mit spezifischen Antikörpern aus Zelllysaten gereinigt werden. Bei der Co-Immunpräzipitation versucht man die Bedingungen so zu wählen, dass auch Interaktionspartner des zu reinigenden Proteins aus dem Zelllysat gefischt und anschließend identifiziert werden können. In dieser Arbeit sollte genomisch codiertes YbiB mit C-terminalem *flag-tag* mit einem Anti-Flag-Antikörper M2 (SIGMA-ALDRICH) im Zellextrakt interagieren und anschließend der Antikörper an Protein A-Sepharose gebunden werden. Durch Zentrifugation sollte der Komplex aus YbiB, dem Antikörper und Protein A-Sepharose, zusammen mit möglichen Interaktionspartnern von YbiB aus dem Zelllysat gereinigt werden.

Zur Gewinnung des Zelllysats wurden zunächst 50 ml LB-Medium aus einer frischen Vorkultur mit *E. coli* MG1655-*ybiB::flag-cat*-Zellen auf eine OD₆₀₀ = 0,1 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln 3 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (10 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R) und das Pellet in 2 ml Co-Immunpräzipitationspuffer aufgenommen. Die OD₆₀₀ wurde nochmals bestimmt und anschließend 1·10¹⁰ Zellen in einem Volumen von 800 µl durch gepulste Sonizierung auf Eis aufgeschlossen (BRANSON Sonifier 250D, Mikrospitze, 20 % Leistung, 1,5 min, 5 s Leistung/5 s Pause). Das Zelllysat wurde nochmals zentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zunächst wurden Proteine entfernt, die unspezifisch an den Anti-Flag- Antikörper oder die Protein-A-Sepharose gebunden hatten. Für diese Vorreinigung wurden 2 μ l unspezifischer Kaninchen Antikörper (SIGMA ALDRICH) dem Zellextrakt zugesetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Protein A Sepharose wurde 1:10 in Immunpräzipitationpuffer verdünnt und anschließend 100 μ l dieser Verdünnung zum Ansatz pipettiert. Nach 1 h Inkubation unter Schütteln bei 4°C wurde die Protein A Sepharose, mit gebundem Antikörper und unspezifisch bindenden Proteinen durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt (10 s, 10000g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R).

Der Überstand der Vorreinigung wurde mit 2 μ l (2 μ g) Anti-Flag M2 Antikörper versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Die anschließende Bindung des Antikörpers an die Protein A Sepharose erfolgte analog zur Vorreinigung. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert (10 s, 10000g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in der Folge dreimal mit 750 μ l Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde die verbliebene Protein A Sepharose in 32 μ l Puffer aufgenommen. Die weitere Analyse der Proben erfolgte mit SDS-PAGE (3.4.3) und *western blot* (3.4.6).

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cystine (Disulfidbrücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von 250-300 nm. Aus der Anzahl dieser Aminosäuren in einem Protein kann dessen molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ε_{280}) und bei bekanntem Molekulargewicht der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1\%}A_{280}$) mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet werden:

$$\varepsilon_{280} = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

Formel 1: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ε_{280} .

$$^{0,1\%}A_{280} = \frac{\varepsilon_{280}}{M_R}$$

Formel 2: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$.

ε_{280} :

molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

$^{0,1\%}A_{280}$:

spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{cm}^2 \text{ mg}^{-1}$]

M_R :

relative Masse des Proteins (Molekulargewicht)

Unter Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann daraus die Proteinkonzentration berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{d \cdot 0,1\% A_{280}}$$

Formel 3: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $0,1\% A_{280}$.

- c: Konzentration [mg ml^{-1}]
 A₂₈₀: Absorption bei 280 nm
 d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Spektrum von 220-340 nm aufgenommen, wobei das Absorptionsmaximum sich idealerweise bei 280 nm befindet.

In **Tabelle 3.2** sind die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten, sowie die Molekulargewichte (relative Molekülmasse) der bearbeiteten Proteine aufgelistet.

Tabelle 3.2: Molekulargewicht (M_R), molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_{280}) und spezifischer Extinktionskoeffizient ($0,1\% A_{280}$) der verwendeten Proteine (inkl. tag).

Protein	M_R (Da)	ϵ_{280} [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$0,1\% A_{280}$ [$\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$]
aaTrpD2_wt_his ₆	36068	28015	0,777
ecDeoA_wt_his ₆	48047	24660	0,513
ssTrpD_wt_his ₆	38413	11920	0,310
YbiB_-wt_his ₆	35888	22055	0,615
YbiB_wt_strep	36106	27555	0,768
YbiB_E54A_his ₆	35816	22055	0,616
YbiB_E58A_his ₆	35816	22055	0,616
YbiB_H204A_his ₆	35808	22055	0,616
YbiB_Y207_his ₆	35782	20565	0,575
YbiB_L224A_his ₆	35832	22055	0,616
YbiB_E229A_his ₆	35816	22055	0,616

Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte bei der Messung mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, da diese auf durch Aggregation hervorgerufene Lichtstreuung hindeutet.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Eine weitere quantitative Methode zur Proteinbestimmung in wässriger Lösung ist der Bradford-Test. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G250 bindet unspezifisch an Proteine. Dadurch verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm (Bradford, 1976). Die Bindung erfolgt vorwiegend an die kationischen, unpolaren und hydrophoben Aminosäureseitenketten. Im Bereich einer Proteinkonzentration von 0,2-1,4 mg/ml ist die Absorption des Farbstoffs bei 595 nm linear und kann mit Hilfe einer Kalibriergerade mit der eingesetzten Proteinkonzentration korreliert werden.

Der Bradford *assay* wurde zur Konzentrationsbestimmung der YbiB-Varianten mit inkorporierter pBPA eingesetzt. Die nichtnatürliche Aminosäure absorbiert im Bereich von 260 bis 280 nm und verfälscht somit eine Messung der Proteinkonzentration durch Absorption in nicht bekanntem Ausmaß.

Beim Bradford *assay* wurde (ggf. verdünnte) Proteinlösung und Bradford-Reagenz (BIORAD) im Verhältnis 1:5 (v/v) gemischt und 5-30 min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen eine Referenz aus Protein-Puffer und Bradford-Reagenz gemessen. Anhand einer Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin wurde die Proteinmenge anhand folgender Gleichung bestimmt:

$$c = \frac{A_{595} - y_0}{m}$$

Formel 4: Berechnung der Proteinkonzentration c [mg/ml] nach Bradford

A ₅₉₅ :	Absorption bei 595 nm
y ₀ :	y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade
m:	Steigung der Kalibriergerade

3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS Polyacrylamidgelektrophorese dient zur Auf trennung von Proteinen nach deren Größe (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Es wurden stets 12,5 %ige Polyacrylamidgele verwendet (2.8.5). Die Elektrophorese wurde bei 250 V und 45 mA für etwa 35 min durchgeführt (HOEFER PHARMACIA BIOTECH, Elektrophoresekammer Mighty Small II). Das Molekulargewicht der Proteine konnte, nach dem Färben, durch Vergleich mit einem Größenstandard (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*, MBI FERMENTAS) abgeschätzt werden.

3.4.4 Färbung von SDS Gelen mit *Coomassie Brilliant Blue G250*

Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G250 färbt Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 0,2-0,5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Die Gele wurden hierzu 15 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss, zum Entfernen der unspezifischen Färbung, in der Mikrowelle in Wasser aufgekocht (3x, je 1-2 min).

3.4.5 Silberfärbung von SDS Gelen

Bei der Silberfärbung ist es möglich Proteine bis zu einer Menge von 10-1,0 ng/mm^2 nachzuweisen. Der Färbeprozess beruht dabei auf verschiedenen Oxidationszuständen von Silberionen, die an die Aminosäureketten des Proteins gebunden werden.

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel 30 min in Fixierlösung I und anschließend für 60 min in Fixierlösung II geschwenkt. Das Gel wurde nun dreimal für jeweils 10 min mit ddH₂O gewaschen und im Folgenden für 30 min in 0,1 %iger Silbernitratlösung inkubiert. Die eigentliche Färbereaktion erfolgte durch Überschichtung des Gels mit der Entwicklerlösung, bis sich der gewünschte Kontrast eingestellt hatte. Die Reaktion wurde durch Schütteln in 50 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde das Gel in ddH₂O gewaschen (Heukeshoven and Dernick, 1988).

3.4.6 *Western blot*

Western blots dienen der spezifischen Identifizierung und Quantifizierung von einzelnen Proteinen in komplexen Gemischen. Dabei erfolgt die Detektion des Zielproteins in Gesamt-Zellprotein-Präparationen oder in Gewebelysaten mit Hilfe hochspezifischer Antikörper, die mit einem Marker gekoppelt sind (Towbin et al., 1979).

Transfer der Proteinbanden auf eine PVDF-Membran mittels *Tankblot*-Apparatur

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben wurden mit Hilfe eines *Tankblotters* (PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S, PEQLAB, Erlangen) vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, MILLIPORE, Schwalbach) übertragen (*geblottet*). Diese ermöglicht die unspezifische Bindung von Protein über hydrophobe Wechselwirkungen.

Die verwendete Membran Immobilon-P (MILLIPORE; 0,45 μm Porengröße) wurde gemäß Herstellerangaben vor Gebrauch zur Aktivierung 1 min lang in 100 % Methanol geschwenkt. Nach dem Zuschneiden wurde die Membran zusammen mit dem SDS-Gel und Filterpapieren für 15 min im Transfer-Puffer (2.8.7) inkubiert und wie in **Abbildung 3.6** dargestellt in der *Tankblot*-Apparatur angeordnet.

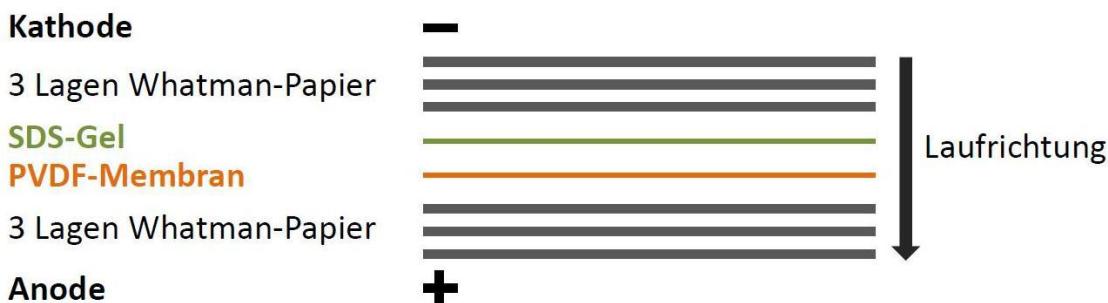


Abbildung 3.6: Anordnung der Komponenten in der blot-Apparatur. -, Kathode, +, Anode. Der Pfeil zeigt die Wanderrichtung der durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld an. Dadurch erfolgt eine Übertragung der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran.

Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei 220 mA und maximal 150 V. Anhand der Übertragung des vorgefärbten Größenstandards (*PageRuler™Prestained Protein Ladder*, MBI FERMENTAS) war der Erfolg des Transfers sichtbar.

Transfer der Proteinbänder mittels Elektroblotverfahren (semi-dry)

Alternativ wurde zum Übertragen von Proteinen auf eine PVDF-Membran das Elektroblotverfahren verwendet (TE70, HOEFER Pharmacia Biotech Inc.). Die Vorbereitungen, sowie in Anordnung der PVDF-Membran, des SDS-Gels und der Filterpapiere erfolgten analog zum *Tankblot*-Verfahren.

Das *blotten* wurde anschließend bei 44 mA (0.8 mA pro cm² Gel) und 300 V für 60 min durchgeführt.

3.4.7 Immundetektion von Proteinen

Die auf der Membran frei zugänglichen Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern z. B. gegen ihren *his₆-tag* sichtbar gemacht. Dazu wurden nach dem Transfer unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran durch Inkubation für 1 h bei RT in Blockierungspuffer (2.8.7) gesättigt und die Membran anschließend für 1 h in Antikörperlösung (Anti-*his₆-tag*, Peroxidase-konjugiert 1:500) in Blockierungspuffer geschwenkt. In der Folge wurde die Membran 3 x je 10 min mit Waschpuffer PBS-T gewaschen. Danach erfolgte die spezifische Detektion von gebundenem Antikörper mit Hilfe des *SuperSignal West Pico Kits* (PIERCE) nach den Angaben des Herstellers. Der Anti-*his₆-tag* Antikörper ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert, welche das im *SuperSignal West Pico-Kit* enthaltene Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert. Die Lumineszenz von 3-Aminophthalat bei 425 nm wurde durch Auflegen (Expositionszeit 4 s bis ca. 3 min, abhängig von der Leuchtintensität) und Entwickeln von Röntgenfilmen (Super RX 100NF, FUJIFILM, Düsseldorf) sichtbar gemacht.

Die Detektion von *flag-getagten* Proteinen wurde mit Anti-*flag*-Antikörper M2 (primärer AK 1:1000, 90 min) durchgeführt. Dieser Antikörper liegt nicht Peroxidase-

konjugiert vor. Somit wurde die Membran nach den Waschschriften mit einem sekundären Antikörper (Anti-Mouse IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:5000) für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran nochmals 3 x je 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte wiederum mit Hilfe des SuperSignal West Pico Kits.

Der Nachweis des strep-tags wurde mit Anti-strep-tag II-Antikörpern (primärer AK, 1:2000, 60 min) durchgeführt. Da dieser Antikörper ebenfalls nicht Peroxidase-konjugiert vorliegt, wurde die Membran nach den Waschschriften zusätzlich mit einem sekundären Antikörper (Anti-Mouse IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:5000) für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran nochmals 3 x je 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Reagenz und Röntgenfilm.

3.4.8 Expressionsanalyse von *ybiB*

Aus einer frischen üN-Kultur mit *E. coli* MG1655 *ybiB::his₆-cat*-Zellen wurden 50 ml LB-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und 1,5 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde den Kulturen verschiedene Mengen Mitomycin C zugegeben und sie für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R) geerntet, in 700 μ l Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (BRANSON Sonifier 250D, Mikrospitze, 20 % Leistung, 1,5 min, 2 s Leistung/2 s Pause). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (40 min, 16000g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) wurde die Proteinkonzentration der Überstände durch Bradfordassay bestimmt (3.4.2). Anschließend wurden 30 μ l Ni²⁺-IDA-beads zum Aufkonzentrieren von YbiB zugegeben und die Mischungen 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die beads wurden abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die beads dreimal mit 50 mM KP pH 7,5, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol gewaschen. Die beads wurden in 40 μ l Aufschlusspuffer resuspendiert und eine SDS-PAGE durchgeführt (3.4.3). Dabei wurde für jede Probe eine äquivalente Menge an Gesamtprotein auf das Gel geladen. Das Gel wurde *geblottet* (3.4.6) und YbiB mit dem Peroxidase-konjugierten anti *his₆*-Antikörper detektiert (3.4.7).

3.4.9 *In vivo* Formaldehyd crosslinking

Die Methode wird verwendet, um Nukleinsäuren in lebenden Zellen kovalent an Proteinen zu fixieren und anschließend diesen Komplex zu reinigen und die gebundenen Nukleinsäuren zu analysieren (Wade and Struhl, 2004).

Zum crosslinking mit plasmidcodiertem YbiB wurde zunächst 1 l LB_{Amp}-Medium aus einer frischen üN-Kultur *E. coli* M15 pQE60_ybiB auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 2,5 h wurde die Expression von *ybiB* mit verschiedenen Mengen IPTG (0-0,5 mM) induziert und die Zellen für 2 h weiter inkubiert. Anschließend wurde den Kulturen Formaldehyd (ad 0,005 % - 1 % v/v)

zugegeben und diese bei 37°C für 1–20 min weiter geschüttelt. Durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration: 0,5 M) wurde die Quervernetzungsreaktion gestoppt. Nach weiteren 15 min bei 37°C wurden die Zellen geerntet (15 min, 4000 rpm, 4°C, SORVALL GS3-Rotor) und das Pellet in 30 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden aufgeschlossen (BRANSON Sonifier 250D, Makrospitze, 40 % Leistung, 2 min, 5 s Leistung/5 s Pause), das Zelllysat zentrifugiert (40 min, 13000 rpm, 4°C, SORVALL SS34-Rotor) und YbiB aus dem löslichen Überstand über Metallchelataffinitätschromatographie an einer 5 ml HisTrapCrude FF-Säule (GE HEALTHCARE) mittels eines Stufengradienten (25 mM, 85 mM und 500 mM Imidazol, je 5 CV) gereinigt.

Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Fraktionen, die YbiB enthielten, wurden vereinigt, in ddH₂O umgepuffert und auf ein Volumen von ca. 200 µl einkonzentriert. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 10 h wurde die reversible Formaldehydverknüpfung zwischen Protein und Nukleinsäuren wieder gelöst und die ausgefallenen Proteine anschließend durch Zentrifugation entfernt (45 min, 16000 g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5415R). Der Überstand wurde abgenommen und die Nukleinsäuren weiter analysiert (3.4.10 & 3.4.11).

Für das *crosslinking* mit genomisch codiertem YbiB wurde 1 l LB-Medium aus einer frischen üN-Kultur *E. coli* MG1655-*ybiB::his6-cat* bzw. -*ybiB::strep-cat* auf eine OD₆₀₀ = 0,1 angeimpft und 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Expression von *ybiB* durch Zugabe von 0,2 µg/ml MitomycinC induziert und 2 h weiter bei 37°C geschüttelt. Der Formaldehyd *crosslink*, die Zellernte und der Aufschluss wurden wie bei den Ansätzen mit plasmidcodiertem YbiB durchgeführt. Wurde mit dem *ybiB::his6*-Stamm gearbeitet, erfolgte auch die Reinigung wie zuvor beschrieben, mittels 5 ml HisTrapCrude FF-Säule und Stufengradienten. Wurde *strep*-markiertes YbiB gereinigt, dann wurden dem löslichen Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation 40 µl StrepTactin *Super Flow Plus* Material (QIAGEN) zugegeben. Der Ansatz wurde 60 min unter Schütteln inkubiert, anschließend die *beads* abzentrifugiert (30 s, 3200g, 4°C, EPPENDORF Centrifuge 5810R). Der Überstand wurde abgenommen und das StrepTactin-Säulenmaterial 3x mit 1 ml Aufschlusspuffer II gewaschen. Die *beads* wurden in 200 µl ddH₂O aufgenommen, anschließend der *crosslink* zwischen YbiB und Nukleinsäuren wie zuvor beschrieben gelöst und die Analyse der Nukleinsäuren vorgenommen (3.4.10 & 3.4.11).

3.4.10 Nukleosid-Präparation für HPLC-Analytik

Für die enzymatische Spaltung von DNA und RNA in Nukleoside wurde das Protokoll nach Crain (1990) leicht modifiziert.

Zunächst wurden die Nukleinsäuren durch 5-minütiges Erhitzen bei 100°C und sofortiges Abkühlen auf -20°C denaturiert. Dem Ansatz wurde 0,1 Volumen 0,1 M

NH_4OAc pH 5,3 und Nuklease P₁ (1 U / 10 μg Nukleinsäuren) zugegeben. Bei 45°C für 2 h erfolgte die Spaltung der Oligonukleotide in NMPs bzw. dNMPs. Zur Vervollständigung des Verdaus wurden 0,1 Volumen 1 M NH_4HCO_3 und Phosphodiesterase I (0,001 U / 10 μg Nukleinsäuren) zugegeben und die Inkubation 2 h bei 37°C fortgesetzt. Die 5'-Phosphatgruppen wurden schließlich durch eine alkalische Phosphatase (CIP, 5 U; 1h, 37°C) entfernt. Die Ansätze wurden mit Aceton gefällt (3.3.13), um die enthaltenen Proteine zu entfernen. Die Überstände der Fällung wurden gefriergetrocknet, die Rückstände anschließend in Wasser gelöst und bis zur Analyse mittels HPLC bei -20°C gelagert.

3.4.11 High performance liquid chromatography (HPLC)

Bei der HPLC-Analytik können die verschiedenen Komponenten eines Substanzgemisches mit sehr hoher Empfindlichkeit und Trennschärfe detektiert werden. Dabei wird die Probe chromatographisch auf einer Säule getrennt und mit Hilfe unterschiedlichster Detektionsverfahren ein Elutionsprofil erstellt. Je nach den zu trennenden Substanzen werden verschiedene Typen von Laufmitteln und Säulen eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HPLC-Analytik zur Trennung von Nukleosidgemischen verwendet. Dies geschah mittels einer *reversed phase* Säule und eines NH_4OAc -Acetonitril-Gradienten (Pomerantz and McCloskey, 1990). Beim Säulenmaterial handelt es sich um Kieselgel, das mit langen Kohlenwasserstoffketten modifiziert ist. Dadurch entsteht eine apolare Oberfläche, an die Substanzen über hydrophobe Wechselwirkungen binden können. Zur Elution wird häufig die Gradiententrennung mit einem wässrigen Puffer und einem organischen Lösungsmittel verwendet. Durch Zumischen des organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase sinkt die Polarität des Laufmittels, wodurch seine Elutionskraft steigt. Die an die Säule gebundenen Substanzen eluieren also gemäß ihrer Polarität, wobei sich polare Stoffe vor den unpolaren von der Säule lösen.

Für die Trennung der Nukleoside wurde das HPLC System LC 1200 (AGILENT) verwendet. Dabei kamen drei verschiedene *reversed phase* Säulen zum Einsatz (BISCHOFF Kromasil100 C18 5 μm , 250 x 4 mm; SUPELCO Supelcosil C18S 5 μm , 250 x 2,1 mm; PHENOMENEX LunaPFP 3 μm , 150 x 3 mm). Die Elution erfolgte stets mit einem Gradienten von 20 oder 40 mM NH_4AC , pH 6 (Puffer A) nach 40 % Acetonitril (Puffer B). Dabei wurden die Dauer der einzelnen Gradientenschritte, sowie die Flussraten der Methode jeweils an die Größe und Eigenschaften der einzelnen Säulen angepasst. Eine Übersicht über die bei den verschiedenen Säulen verwendeten Elutionsgradienten findet sich in **Tabelle 3.3**.

Tabelle 3.3: Gradienten zur Trennung von Nukleosiden.

Säule	Bischoff Kromasil C18		Supelco Supelcosil C18		Phenomenex Luna PFP	
Flussrate	0,5 ml/min		0,2 ml/min		0,35 ml/min	
	Zeit [min]	Anteil B [%]	Zeit [min]	Anteil B [%]	Zeit [min]	Anteil B [%]
	0	0	0	0	0	0
	3	0	3	0	1,8	0
	4,4	0,2	4,4	0,2	2,6	0,2
	5,8	0,8	5,8	0,8	3,5	0,8
	7,2	1,8	7,2	1,8	4,3	1,8
	8,6	3,2	8,6	3,2	5,2	3,2
	10	5	10	5	6	5
	25	25	25	25	15	25
	30	50	30	50	18	50
	34	75	34	75	20,4	75
	37	75	37	75	22,2	75
	45	100	45	100	27	100
	48	100	48	100	28,8	100
	53	0	53	0	31	0

Während der Läufe wurden die Säulen konstant auf 30°C temperiert und die Elution durch Messung der Absorption mittels eines Diodenarraydetektors (DAD) verfolgt.

3.4.12 Messung der Bindung von YbiB und aaTrpD2 an Nukleinsäuren

Die Bindung von Proteinen an Liganden kann mit Hilfe von zahlreichen Methoden gemessen werden. Die dabei bestimmten Affinitäten können Informationen über die Funktion der analysierten Proteine liefern. So kann beispielsweise das bevorzugte Substrat identifiziert oder durch Messung unter verschiedenen Pufferbedingungen die Stabilität und Natur der Wechselwirkungen analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von verschiedenen Nukleinsäuren an zwei Vertreter der TrpD2-Proteinfamilie, YbiB und aaTrpD2, untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, die verschiedene Signale detektieren und so eine umfassende und verlässliche Analyse dieser Wechselwirkungen ermöglichen sollten.

Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wurde die Änderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz durch Bindung an Nukleinsäuren verfolgt. Das Signal wird durch die Änderung in der Umgebung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin hervorgerufen. Diese Änderungen entstehen entweder direkt durch die Bindung oder durch damit verbundene Konformationsänderungen. Dabei kann es zu einer Veränderung des Emissionsmaximums, sowie der Quantenausbeute kommen (Schmid, 1997).

Die Bindung von Nukleinsäuren an YbiB und aaTrpD2 wurde in dieser Arbeit durch die Verminderung der Quantenausbeute der Proteinfluoreszenz am Cary Eclipse oder am JASCO FP-6500 Fluoreszenzspektrometer gemessen. Soweit nicht anders angegeben, wurden jeweils 2 μ M Protein in 50 mM TrisHCl, 2 mM Kaliumphosphat pH 7,5 vorgelegt und bei 25°C steigende Mengen an Nukleinsäuren zugegeben. Nach mehreren Minuten Inkubation zur Gleichgewichtseinstellung je Titrationsschritt wurde das Fluoreszenzsignal gemessen. Für YbiB wurde bei 280 nm die Tryptophan- und Tyrosinfluoreszenz angeregt und die Emission bei 340 nm detektiert. Bei aaTrpD2 erfolgte die Anregung, aufgrund der großen Zahl von enthaltenen Tyrosinen, bei 295 nm, um so nur die Änderung der Tryptophanfluoreszenz zu messen. Die Detektion des Emissionssignals erfolgte bei 320 nm. Vor der Datenanalyse wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten noch um den inneren Filtereffekt, der alleine durch Zugabe der Nukleinsäuren hervorgerufen wurde, korrigiert. Dazu wurde die Steigung der Fluoreszenzabnahme nach Sättigung der Bindung an die Proteine bestimmt. Zur Berechnung der thermodynamischen Bindungskonstante K_D wurden die korrigierten Fluoreszenzintensitäten gegen die Nukleinsäurekonzentration aufgetragen und die Daten mit folgender Gleichung *gefittet* (Reinstein et al., 1990):

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot 0,5 \left\{ \left[1 + \frac{(L_0 + K_D)}{E_0} \right] - \left[\left(1 + \frac{(L_0 + K_D)}{E_0} \right)^2 - 4 \frac{L_0}{E_0} \right]^{0,5} \right\}$$

Formel 5: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz von der zutitrierten Ligandenmenge.

F:	korrigierte Fluoreszenzintensitäten
F_0 :	Startwert der Fluoreszenz
F_{max} :	Fluoreszenzintensität in der Sättigung
L_0 :	Konzentration der Nukleinsäurebindestellen
E_0 :	Konzentration an dimeren YbiB bzw. aaTrpD2

Fluoreszenzpolarisation

Bei der Fluoreszenzpolarisation wird als Maß für die Interaktion zwischen Proteinen und Liganden die Änderung ihrer Rotationsgeschwindigkeiten in Lösung gemessen. Dabei wird zunächst der mit einem Fluorophor markierte Ligand in der Küvette vorgelegt und mit linear polarisiertem Licht angeregt. Die angeregten Ligandmoleküle können dann bis zur Emission frei in der Lösung rotieren, was zur Depolarisation des emittierten Lichts führt. Diese wird durch zweimalige Messung der Fluoreszenzintensität, rechtwinklig zueinander, bestimmt. Wird Protein zugegeben und kommt es zur Komplexbildung zwischen Protein und Ligand nimmt die Rotationsgeschwindigkeit des Fluorophors in der Lösung ab. Als Folge ist das Licht bei der Emission stärker polarisiert als zuvor und zeigt so die Interaktion zwischen Ligand und Protein an.

Es wurden 5'-Fluorescein markierte Oligonukleotide verwendet, um die Interaktion mit YbiB zu untersuchen. Dazu wurden $0,5 \mu\text{M}$ Oligonukleotid in 50 mM TrisHCl, 2mM Kaliumphosphat pH 7,5 bei 25°C vorlegt. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda = 485 \text{ nm}$ angeregt und die Emission bei $\lambda = 514 \text{ nm}$ am JASCO FP-6500 Fluoreszenzspektrometer gemessen. YbiB wurde schrittweise, in steigenden Konzentrationen zugegeben, anschließend der Ansatz mehrere Minuten bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert und die Polarisation gemessen. Die Fluoreszenzpolarisationen wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, die daraus resultierende Kurve mit Formel 5 gefitett und so der K_D -Wert für die Bindung bestimmt.

Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Bei der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) handelt es sich um eine optische Messmethode, bei der Massenzunahmen auf einer dünnen Goldoberfläche detektiert werden können. Zur Messung wird polarisiertes Licht unter Bedingungen der Totalreflexion auf die Goldfolie eingestrahlt. Bei einem bestimmten Winkel Θ hat die Intensität des reflektierten Lichts ein Minimum, da in diesem Fall die Photonen mit den Elektronen auf der Oberfläche wechselwirken und so Energie abgeben. Dieser Winkel ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts und vom gesamten Aufbau des Geräts. Veränderungen auf der Goldoberfläche in einem Abstand von bis zu 300 nm führen zu einer Veränderung von Θ und somit zu einer Intensitätszunahme des reflektierten Lichts, welche detektiert wird. Dadurch können Wechselwirkungen von Molekülen auf der Goldoberfläche in Echtzeit und mit sehr geringer Probenmenge gemessen werden.

Ein typisches Experiment zur Interaktionsmessung mit SPR umfasst drei Schritte. Zunächst muss einer der beiden Interaktionspartner (Ligand) auf der Goldoberfläche in ausreichender Menge fixiert werden (Immobilisierung). Anschließend erfolgt die eigentliche Messung, bei der der andere Interaktionspartner (Analyt) über die

Oberfläche gepumpt wird. Kommt es dabei zur Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen, lässt sich aus der beobachteten Änderung von Θ die Assoziationskonstante bestimmen. Anschließend wird die Oberfläche mit Laufpuffer gewaschen, um die Dissoziation des Komplexes zu messen. Am Ende des Messzyklus muss noch auf der Oberfläche verbliebener Analyt entfernt werden (Regeneration). Nach dieser Prozedur steht dann der immobilisierte Ligand für weitere Interaktionsmessungen zur Verfügung. Der schematische Ablauf ist in **Abbildung 3.7** gezeigt.

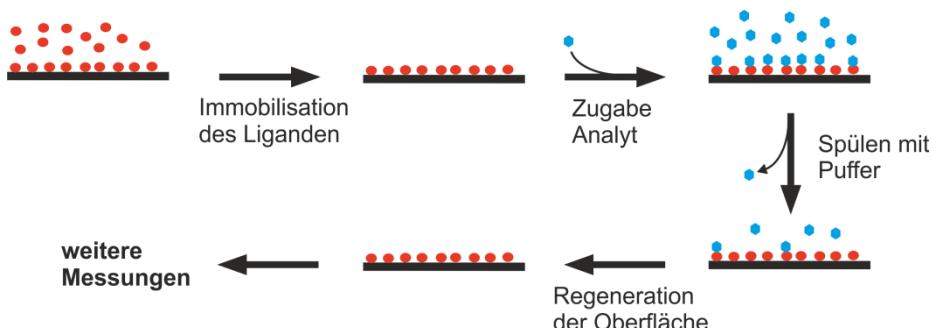


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung einer Interaktionsmessung mit SPR. Zunächst wird Ligand (rot) auf der Goldoberfläche (schwarz) fixiert. Anschließend wird Analyt (blau) zugegeben und die Assoziation der beiden Proteine auf der Oberfläche gemessen. Durch Spülen mit Puffer wird der Analyt wieder entfernt und so die Dissoziationsphase der Bindung detektiert. Abschließend wird bei der Regeneration noch gebundener Analyt entfernt und der Chip kann für die nächste Messung verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von verschiedenen YbiB Varianten mit einem 12 b dT-Oligonukleotid gemessen. Die Experimente wurden an einem Biacore® X100 Gerät (GE HEALTHCARE) durchgeführt. Zunächst wurde ein 5'-biotinyliertes Oligonukleotid auf einem SA-Chip (GE HEALTHCARE) durch die Wechselwirkung von Biotin mit auf dem Chip fixiertem Streptavidin immobilisiert. Dazu wurde eine Zelle (Messzelle) des Chips 15 min mit einer 10 nM Lösung des Oligonukleotids in NaAc-Puffer, pH 5 gespült. Anschließend wurde dreimal für 30 s mit 100 mM NaOH gewaschen, um unspezifisch gebundenen Liganden wieder zu entfernen. Bei der Messung wurden die Proteine in variierenden Konzentrationen (0 – 5 μ M) jeweils 2 min über den Chip gepumpt und dabei die Assoziation gemessen. Die Dissoziation der Bindung wurde für 10 min verfolgt. Als Laufpuffer diente bei den Messungen der Dialysepuffer der Proteine (50 mM TrisHCl, 2 mM KP, pH 7,5), dem 0,01 % (v/v) Tween-20 zugesetzt worden war. Zur Regeneration wurde die Oberfläche 5 min mit 1 M NaCl gespült.

Bei der Auswertung der Daten wurde vom Signal der Messzelle die unspezifische Bindung an die Oberfläche der nicht mit Oligonukleotid inkubierten Referenzzelle subtrahiert, um so das tatsächliche Bindungssignal zu erhalten. Diese Senogramme wurden anschließend mit einem 1 : 1 Bindungsmodell unter zu Hilfenahme der Biacore X100 Evaluation Software *gefittet* und so die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d ermittelt.

Filterbindung an Nitrocellulosemembranen

Um die Anreicherung besser bindender Sequenzmotive an YbiB durch SELEX (3.2.15) zu überprüfen und apparette Affinitäten für einzelne Aptamere zu bestimmen (4.2.3), wurden Filterbindungen an Nitrocellulosemembranen durchgeführt. Dabei bleiben die Nukleinsäuren nur an der Membran haften, wenn sie vom darauf immobilisierten Protein gebunden werden. Die Menge der gebundenen Nukleinsäuren kann über radioaktive Markierung quantifiziert und so die Affinität des Proteins für die Nukleinsäuren ermittelt werden.

Um für die Filterbindung radioaktive ssDNA zu erzeugen wurden die zu testenden D3-Selektionsrunden, sowie die isolierten ssDNA-Aptamere durch 5'-Phosphorylierung mit γ -[³²P]-ATP (HARTMANN ANALYTICS, 10 μ Ci/ μ l) markiert. Dafür wurden zunächst 2 μ g ssDNA mit 25 U *calf intestine phosphatase* (CIP; PROMEGA) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 60 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM EDTA und Erhitzen auf 75°C für 10 min gestoppt und die einzelsträngige DNA anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.1) und Ethanolfällung (3.2.2) gereinigt. Nach der Fällung wurde die ssDNA in 10 μ l H₂O aufgenommen und 2 μ l davon mit 20 U T4-Polynukleotidkinase, (PROMEGA) unter Zusatz von 4 μ l γ -[³²P]-ATP in einem Gesamtvolumen von 20 μ l für 45 min bei 37°C radioaktiv markiert. Die ssDNA wurde anschließend vom freien ATP mittels Sephadex G25 *spin columns* (GE HEALTHCARE) gemäß Herstellerangaben getrennt.

Zur radioaktiven Markierung der zu testenden A50-ssRNA-Selektionsrunden und der isolierten ssRNA-Aptamere wurden jeweils *in vitro* Transkriptionen (3.2.17), unter Zugabe von 1,5 μ l α -[³²P]-GTP (HARTMANN ANALYTICS, 10 μ Ci/ μ l) durchgeführt. Die markierte ssRNA wurde mit dem Nucleo Spin[®] Extract II-Kit (MACHEREY-NAGEL) gereinigt.

Für die Filterbindung wurden die radioaktiv markierten Nukleinsäuren anschließend 1 : 100 in H₂O verdünnt, um eine Konzentration < 1 nM in den Reaktionsansätzen zu gewährleisten. Von diesen Verdünnungen wurden dann je 5 μ l mit verschiedenen Konzentrationen der verwendeten Proteine in einem Gesamtvolumen von 25 μ l in einer 96-well Mikrotiterplatte für 30 min bei RT inkubiert. Als Puffer wurde der Selektionspuffer mit zusätzlich 10 μ g/ μ l Hefe tRNA verwendet, die zur Minimierung der unspezifischen Wechselwirkungen der Nukleinsäuren mit den Proteinen diente. Die Nitrocellulosemembran (Protran, 0,45 μ m, WHATMAN) wurde vor der Filtration für 15 min in 0,4 M KOH geschwenkt und anschließend mit H₂O gewaschen. Die so behandelte Membran wurde in eine 96-well *Minifold I dot blot*-Apparatur (Schleicher&Schüll) eingespannt und unter Vakuum einmal mit 200 μ l Selektionspuffer gewaschen. Die Reaktionsansätze wurden nun über die Nitrocellulosemembran filtriert und im Anschluss 5x mit je 200 μ l Selektionspuffer gewaschen, um nicht Protein-gebundene Nukleinsäuren zu entfernen.

Die Nitrocellulosemembran wurde luftgetrocknet und die verbliebene Menge an radioaktiv markierten Nukleinsäuren mittels PhosphorImager-Film (Fujifilm; FLA-3000) quantifiziert. Ebenso wurde die Radioaktivität von 5 µl der verwendeten Nukleinsäureverdünnungen quantifiziert und die bei der Filterbindung gemessenen Werte jeweils auf diese, maximal mögliche Gesamtradioaktivität normiert.

3.4.13 Phylogenetische Analysen verschiedener Proteine

Um die Verwandtschaft von Vertretern der TrpD2-Proteinfamilie zu den nächsten verwandten Proteingruppen TrpD und NP-II zu analysieren, wurden phylogenetische Analysen durchgeführt. Ausgehend von allen bekannten TrpD-, TrpD2- und NP-II-Sequenzen wurden durch mehrere konsekutive Stammbaumberechnungen 8-9 Sequenzen je Familie ausgewählt, die repräsentativ die Variationen in den Familien widerspiegeln. Zunächst wurde ein multiples Sequenzalignment der Sequenzen mit T-COFFEE (Notredame et al., 2000) erstellt. Darauf basierend wurde MEGA (Kumar et al., 2008) zum Errechnen des Baums verwendet. Die phylogenetische Analyse erfolgte mit einem auf Poisson-korrigierten Distanzen basierenden *neighbour joining* Algorithmus und wurde durch *bootstrapping* (1000 Iterationen) analysiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Allgemeine Charakterisierung der TrpD2-Proteine

4.1.1 Bioinformatische Analyse der TrpD2-Proteinfamilie

Im Zuge der zahlreichen Genomsequenzierungsprojekte werden eine stetig wachsende Zahl von *open reading frames* (ORFs) gefunden, deren Funktion unklar ist. Auf diese Weise wurde 1998 auch das erste *trpD2*-Gen bei der Sequenzierung des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus* identifiziert (Deckert et al., 1998). Der Organismus enthielt ein Gen unbekannter Funktion (Uniprot Nummer: O66585), das hohe Ähnlichkeit zu den Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (*trpD*) zeigte, aber außerhalb des Tryptophan-Operons zu finden war. Weitere Untersuchungen zeigten dann, dass TrpD2-Proteine in zahlreichen Genomen auftreten. Gegenwärtig werden ca. 140 bakterielle, funktionell nicht charakterisierte *open reading frames* dieser Proteingruppe zugeordnet (NCBI, *conserved domain database*; PRK08136). In Eukaryoten und Archaeen wurden dagegen keine TrpD2-Proteine gefunden.

Die Mitglieder der TrpD2-Familie weisen untereinander eine hohe Sequenzidentität von durchschnittlich 40 % auf. Allerdings besitzen die evolutionär am weitesten voneinander entfernten Vertreter mit 19 % Sequenzidentität nur noch eine moderate Ähnlichkeit zueinander. Dies deutet auf eine sehr diverse Proteinfamilie hin, bei der alleine aufgrund der Homologie nicht zwingend auf eine identische Funktion aller Vertreter geschlossen werden kann. Zur nächsten verwandten Proteingruppe, den TrpD-Enzymen, besteht mit etwa 17 % Sequenzidentität nur noch wenig Ähnlichkeit, aus der alleine nicht auf eine direkte Verwandtschaft dieser beiden Proteinfamilien geschlossen werden kann. Allerdings zeigt ein struktureller Vergleich von YbiB aus *E. coli* und TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* (**Abbildung 4.7 B**), dass TrpD- und TrpD2-Proteine fast identische 3D-Strukturen besitzen. Somit sind diese beiden Proteinfamilien, vermutlich durch Genduplikation, aus einem gemeinsamen evolutionären Vorläufer entstanden. Bereits früher war zudem eine evolutionäre Beziehung zwischen TrpD und den Nukleosid-Phosphorylasen der Klasse II (NP-II), basierend auf deren Sequenz- und struktureller Ähnlichkeit, festgestellt worden (Mayans et al., 2002). Zur weiteren Untersuchung der Verwandtschaft zwischen den TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteinfamilien wurde von ausgewählten Vertretern eine phylogenetische Analyse durchgeführt (3.4.13). Das Ergebnis ist in **Abbildung 4.1** gezeigt.

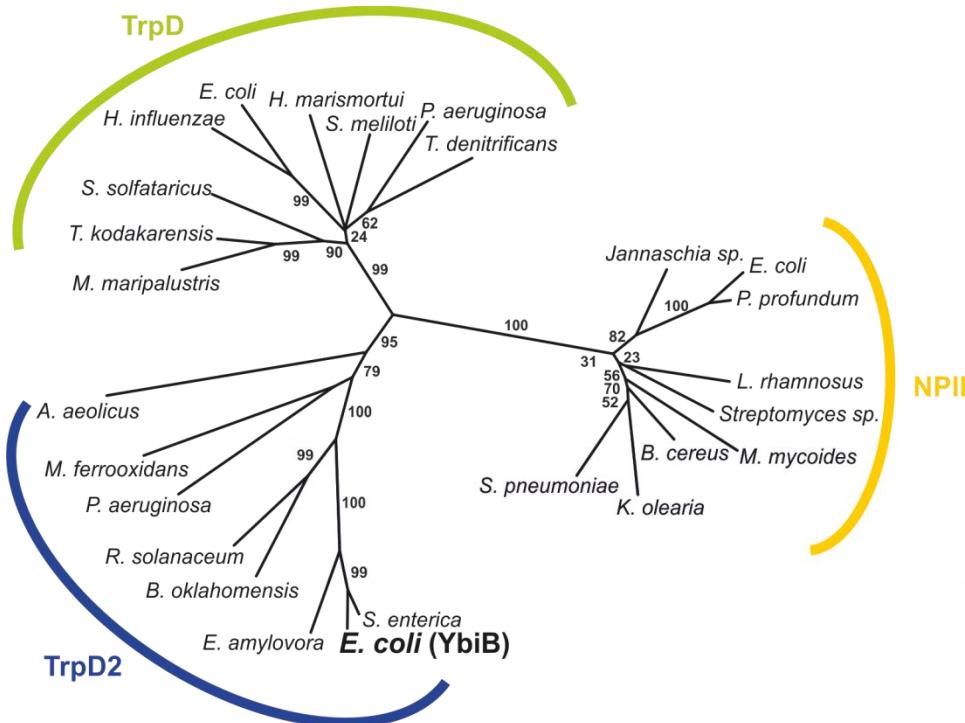


Abbildung 4.1: Phylogenetische Analyse von Vertretern der TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteinfamilien. Die einzelnen Proteingruppen sind farblich gekennzeichnet und weisen eine deutliche Trennung auf evolutionärer Ebene auf. Auf den einzelnen Kanten sind *bootstrap*-Werte angegeben.

Die TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteine bilden drei unabhängige Gruppen, die evolutionär klar voneinander getrennt sind. Dabei ist unklar, welche der Proteinfunktionen als erstes existierte. Auffällig ist jedoch, dass die NP-II-Familie durch einen längeren Ast und einen *bootstrap*-Wert von 100 von den anderen beiden Familien abgegrenzt ist, was annehmen lässt, dass sich diese Proteinfunktion evolutionär als erstes abgegrenzt hat. Die TrpD2-Proteine bilden, wie bereits zuvor vermutet, eine evolutionär diversere Gruppe als die anderen beiden Familien, was sich deutlich an der früheren Trennung der einzelnen Äste näher am Ursprung des Baumes sehen lässt.

Zur weiteren Analyse wurde ein strukturbasiertes Alignment von einem TrpD2-Protein (YbiB aus *E. coli*), TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* und der Thymidin-Nukleosidphosphorylase DeoA aus *E. coli* mit 3D-Coffee (O'Sullivan et al., 2004) generiert (**Abbildung 4.2**). Als Vertreter der TrpD-Proteine wurde das Enzym aus *S. solfataricus* gewählt, das mit 23 % die höchste Sequenzidentität aller Anthranilate-Phosphoribosyltransferasen zu YbiB zeigt.

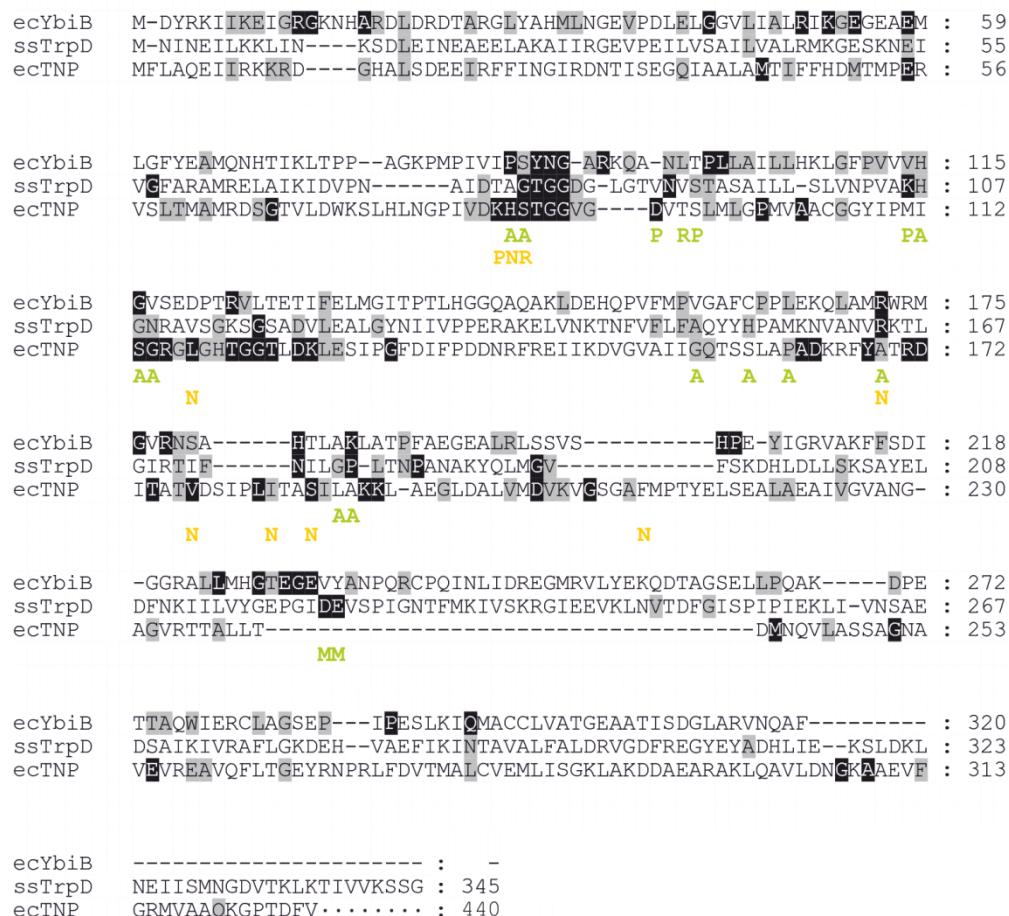


Abbildung 4.2: Strukturbasiertes Sequenzalignment von YbiB aus *E. coli* (ecYbiB, Struktur: Abbildung 4.7), *S. solfataricus* TrpD (ssTrpD, PDB: 1O17) und *E. coli* Thymidin NP (ectNP, PDB: 1AZY). Die in der jeweiligen Familie vollständig konservierten Residuen sind schwarz hinterlegt. Positionen mit mindestens 85 % Konserviertheit sind grau markiert. Der Grad der Konserviertheit wurde für die TrpD2-Proteine aus einem der CDD-Datenbank (Marchler-Bauer et al., 2011) entnommenen multiplen Sequenzalignments abgeleitet, bzw. für TrpD und NP-II von Marino et al (2006) übernommen. Katalytisch wichtige Aminosäuren für TrpD (Marino et al., 2006) sind mit grünen Buchstaben unterhalb des Alignments markiert. Dabei steht A für Residuen, die die Anthranilsäure binden und P für Positionen, die die Phosphatgruppe des PRPP binden. Bei M und R handelt es sich um Aminosäuren, die Magnesium oder den Ribosering von PRPP koordinieren. Bekannte katalytisch wichtige Positionen bei den NP-II Proteinen (Marino et al., 2006) sind mit gelben Buchstaben gekennzeichnet. Positionen mit P koordinieren das Phosphat, R und N sind Aminosäuren, die entweder den Ribosering des Nukleosids binden oder dessen Base.

Der Vergleich der vollständig konservierten Positionen aller drei Gruppen zeigte, dass nur sehr wenige Aminosäuren gleichzeitig in den drei Proteinfamilien konserviert sind. Den TrpD2-Proteinen fehlen nahezu alle Aminosäuren, die bei TrpD oder NP-II katalytisch von Bedeutung sind. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die TrpD2-Gruppe eine andere Funktion als die beiden am nächsten verwandten Proteinfamilien hat. Die TrpD2-Proteine zeigen eine große Zahl von vollständig konservierten Lysinen oder Argininen, die über die gesamte Sequenz verteilt sind. Diese Reste treten weder bei TrpD, noch bei NP-II auf und bilden somit ein eindeutiges Abgrenzungsmerkmal zu diesen Proteingruppen. Trotz der hohen Diversität auf Sequenzebene innerhalb der

TrpD2-Proteinfamilie erscheint es aufgrund dieser bei allen Vertretern durchgehend konservierten Residuen plausibel, dass alle Vertreter eine identische oder zumindest sehr ähnliche Funktion ausführen. Als Modellenzym für die weitere Funktionsaufklärung von TrpD2 wurde YbiB aus *E. coli* verwendet. Die Untersuchungen in einem ausgesprochen gut charakterisierten Organismus wie *E. coli*, sowie dessen genetische Manipulierbarkeit und die leichte Kultivierung sollten eine umfassende funktionelle Analyse ermöglichen.

4.1.2 Genomischer Kontext und Regulation in *E. coli*

Bei der Identifikation des ersten *trpD2*-Gens in *Aquifex aeolicus* zeigte sich, dass es im Gegensatz zu seinem Homologen *trpD* außerhalb des *trp*-Operons zu finden ist. Da die Funktionen der benachbarten Gene, sowie die Regulation der Genexpression bereits wichtige Informationen über die mögliche Aufgabe des entsprechenden Proteins liefern können, wurde dies für das *trpD2*-Gen *ybiB* [NC_000913.2 (834471..835433)] aus *E. coli* untersucht. Dieses befindet außerhalb des *trp*-Operons und liegt *Downstream* vom Gen für eine DNA-Helikase *dinG*. Dessen Expression wird durch das LexA-RecA-System, das die sogenannte SOS-Antwort auf DNA-Schädigung kontrolliert, reguliert (Voloshin et al., 2003). Bei dem *downstream* von *ybiB* gelegenen ORF handelt es sich um das funktionell ebenfalls nicht charakterisierte *ybiC* (**Abbildung 4.3**).

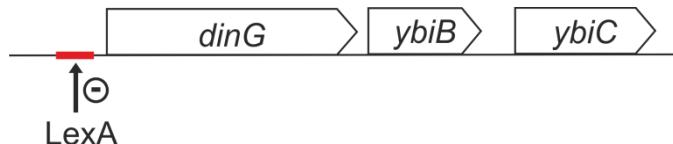


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung von *ybiB* und seiner Umgebung im *E. coli* Genom. Die Gene sind durch beschriftete Pfeile dargestellt. Dabei gibt die Richtung des Pfeils die Leserichtung des ORFs an. Die Bindestelle für den LexA-Repressor vor *dinG* ist rot gekennzeichnet.

Interessanterweise ergab die Sequenzanalyse, dass direkt vor *ybiB* keinerlei bekannte Promotorelemente zu finden sind, was durch Promotorstudien mit *lacZ* als Reporter (Silhavy and Beckwith, 1985) bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit der nur 28 nt langen Lücke zwischen den Stoppcodon von *dinG* und dem Startcodon von *ybiB* deutete dies darauf hin, dass beide Gene ein Operon bilden könnten. Dies wurde bereits im Rahmen einer genomweiten Transkriptionsstudie vermutet (Van Dyk et al., 2001). Durch RT-PCR Experimente mit *E. coli* mRNA konnte dann gezeigt werden, dass *dinG* und *ybiB* cotranskribiert werden und somit ein LexA-kontrolliertes Operon bilden (Patrick Babinger; Daten nicht gezeigt). Das nachfolgende Gen *ybiC* ist nicht mehr Teil dieser polycistronischen mRNA. Weitere Expressionsanalysen mittels *western blot* (3.4.6), unter Verwendung eines Antikörpers gegen einen C-terminalen *his6-tag* (3.2.13) am genomisch codierten YbiB zeigten, dass das Protein in den *E. coli* Zellen in detektierbarer Menge vorliegt und diese durch Zugabe von Mitomycin C (MMC) gesteigert wird (**Abbildung 4.4**).

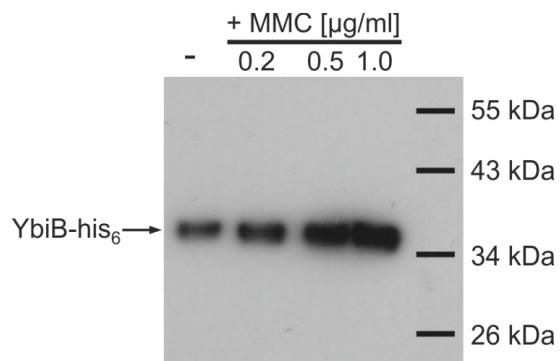


Abbildung 4.4: Expressionsanalyse von YbiB unter verschiedenen Bedingungen durch western blot. Die Bande in der ersten Spur (-) bei ca. 35 kDa entspricht der Expression von *ybiB* unter normalen Wachstumsbedingungen. Durch steigende Konzentrationen Mitomycin C (MMC) kann die Menge an YbiB gesteigert werden (Spuren 2 bis 4). Die Beladung für die SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) wurde in jeder Spur auf gleiche Gesamtproteinmenge normiert. Die Detektion erfolgte über einen Antikörper gegen den C-terminalen *his6-tag*.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von YbiB in der zellulären Antwort auf DNA-schädigende Bedingungen hin.

4.1.3 Vergleichende Proteomanalyse von *E. coli*

Der *knockout* eines Gens führt oft zur differentiellen Expression anderer Gene, die funktionell mit dem fehlenden Protein zusammen hängen. Durch Vergleich der Proteomzusammensetzung des Wildtyps und des *knockout*-Stamms lassen sich solche Unterschiede detektieren und die betreffenden Proteine identifizieren. Basierend auf den Ergebnissen kann dann in der Folge versucht werden, auf die Funktion des entfernten Proteins zu schließen.

In dieser Arbeit wurde eine solche Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese in Kooperation mit der AG Deutzmann (Universität Regensburg) durchgeführt. Dabei wurde das Proteom eines *E. coli* MG1655 *ΔybiB*-Stamms mit dem MG1655-Wildtyp verglichen. Der schematische Ablauf des Experiments ist in **Abbildung 4.5** gezeigt.

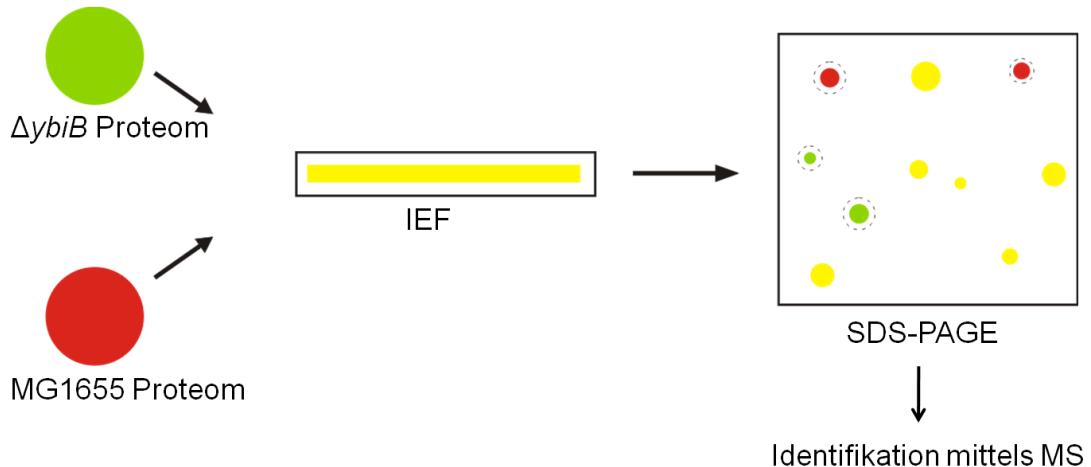


Abbildung 4.5: Ablauf einer vergleichenden Proteomanalyse mit 2D-Gelektrophorese. Das Gesamtproteom des *E. coli* Wildtyps (rot) und des $\Delta ybiB$ -Stamm (grün) wird isoliert und mit einem rot (Cy5) bzw. grün (Cy3) fluoreszierenden Farbstoff markiert. Von beiden Proteomen wird eine äquivalente Menge durch isoelektrische Fokussierung (IEF) und SDS-PAGE zweidimensional in einzelne Proteine getrennt. Durch Auslesen der Fluoreszenzsignale lassen sich die Proteinmengen aus den unterschiedlichen Stämmen vergleichen. Proteine, deren Menge im Wildtyp und im *knockout* gleich ist, ergeben gelbe *spots*. Proteine, die stärker im Wildtyp bzw. *knockout* vertreten sind, erscheinen rot bzw. grün. Abschließend werden interessante *spots* aus dem Gel ausgestochen und die Proteine massenspektrometrisch identifiziert.

Die benötigten Gesamtproteinpräparationen aus den *E. coli* MG1655- und den $\Delta ybiB$ -Zellen wurden wie unter 3.3.1 beschrieben hergestellt. Diese Proben wurden an Dr. Astrid Bruckmann (AG Deutzmann) übergeben, die die weiteren experimentellen Schritte und die Analyse des SDS-Gels durchführte (Abbildung 4.6).

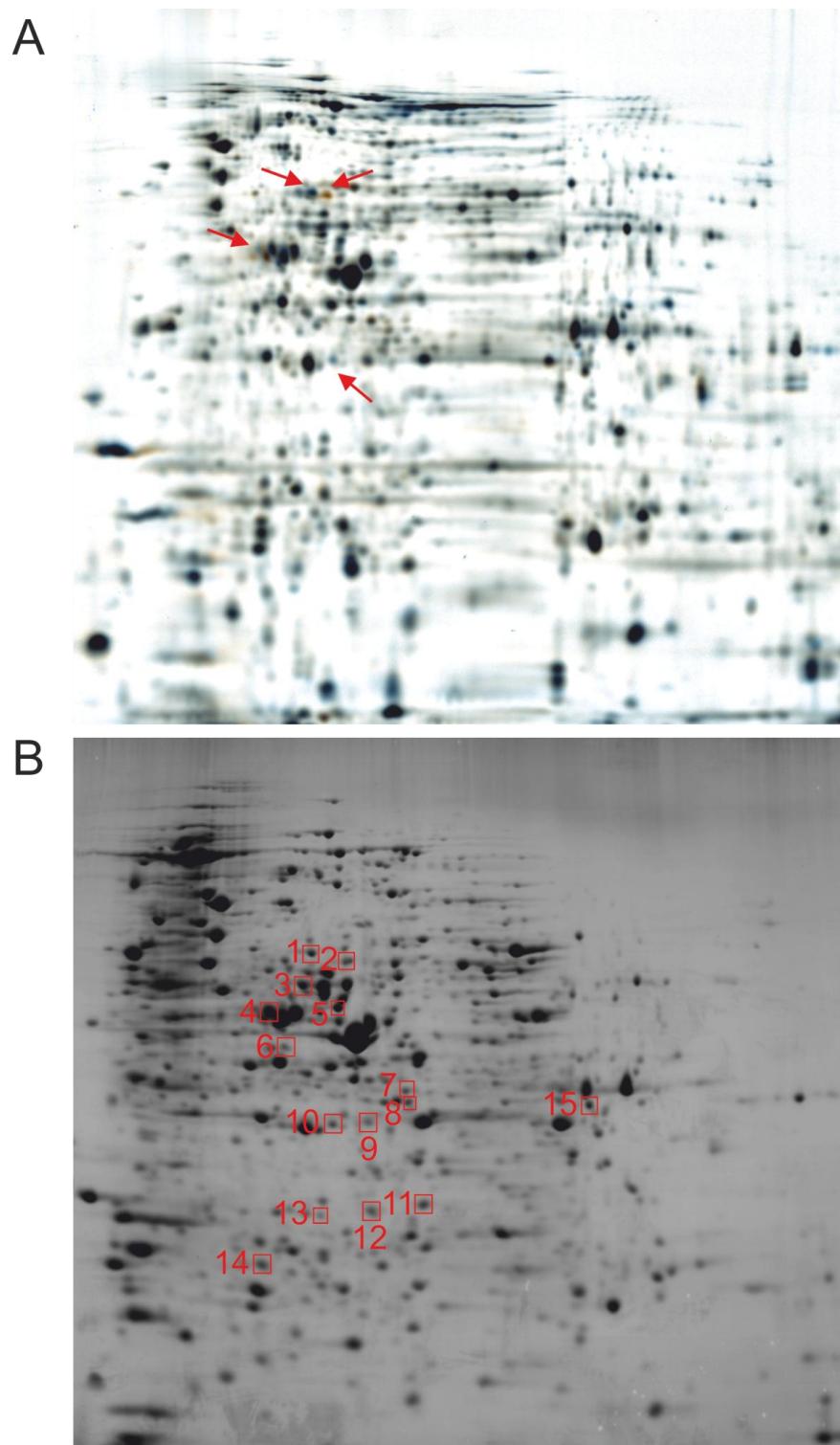


Abbildung 4.6: Vergleichende Proteomanalyse von *E. coli* MG1655 Wildtyp und MG1655 Δ ybiB.
 (A) Falschfarbendarstellung des 2D-Gels der Gesamtproteinpräparation aus beiden Stämmen mit anschließender DIGE-Färbung. Das Wildtyp-Proteom wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert, das Proteom des knockouts mit Cy5. Proteine, deren Menge in beiden Stämmen identisch ist, liefern schwarze *spots*, Proteine mit differierenden Mengen erscheinen blau bzw. orange. Beispiele für solche *spots* sind mit roten Pfeilen markiert. (B) 2D-Gel der Gesamtproteinpräparation aus dem MG1655 Wildtyp mit anschließender Coomassie-Färbung. Proteine, die in wt- und Δ ybiB-Zellen als differenziell exprimiert erschienen (vgl. A) sind mit roten Kästen und Nummern gekennzeichnet. Diese *spots* wurden aus dem Gel ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert.

Es zeigte sich, dass die meisten Proteine in beiden Stämmen, wie zu erwarten, in identischer Menge hergestellt wurden. Allerdings konnten auch einige *spots* gefunden werden, bei denen die Proteimenge in den beiden Stämmen signifikant voneinander differierte (**Abbildung 4.6 A**). Um ausreichend Protein für die weitere Analyse zu erhalten, wurde die 2D-Gelelektrophorese nochmals mit mehr Protein durchgeführt und das Gel mit *Coomassie* gefärbt. In **Abbildung 4.6 B** ist das Ergebnis für das wildtypische Proteom gezeigt. Die zuvor in der DIGE-Färbung differierenden *spots* wurden ausgestanzt, massenspektrometrisch (*peptide fingerprint*) analysiert und die Proteine so identifiziert (**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1: Differenziell hergestellte Proteine von *E. coli* MG1655 wt und MG1655 *ΔybiB*.

Spot Nr. ¹	Proteinname	Funktion	Veränderung
1	GMP-Synthase	Letzter Schritt der GMP-Synthese	Wildtyp 1,5-fach mehr
2	Phosphoglucomutase	Kohlehydratstoffwechsel	Wildtyp mehr ²
3	Asparaginyl-tRNA-Synthetase	Proteinbiosynthese	Wildtyp mehr ²
4	Isocitrat-Dehydrogenase	Energiestoffwechsel	Wildtyp mehr ²
5	Adenylosuccinat-Synthetase	Letzter Schritt der AMP-Synthese	Wildtyp mehr ²
6	RecA	Induktor der SOS-Antwort	<i>Knockout</i> 2-fach mehr
7	Ketogluconat-Reduktase	Kohlehydratabbau in <i>E. coli</i>	<i>Knockout</i> mehr ²
8	Putrescine-Bindepotein	Polyamin-Stoffwechsel	<i>Knockout</i> mehr ²
10	Universelles Stressprotein E	Stressantwort von <i>E. coli</i> ; genaue Funktion unbekannt	Wildtyp mehr ²
11	Äußeres Membranprotein OmpA	Universelles Transportprotein	Wildtyp mehr ²
12	Kontrollprotein der aeroben Atmung	Zusammenhang mit oxidativen Stress	<i>Knockout</i> 1,5-fach mehr
14	Elongationsfaktor P	Translation	Wildtyp mehr ²
15	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase	Proteinbiosynthese	Wildtyp mehr ²

¹Die Nummerierung der einzelnen *spots* entspricht der in **Abbildung 4.6 B** verwendeten.

²Bei diesen Proteinen war keine genaue Quantifizierung des Expressionunterschieds in den *E. coli* MG1655-Wildtyp-Zellen und dem entsprechenden *ΔybiB*-Stamm möglich.

Erwartungsgemäß wurde YbiB selbst als differierendes Protein identifiziert, da es nur noch im Wildtyp hergestellt wird. Gleichzeitig zeigte dies die hohe Sensitivität der Analyse, da selbst Unterschiede beim relativ schwach exprimierten *ybiB* detektiert werden konnten. Dementsprechend sollte praktisch das gesamte *E. coli*-Proteom auf

dem Gel zu sehen sein, wodurch die vergleichende Analyse zwischen Wildtyp und *ybiB knockout* als annähernd umfassend angesehen werden kann.

Bei der Auswertung der weiteren Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zeigten sich zunächst einige Proteine, die nicht unmittelbar mit einer möglichen Funktion von YbiB in Verbindung gebracht werden konnten (*spots* 2-4, 7, 11, 15). Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Enzyme aus dem Energiestoffwechsel liefern keine offensichtlichen Hinweise auf die Aufgabe von YbiB in den Zellen. Ihre differentielle Expression ist vermutlich auf sekundäre Vorgänge in den Zellen zurückzuführen, die nicht geklärt werden konnten.

Die Mehrheit der veränderten Proteine hat jedoch eine Funktion im Nukleinsäuremetabolismus oder der Stressantwort in *E. coli*. Diese Ergebnisse untermauern so die bereits aufgrund der genomischen Organisation und Regulation von *ybiB* aufgestellte Hypothese, dass das Protein eine Funktion in der Reaktion auf DNA-schädigende Bedingungen hat. Besonders auffällig ist dabei, dass durch die Abwesenheit von YbiB sogar das Expressionslevel des Induktors der SOS-Antwort RecA angehoben wird. Die einzelnen Funktionen der identifizierten Proteine und die Veränderung ihrer Expression ließen jedoch keine Verfeinerung der Hypothese über die mögliche zelluläre Funktion von YbiB zu. Deshalb wurden in der Folge biochemische und biophysikalische Analysen mit YbiB durchgeführt.

4.1.4 Kristallisation und Strukturanalyse von YbiB

Nachdem die bisherigen Ergebnisse noch keine detaillierten Aussagen über die Funktion von YbiB zuließen, sollte nun zur weiteren Charakterisierung des Proteins seine 3D-Struktur gelöst werden. Dies geschah mittels Röntgenkristallografie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Olga Mayans (damals Biozentrum Basel, Schweiz; jetzt University of Liverpool, UK). Auf diese Weise konnte die Struktur von YbiB mit einer Auflösung von 1,94 Å aufgeklärt werden (Stutz, 2007; **Abbildung 4.7 A**).

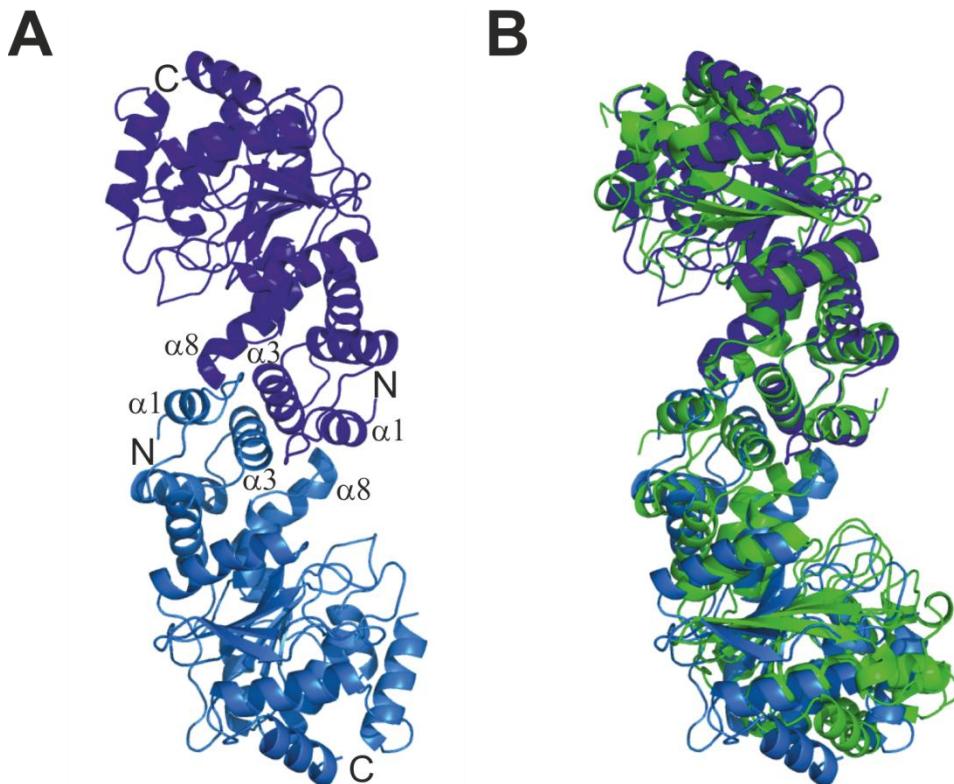


Abbildung 4.7: Bändermodell des dimeren YbiB und Superpositionierung mit TrpD aus *Sulfolobus solfataricus*. (A) Die beiden Protomere von YbiB sind in unterschiedlichen Blautönen dargestellt. Die Helices α_1 , α_3 und α_8 bilden dabei die Kontaktfläche aus. N- und C-Termini der Protomere sind gekennzeichnet. (B) Struktureller Vergleich von YbiB mit TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* (grün; pdb: 1O17). Beide Proteine überlagern mit einem RMSD von 2,4 Å für 287 verglichene C_α -Atome. Die Überlagerung wurde mit DALI lite erstellt.

Dabei zeigte sich, dass YbiB genauso wie fast alle bisher charakterisierten TrpD-Proteine ein Dimer bildet, was die Ergebnisse einer analytischen Größenausschlusschromatographie bestätigten (Schneider, 2007). Bei der Superpositionierung von YbiB mit TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* ergab sich ein RMSD von 2,4 Å für 287 verglichene C_α -Atome (**Abbildung 4.7 B**). Die Gesamtstrukturen beider Proteine sind also sehr ähnlich zueinander. Die jeweiligen Monomere bestehen aus einer rein α -helikalen N-terminalen Domäne und einer größeren C-terminalen α/β Domäne. Die Dimerisierung wird in analoger Weise durch die Interaktionen der hydrophoben Seitenketten in den drei α -Helices α_1 , α_3 und α_8 erreicht (Mayans et al., 2002).

Im Anschluss wurden die Positionen der in der TrpD2-Gruppe vollständig konservierten Residuen (vgl. **Abbildung 4.2**) auf der Röntgenstruktur von YbiB bestimmt (**Abbildung 4.8**).

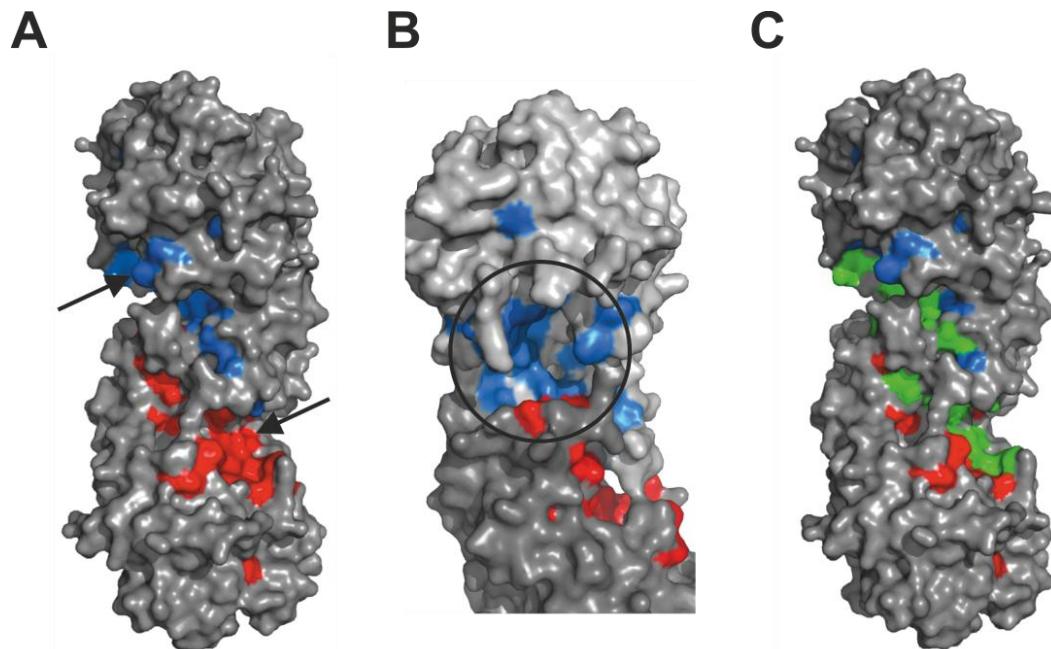


Abbildung 4.8: Oberflächendarstellung von YbiB mit farblich markierten konservierten Residuen. (A) Oberflächendarstellung des YbiB-Dimers (grau). Die konservierten Residuen sind für jedes Protomer farblich gekennzeichnet (blau bzw. rot). Die Lage der möglichen aktiven Zentren ist mit Pfeilen angedeutet. (B) Vergrößerung eines putativen aktiven Zentrums des YbiB-Dimers. Die Proteinstruktur ist im Vgl. zu (A) ca. 90° nach links gedreht. Beide Untereinheiten sind in unterschiedlichen Grautönen gefärbt. (C) Oberflächendarstellung von YbiB in gleicher Orientierung wie in (A). Die in der TrpD2-Proteingruppe konservierten Lysin- und Arginin-Reste sind für beide Untereinheiten grün markiert. Die anderen konservierten Aminosäuren sind wie in (A) gekennzeichnet.

Dabei zeigten sich jeweils Anhäufungen dieser Reste in einer Vertiefung je Protomer und einer Falte entlang der Oberfläche des Dimers. Diese Regionen sind sehr wahrscheinlich für die TrpD2-Gruppe funktionell von großer Wichtigkeit. Bei den beiden Vertiefungen könnte es sich um die beiden möglichen aktiven Zentren des Dimers handeln. Dabei vervollständigen die konservierten Residuen aus einer Untereinheit das putative aktive Zentrum des anderen Protomers (**Abbildung 4.8 B**). Das Protein könnte also zwei *shared active sites* aufweisen, wodurch die Dimerisierung für YbiB funktionell unabdingbar wäre. Bei den weiteren konservierten Residuen, die sich in einer beide Monomere überspannenden Oberflächenfalte befinden, handelt es sich ausschließlich um Lysine und Arginine (**Abbildung 4.8 C**). Aus der Form dieser Falte und der Verteilung der positiven Ladungen wurde geschlossen, dass dort Nukleinsäuren durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Phosphatrückgrat und den Seitenketten der Lysine und Arginine gebunden werden könnten. Diese mutmaßliche Nukleinsäurebindestelle kann bei TrpD nicht gefunden werden. Dort gibt es zwar auch eine Oberflächenvertiefung, diese ist allerdings viel schwächer ausgeprägt und enthält keine positiven Ladungen.

In die Apostruktur von YbiB wurde versucht, einen Einzelstrang aus einer DNA-Doppelhelix einzupassen (**Abbildung 4.9**).

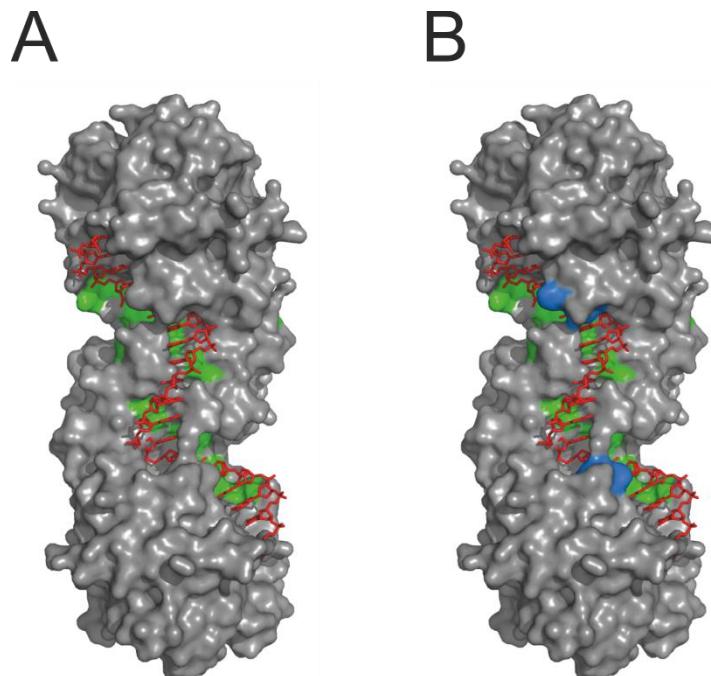


Abbildung 4.9: Struktur von YbiB mit modelliertem DNA-Einzelstrang (Stutz, 2007). (A) Oberflächendarstellung des YbiB Dimers. Die konservierten Lysine und Arginine sind grün gefärbt. Ein DNA Einzelstrang wurde in die Bindestelle eingepasst und ist rot dargestellt. (B) Oberflächendarstellung von YbiB mit eingepasster DNA. Zusätzlich zu (A) wurden in jeder Untereinheit das konservierte Histidin 204 und Tyrosin 207 blau gefärbt. Diese beiden Residuen markieren die Lage der putativen aktiven Zentren.

Dies war erstaunlicherweise recht gut möglich, obwohl einzelstängige DNA normalerweise nicht mehr eine derartige helikale Struktur aufweist. Vielmehr faltet sie sich auf komplexe Weise auf sich selbst zurück oder wickelt sich in verschiedenartiger Weise um ssDNA-bindende Proteine (Raghunathan et al., 2000; Kozlov and Lohman, 2002). Auch wenn diese Modellierung somit wahrscheinlich nicht die tatsächliche Konformation des YbiB-ssDNA-Komplexes widerspiegelt, zeigt sie trotzdem, dass durch die Bindung in der Oberflächvertiefung DNA-Basen im putativen aktiven Zentrum zu liegen kommen und so von YbiB modifiziert werden könnten (siehe Abbildung 4.22). Konservierte Reste wie Histidin 204 und das Tyrosin 207 könnten dabei eine katalytische Rolle spielen (5.3).

4.2 Analyse der Nukleinsäurebindung an TrpD2-Proteine

Aus der Röntgenstruktur konnten erste Hinweise auf die molekulare Funktion von YbiB gewonnen werden. Allen voran die mögliche Bindung von Nukleinsäuren an das Protein zeigte sich interessant, da weder die Verwandtschaft mit TrpD noch mit den NP-II Proteinen auf eine solche Funktion hindeuteten. Alleine aufgrund der Größe unterscheiden sich Nukleinsäuren sehr stark von den kleinen Liganden dieser beiden

Proteinfamilien. Die Nukleinsäurebindung an YbiB und andere Vertreter der TrpD2-Proteingruppe wurde deshalb eingehend biochemisch überprüft und charakterisiert.

4.2.1 Untersuchungen zur Affinität, Stöchiometrie und Spezifität

Durch *electro mobility shift assays* (EMSA) konnte bereits früher die Bindung von DNA an YbiB gezeigt und charakterisiert werden (Schneider, 2007). Dabei wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide im Unterschuss mit verschiedenen Konzentrationen YbiB gemischt und diese Ansätze anschließend auf einem nativen Polyacrylamidgel getrennt. Erfolgt eine Interaktion, kommt es zur Verlangsamung der Nukleinsäure bei der Elektrophorese, was zu einer Verschiebung der radioaktiven Bande nach oben führt. Aus der Proteinkonzentration, bei der die Hälfte des markierten Oligonukleotids retardiert wird, kann dann eine apparente Affinität für die Bindung abgeleitet werden (Carey, 1991). Die durchgeführten Experimente ergaben eine eindeutige Bindung von YbiB an das getestete, 58 b lange ssDNA-Oligonukleotid zufälliger Sequenz (**Abbildung 4.10**). Die aus den Ergebnissen abgeleitete Dissoziationskonstante für die Interaktion betrug ca. 560 nM. Für TrpD aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte dagegen keine Bindung an das Oligonukleotid gefunden werden (**Abbildung 4.10 B**).

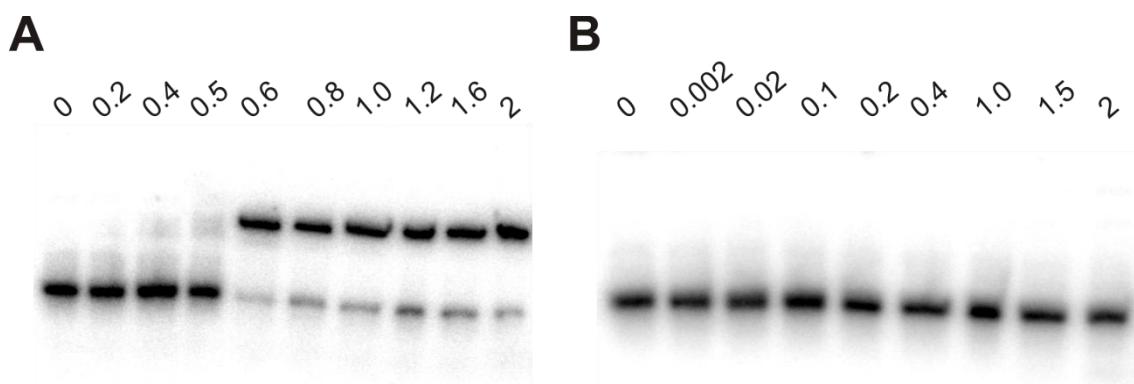


Abbildung 4.10: *Electro mobility shift assay* von YbiB (A) und TrpD aus *Saccharomyces cerevisiae* (B). Die eingesetzten Monomerenkonzentrationen an Protein sind über jeder Spur in μM angegeben. Die Proteine wurden mit einem 58 Basen langen, radioaktiv markierten ssDNA Oligonukleotid zufälliger Sequenz vorinkubiert und anschließend auf das Gel geladen. Die Verschiebung der ssDNA Bande zeigt seine Bindung an YbiB (Daten aus Schneider 2007).

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Interaktion mit ssDNA eine Eigenschaft ist, die YbiB funktionell von den TrpD-Proteinen abgrenzt. Weitere Analysen mittels EMSA ergaben, dass die Interaktion mit Oligonukleotiden stärker wird, je länger das betreffende ssDNA-Stück ist. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Präferenz von YbiB für einzelsträngige Oligonukleotide. Bei Vergleich der Bindung von YbiB an einen 240 Basen langen DNA-Einzelstrang und den korrespondierenden Doppelstrang konnte für die dsDNA eine in etwa 50-fach schlechtere Affinität beobachtet werden (Schneider,

2007). Durch EMSAs wurde somit die Bindung von YbiB an DNA, wie auch seine Präferenz für einzelsträngige Oligonukleotide nachgewiesen.

Problematisch bei EMSA-Experimenten ist allerdings, dass mit der Trennung von freiem Protein und Komplex im elektrischen Feld eine Störung des Gleichgewichts der Bindung einhergeht, weshalb lediglich apparente Affinitäten bestimmt werden können (Carey, 1991). Zusätzlich ist man bei der Wahl der möglichen Pufferbedingungen stark eingeschränkt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit andere Methoden zur genaueren Charakterisierung der Bindungseigenschaften von YbiB an einzelsträngige Nukleinsäuren verwendet.

Zunächst wurde die Interaktion von YbiB mit Oligonukleotiden mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (3.4.12). Dabei zeigten alle getesteten Oligonukleotide ab einer Länge von 12 Nukleotiden Bindung an das Protein (**Abbildung 4.11**).

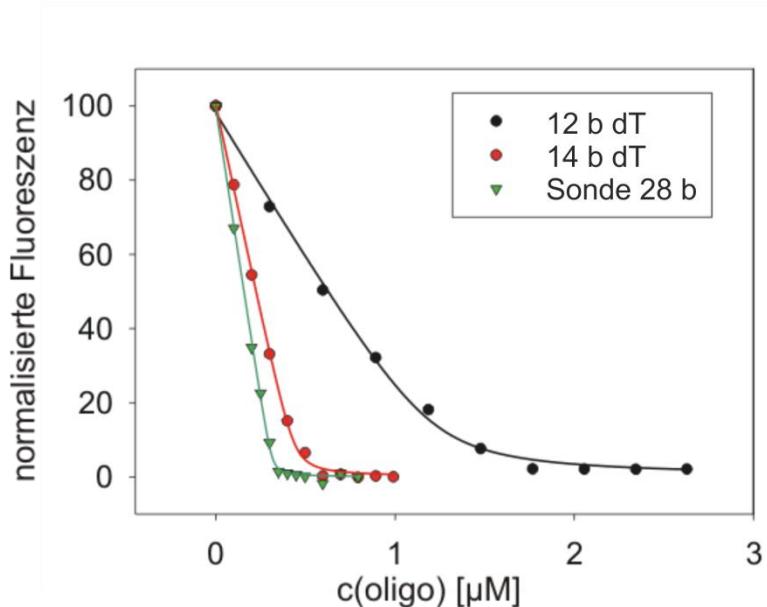


Abbildung 4.11: Bindungskurven von Oligonukleotiden an YbiB. Fluoreszenztitration von 2 μM YbiB (Untereinheitenkonzentration) mit verschiedenen Oligonukleotiden. Die Daten für das jeweilige Oligonukleotid sind als farbige Symbole gekennzeichnet. Die durchgezogenen Linien zeigen das Ergebnis des Fits der Daten mit Formel 5 (3.4.12). Die ermittelten K_D -Werte und Stöchiometrien finden sich in **Tabelle 4.2**.

Die aus den Titrationskurven angeleitetend Dissoziationskonstante lagen alle im niedrigen nanomolaren Bereich (**Tabelle 4.2**).

Tabelle 4.2: Dissoziationskonstanten und Stöchiometrien der Bindung von verschiedenen Oligonukleotiden an YbiB und aaTrpD2, gemessen mit Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzpolarisation.

		12b oligo dT	12b oligo U	14b oligo dT	20b oligo dT	20b oligo U	Sonde 20 b	Sonde 28b	Sonde 58 b
YbiB	K _D -Wert [nM] ¹	49 24 ³	89	14,0	48	30	48	6,0	21
	Stöchiometrie ²	0,9 0,8 ³	0,9	2,3	1,8	1,8	1,8	3,2	5,1
aaTrpD2	K _D -Wert [nM] ¹	134			46				
	Stöchiometrie ²	0,7			1,7				

¹ Die K_D-Werte wurden über den Fit der Titrationskurven mit Formel 5 (3.4.12) ermittelt.

² Die, ebenfalls aus dem Fit, abgeleiteten Stöchiometrien sind als Dimere YbiB pro Oligonukleotidmolekül angegeben.

³ Gelb hinterlegt sind die mit Fluoreszenzpolarisation (3.4.12) bestimmten K_D-Werte und Stöchiometrien.

Die mittels Fluoreszenztitration gemessenen K_D-Werte für ein 58 b langes ssDNA-Oligonukleotid (**Tabelle 4.2**) sind mindestens 20-fach niedriger als die über EMSAs abgeschätzten apparenten Dissoziationskonstanten (Schneider, 2007). Somit führen die zuvor beschriebenen experimentell bedingten Probleme bei den EMSAs tatsächlich nur zu apparenten Affinitäten, die deutlich von den in Lösung gemessenen K_D-Werten abweichen. Durch Fluoreszenzpolarisation (3.4.12) wurde anschließend die Bindung eines Fluorescein-markierten 12 b dT-Oligonukleotids an YbiB gemessen. Dabei konnten die Affinitäten aus der Fluoreszenzspektroskopie bestätigt werden (**Tabelle 4.2**). Dies zeigt, dass diese Methode geeignet ist, um verlässliche K_D-Werte zu ermitteln.

Nukleinsäuren unterhalb einer Länge von 12 Nukleotiden wurden nicht mehr von YbiB gebunden. Während an ein Oligonukleotid von 12 b Länge ein YbiB-Dimer bindet, ermöglichte interessanterweise die Verlängerung des Oligonukleotids um lediglich 2 Nukleotide auf 14 Basen die Bindung von zwei Dimeren YbiB. Diese Stöchiometrie bleibt konstant, bis das ssDNA-Fragment eine Länge von 28 Basen aufweist. Ein Oligonukleotid dieser Länge kann 3 dimere YbiB-Moleküle simultan binden (**Abbildung 4.11; Tabelle 4.2**).

Nach Bindung der ersten beiden YbiB-Dimere führt somit eine Verlängerung der ssDNA um 14 Nukleotide zur Anlagerung eines weiteren Proteindimers. Dementsprechend sollte die weitere Extension der Oligonukleotide um 14 Basen jeweils

Bindung eines weiteren YbiB-Dimers ermöglichen. Diese Annahme wurde durch analytische Ultrazentrifugationsläufe bestätigt. Dabei wurden, in Kooperation mit Prof. Dr. Claus Urbanke (Universität Hannover), Bindungsexperimente mit YbiB und ca. 1400 b langen, zirkulären ssDNA-Polynukleotiden durchgeführt. Daraus konnte eine mittlere Bindungslänge von 14 +/- 2 Nukleotiden je YbiB-Dimer bestimmt werden.

Für Oligonukleotide gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz wurden stets annähernd identische Bindungsparameter bestimmt (**Tabelle 4.2**). Somit konnte für die getesteten Oligonukleotide unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Sequenzspezifität der Interaktion ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Idee, dass hauptsächlich ionische Wechselwirkungen zwischen dem Nukleinsäurerückgrat und dem Protein für die Bindung verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von freiem Orthophosphat auf die Affinität von Oligonukleotiden an YbiB bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass mit steigender Phosphatkonzentration eine deutliche Inhibition der Bindung und dementsprechend eine Erhöhung der Dissoziationskonstante auftritt (**Abbildung 4.12**).

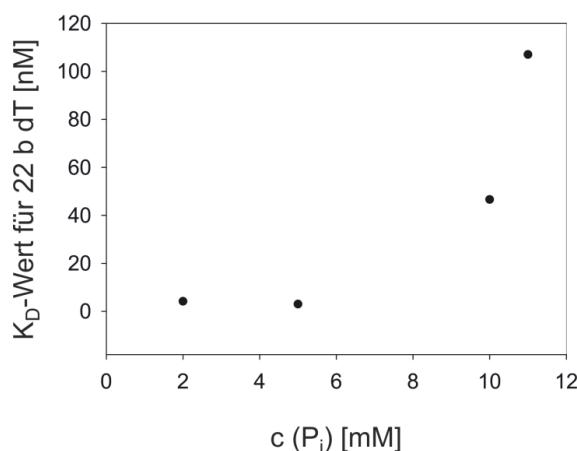


Abbildung 4.12: Einfluss von Phosphat auf die Interaktion von YbiB mit einem 22 b dT Oligonukleotid. Für die Fluoreszenztitrationen wurden 2 μ M YbiB (Untereinheitenkonzentration) in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst, dem bei den einzelnen Messungen verschiedene Konzentrationen an Phosphat zugesetzt wurde. Aus den, bei den verschiedenen Phosphatkonzentrationen erhaltenen Titrationen mit dem Oligonukleotid wurden über den Fit mit Formel 5 (3.4.12) die entsprechenden K_D-Werte bestimmt. Diese wurden gegen die eingesetzte Phosphatkonzentration aufgetragen.

Oberhalb von 5 mM Phosphat zeigte sich ein starker Einfluss auf die Interaktion von YbiB mit den Nukleinsäuren, wobei eine Konzentration von 11 mM Phosphat zu einem mehr als 10-fachen Anstieg des K_D-Werts führt. Bei höheren Phosphatkonzentrationen ließ sich kein Bindungssignal mehr detektieren. Die Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückgrat der ssDNA und YbiB sind somit für die Komplexbildung vermutlich zwingend notwendig. Es ist davon auszugehen, dass unter physiologischen Bedingungen die Interaktion noch nicht beeinträchtigt ist, da die intrazelluläre

Phosphatkonzentration in *E. coli* bei ca. 5 mM liegt (http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi-bin/STAT_NEW.cgi).

Einzelsträngige RNA verfügt ebenfalls über eine Phosphatgruppe in vergleichbarer Orientierung wie ssDNA und stellt somit auch ein mögliches Substrat für YbiB dar. Nach der umfassenden Charakterisierung der Interaktion von einzelsträngiger DNA mit YbiB wurde seine Bindung an ssRNA untersucht. Voneinander abweichende Affinitäten würden auf die Bevorzugung von einer der beiden Nukleinsäurespezies durch YbiB hindeuten. Es wurde die Bindung von 12 b und 20 b langen oligo U ssRNA-Strängen an YbiB gemessen und die abgeleiteten Bindungsparameter mit denen für die entsprechenden oligo dT ssDNA-Stränge verglichen. Dabei wurden die getesteten ssRNA- und ssDNA-Oligonukleotide mit annähernd identischen Affinitäten und Stöchiometrien von YbiB gebunden (Abbildung 4.13; Tabelle 4.2).

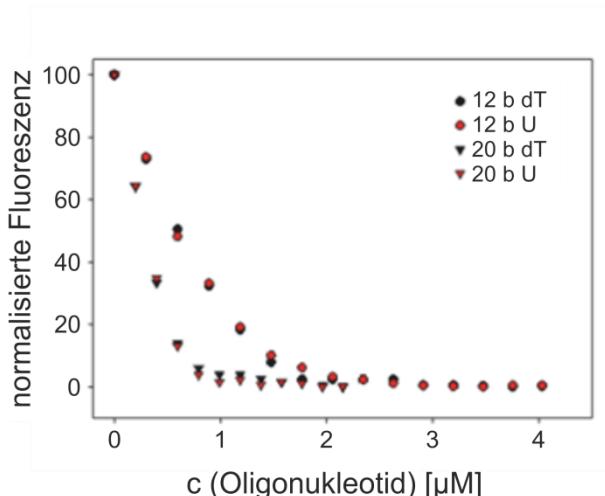


Abbildung 4.13: Vergleich der Bindung von ssRNA und ssDNA an YbiB. Fluoreszenztitration von 2 μ M YbiB (Untereinheitenkonzentration) mit zwei unterschiedlich langen ssRNA-Oligonukleotiden (U) und den entsprechenden ssDNA-Fragmenten (dT). Die aus dem Fit der Daten mit Formel 5 (3.4.12) ermittelten K_D -Werte und Stöchiometrien finden sich in Tabelle 4.2.

Somit ist das Protein alleine nicht in der Lage, zwischen diesen beiden möglichen Liganden zu unterscheiden. Entweder sind also beide Nukleinsäurespezies natürliche Substrate von YbiB oder andere, bisher nicht identifizierte Faktoren vermitteln eine Substratspezifität.

Abschließend wurde überprüft, ob neben YbiB auch andere Mitglieder der TrpD2-Proteinfamilie in der Lage sind, mit einzelsträngigen Nukleinsäuren zu interagieren. Zu diesem Zweck wurde das Protein aus *Aquifex aeolicus* (aaTrpD2) gereinigt und dessen Bindung gemäß 3.4.12 an zwei verschieden lange Oligo-dT ssDNA-Fragmente analysiert. Dabei zeigte aaTrpD2 ebenfalls Bindung an die beiden Oligonukleotide (Abbildung 4.14).

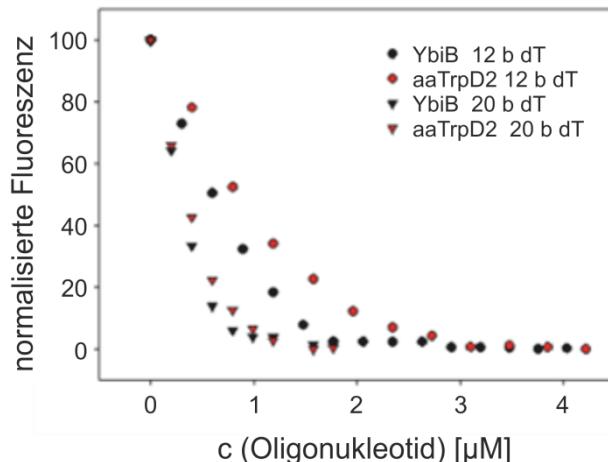


Abbildung 4.14: Vergleich der Bindung von zwei ssDNA-Oligonukleotiden an YbiB und aaTrpD2. Fluoreszenztitration von 2 μM aaTrpD2 (rot; Untereinheitenkonzentration) und YbiB (schwarz; Untereinheitenkonzentration) mit zwei unterschiedlich langen dT Oligonukleotiden. Die aus dem Fit der Daten mit Formel 5 (3.4.12) ermittelten K_D -Werte und Stöchiometrien finden sich in **Tabelle 4.2**.

Der Vergleich seiner Bindungsparameter mit denen von YbiB für dieselben ssDNA-Fragmente zeigte, dass aaTrpD2 in beiden Fällen jeweils eine etwas schwächere Affinität besitzt. Die Bindungsstöchiometrie war dagegen stets vergleichbar. Insgesamt sind die gemessenen Parameter für beide Proteine sehr ähnlich (**Tabelle 4.2**). Da es sich bei den beiden getesteten Proteinen um zwei evolutionär sehr weit voneinander entfernte Vertreter der TrpD2-Proteingruppe handelt (**Abbildung 4.1**), ist die Bindung an einzelsträngige Oligonukleotide sehr wahrscheinlich eine generelle Eigenschaft aller Mitglieder der TrpD2-Gruppe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte folglich eine neue Familie von nukleinsäurebindenden Proteinen identifiziert und ihre Bindungseigenschaften charakterisiert werden.

4.2.2 Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Bindungseigenschaften von YbiB

Vollständig konservierte Aminosäuren haben häufig einen großen Einfluss auf die Stabilität oder Funktion einer Proteinfamilie. Für die TrpD2-Gruppe wurden alle zu 100 % konservierten Aminosäuren ermittelt (**Abbildung 4.2**). Dabei wurden unter anderem Lysin- und Argininreste gefunden, die sehr wahrscheinlich für die Nukleinsäurebindung wichtig sind (**Abbildung 4.9**). Die Aufgabe der anderen konservierten Residuen war dagegen bisher unklar. Deshalb sollte ihre Bedeutung bei der Nukleinsäure-Bindung und später in physiologischen Tests (4.4.4) genauer analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden sie einzeln zu Alaninen mutiert und die Eigenschaften dieser Proteinvarianten überprüft. Verzichtet wurde dabei auf den Austausch von Glycinen und Prolinen, da diese Aminosäuren in der Regel funktionell nicht von großer Relevanz sind. Nach diesen Einschränkungen blieben 11 konservierte

Positionen übrig, von denen, im Zeitrahmen dieser Arbeit, sechs gegen Alanine ausgetauscht und die betreffenden Proteine analysiert wurden. Zusätzlich wurde auch das Tyrosin an der Position 207 mutiert, obwohl es sich dabei nicht um eine vollständig konservierte Position handelte. Allerdings befindet sich bei allen TrpD2-Proteinen an dieser Stelle ein aromatischer Rest. Diese Aminosäure liegt im putativen aktiven Zentrum, nahe der Nukleinsäurebindestelle von YbiB und ist somit wahrscheinlich funktionell von Bedeutung (**Abbildung 4.9**).

Die Lage aller mutierten Residuen ist in **Abbildung 4.15** gezeigt.

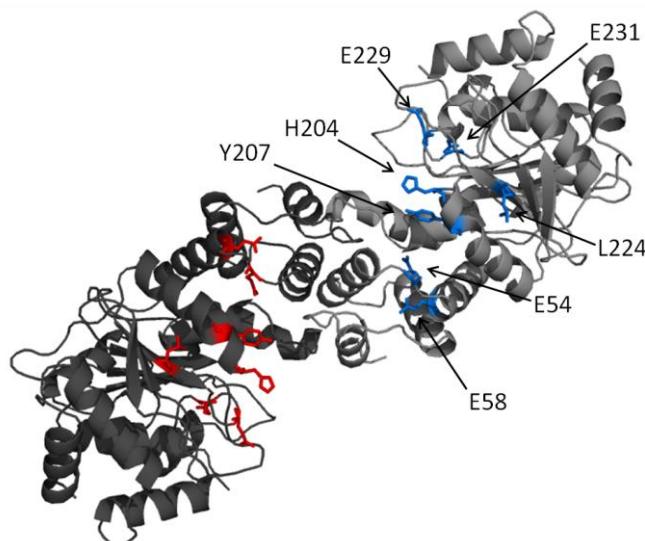


Abbildung 4.15: Bändermodell von YbiB mit Markierung der gegen Alanin ausgetauschten Aminosäuren. Die beiden Untereinheiten von YbiB sind in verschiedenen Grautönen dargestellt. Die fraglichen Aminosäuren sind mit Seitenketten gezeigt und im einen Protomer rot, im anderen blau hervorgehoben. Für ein Protomer wurden die Aminosäuren beschriftet.

Die einzelnen *ybiB*-Varianten wurden nach ihrer Herstellung mittels OE-PCR (3.2.6), in den pQE60-Vektor kloniert und in *E. coli* rekombinant exprimiert (3.3.3). Die betreffenden Proteine wurden gereinigt (3.3.4) und anschließend ihre Bindungseigenschaften an ein 12 Basen langes dT-DNA-Stück mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert (3.4.12). Der Fit der Titrationskurven mit Formel 5 (3.4.12) ergab, dass alle YbiB-Varianten, ebenso wie das Wildtyp-Protein, jeweils ein ssDNA-Molekül pro Proteindimer binden (vgl. **Tabelle 4.2**). Die für jede Variante ermittelten K_D -Werte sind in **Tabelle 4.3** gezeigt.

Tabelle 4.3: Ergebnis der Fluoreszenztitration von YbiB-Varianten mit einem 12 b dT-Oligonukleotid.

Protein	K _D -Wert _{Fluoreszenztitration} [nM]
YbiB wt	49
YbiB E54A	28
YbiB E58A	39
YbiB H204A	98
YbiB Y207A	28
YbiB L224A	150
YbiB E229A	60
YbiB E231A	20

Die Dissoziationskonstanten aller Proteine sind dabei sehr ähnlich. Dementsprechend beeinflussen die einzelnen Aminosäureaustausche die Bindung der Proteine an das untersuchte Oligonukleotid nicht oder nur unwesentlich.

Zusätzlich wurde mit einer weiteren Methode, der Oberflächenplasmonresonanz (SPR), die Interaktion zwischen den YbiB-Varianten und ssDNA analysiert (3.4.12). Hierfür wurde wiederum ein 12 b dT-Oligonukleotid verwendet, das über eine 5'-Biotinylierung auf einem mit Streptavidin beschichteten Chip immobilisiert wurde (3.4.12). Die einzelnen Proteinvarianten wurden anschließend in mehreren Konzentrationen über die so modifizierte Oberfläche gepumpt und die Interaktion zwischen ssDNA und Protein gemessen. Exemplarisch sind die Sensogramme für zwei YbiB-Varianten in **Abbildung 4.16** gezeigt. Die Bindungskurven der anderen Proteine finden sich im Anhang (**Abbildung 7.1**).

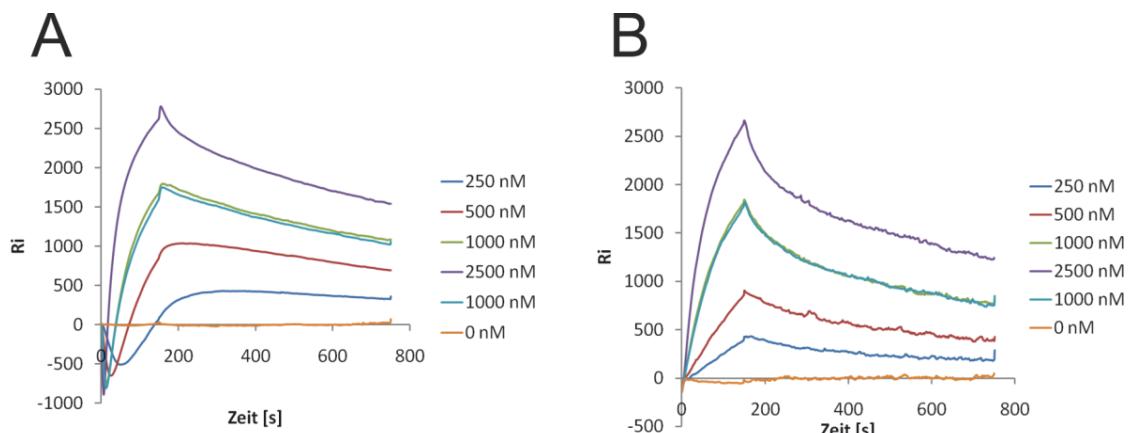


Abbildung 4.16: Analyse der Bindungseigenschaften von YbiB wt (A) und YbiB Y207A (B) an ein 12 b dT-Oligonukleotid mit SPR. Die gemessene Signaländerung (Ri) ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Bindung an das immobilisierte Oligonukleotid wurde jeweils mit den angegebenen Proteinconzentrationen getestet. Die Assoziationsphase wurde jeweils 180 s verfolgt. Die, durch Zugabe von Puffer induzierte, Dissoziation wurde anschließend 600 s gemessen.

Es zeigten alle Proteine ein deutliches, in seiner Stärke und seinem Verlauf konzentrationsabhängiges, Bindungssignal. Somit konnte für alle YbiB-Varianten auch mit der Methode der SPR eine Bindung an das 12 b dT-Oligonukleotid beobachtet werden. Die beiden Varianten YbiB-E229A und -E231A zeigten allerdings unter den gewählten experimentellen Bedingungen, vermutlich aufgrund der langen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im *autosampler* des Geräts, deutliche Aggregationstendenzen. Dementsprechend unterscheiden sich hier die Sensogramme in ihrem Verlauf von denen der anderen Proteine (**Abbildung 7.1**) und wurden deshalb nicht für weitere Auswertungen herangezogen.

Als generell problematisch für die quantitative Auswertung erwiesen sich die negativen Ausschläge der Bindungskurven zu Beginn der Assoziationsphase (**Abbildung 4.16 A**). Diese wurden durch unspezifische Bindung von YbiB an die nicht funktionalisierte Oberfläche der Referenzzelle hervorgerufen. Dieses Phänomen wurde jedoch im Verlauf der Messungen immer schwächer, vermutlich weil die unspezifischen Bindungsstellen der Referenzzelle zunehmend mit Protein abgesättigt wurden (**Abbildung 4.16 B**). Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_a) war allerdings trotzdem nicht möglich. Grund dafür war die Immobilisierung einer zu großen Menge Oligonukleotid auf dem Chip (Anja Drescher, GE HEALTHCARE, persönliche Mitteilung). Dadurch kommt es bei der Assoziation zu einer signifikanten Änderung der Proteinkonzentration in der Nähe der Oberfläche. Da die Proteinkonzentration zum Auswerten der Daten allerdings bekannt und konstant sein muss, liefert die Auswertung solcher Bindungsdaten fehlerhafte Ergebnisse. Zusätzlich können im vorliegenden Fall die einzelnen Oligonukleotide, aufgrund ihrer hohen Dichte auf der Oberfläche, nicht mehr als unabhängige Bindestellen betrachtet werden. Die Immobilisierung von lediglich ca. 5 – 10 % der hier aufgebrachten Oligonukleotidmenge wäre erfolgversprechender gewesen. Somit konnten für die jeweiligen Varianten nur die Dissoziationsphasen ausgewertet werden, da hier die tatsächliche Proteinkonzentration keine Rolle spielt. Daraus wurden jeweils die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation k_d ermittelt, die für alle getesteten YbiB-Varianten in einem ähnlichen Bereich liegen (**Tabelle 4.4**).

Tabelle 4.4: Geschwindigkeitskonstante k_d für die Dissoziation verschiedener YbiB-Varianten von einem immobilisierten 12 b dT-Oligonukleotid.

Protein	k_d [s ⁻¹]
YbiB wt	0,0014
YbiB E54A	0,0012
YbiB E58A	0,0026
YbiB H204A	0,0041
YbiB Y207A	0,0027
YbiB L224A	0,0044

Die erzeugten YbiB-Mutanten mit einzelnen Alaninaustauschen von konservierten Aminosäuren zeigen also alle unveränderte Bindungeigenschaften für das getestete 12 b dT-Oligonukleotid, sowohl bezüglich Stöchiometrie, als auch in Hinsicht auf Affinität und Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationskonstante k_d . Die Aufgabe dieser Aminosäuren in der TrpD2-Proteinfamilie liegt demnach nicht in der Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren. Ihre mögliche Funktion wurde später mit anderen Experimenten weiter untersucht (4.4.4).

4.2.3 Untersuchung der Sequenzspezifität von YbiB durch SELEX

Bei der Charakterisierung der Bindungseigenschaften von YbiB durch Fluoreszenzspektroskopie konnte keine Bevorzugung bestimmter Nukleinsäuresequenzen gefunden werden (**Tabelle 4.2**). Es zeigte sich dabei vielmehr eine sequenzunabhängige Interaktion, die nur von den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren vermittelt wird. Aufgrund der nur sehr geringen Zahl von getesteten Oligonukleotidsequenzen konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass Sequenzmotive existieren, die stärker mit YbiB interagieren können und dementsprechend bevorzugt gebunden werden. Um dies zu überprüfen, sollte mit SELEX (3.2.15) nach einer spezifischen Bindesequenz für YbiB gesucht werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits früher die Bindungsmotive von nukleinsäurebindenden Proteinen identifiziert werden (Tuerk et al., 1990). SELEX ist jedoch auch die gängige Methode, um sog. Aptamere zu selektieren, also DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide, die rein aufgrund ihrer 3D-Struktur an Proteine oder andere Moleküle spezifisch und hochaffin binden können. Die erfolgreiche Selektion eines hochaffin bindenden Oligonukleotids bedeutet also nicht automatisch das Auffinden einer YbiB-spezifischen Bindesequenz, stellt aber in jedem Fall einen Wert für sich dar.

Die in dieser Arbeit gezeigten Selektionen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Günter Mayer an der Universität Bonn durchgeführt und erfolgten parallel mit zwei

unterschiedlichen Zufallsbibliotheken. Da zuvor gezeigt wurde, dass YbiB einzelsträngige RNA und DNA mit vergleichbaren Parametern bindet (**Abbildung 4.13**; **Tabelle 4.2**), wurde versucht, sowohl ssRNA-Motive (A50-Bibliothek; variable Region: 50 Nukleotide), als auch ssDNA-Motive (D3-Bibliothek; variable Region: 43 Nukleotide) zu selektieren. Dazu wurde gereinigtes YbiB mit C-terminalem *strep-II*[®]-tag an magnetische Streptavidin-*beads* als Trägermaterial gekoppelt und die Selektionen wie unter 3.2.15 beschrieben durchgeführt. In beiden Selektionen wurde als Puffer 1-fach PBS-Puffer mit 3 mM MgCl₂ und 0,8 mg/ml BSA verwendet. Das darin enthaltene Phosphat sollte die unspezifischen Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und YbiB schwächen und so die Anreicherung besser bindender Sequenzmotive erleichtern. Magnesium ist als Gegenion der Phosphatgruppen wichtig für die Faltung der Oligonukleotide, während durch das BSA unspezifisch mit Proteinen wechselwirkende Sequenzen aus den Bibliotheken entfernt werden sollten.

Durch die Verringerung der eingesetzten Protein- und Nukleinsäuremenge, sowie durch eine Erhöhung der Anzahl von Waschschritten (vgl. **Tabelle 3.1**) im Verlauf der Selektionsrunden wurde die Stringenz der Selektion schrittweise erhöht. Dadurch sollten im Verlauf des SELEX-Experiments nur die am stärksten bindenden Sequenzmotive im *pool* der Oligonukleotide verbleiben und somit ein möglichst spezifisches Aptamer isoliert werden können.

Bei beiden Bibliotheken wurde jeweils nach der neunten Selektionsrunde getestet, ob eine Anreicherung besser bindender Sequenzmotive erzielt werden konnte. Dazu wurden die ssRNA der A50-Bibliothek, sowie die ssRNA-*pools* nach den Selektionsrunden 2, 4, 6, 8 und 9 radioaktiv markiert. Mit der ssDNA der D3-Bibliothek und den DNA-*pools* nach den Selektionsrunden 8 und 9 wurde entsprechend verfahren. Anschließend wurden ihre Bindungseigenschaften an YbiB mit einem Filtertest analysiert (3.4.12). Dabei bleiben die markierten Oligonukleotide nur auf einer Nitrocellulosemembran haften, wenn sie an das darauf immobilisierte Protein binden. Somit ist die Stärke des radioaktiven Signals proportional zur Menge an proteingebundenen Nukleinsäuren. Wenn also durch die Selektion besser bindende Sequenzen angereichert wurden, nimmt das radioaktive Signal im Vergleich zur Ausgangsbibliothek zu. Dadurch lässt sich sehr schnell und effizient der Erfolg eines SELEX-Experiments abschätzen (**Abbildung 4.17**).

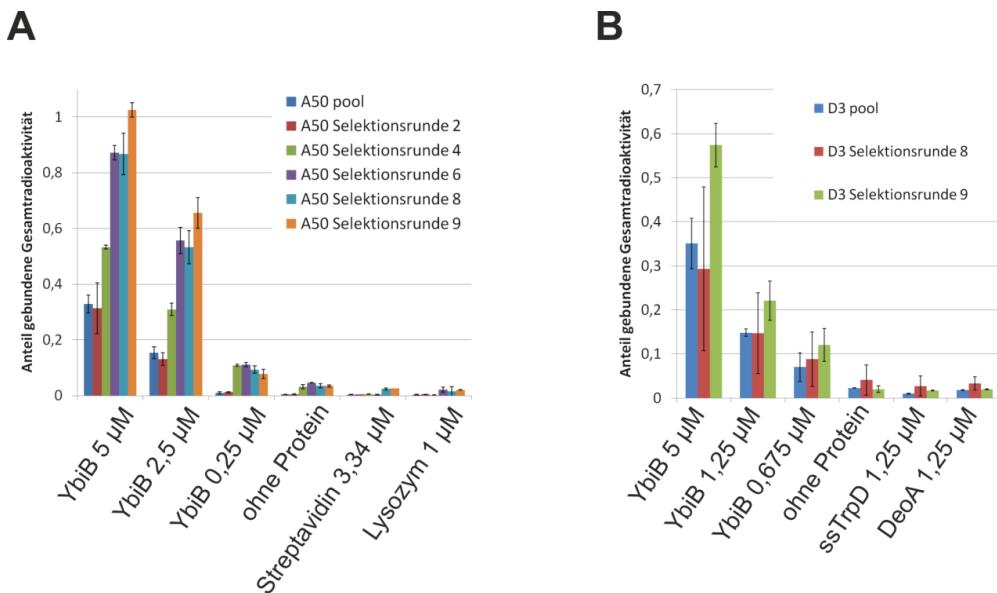


Abbildung 4.17: Analyse der SELEX-Anreicherung in neun Selektionsrunden. (A) Filterbindung der Selektion auf ssRNA (A50-Bibliothek). Die Bindung wurde an YbiB in mehreren Konzentrationen, sowie drei Negativkontrollen (ohne Protein, Streptavidin, Lysozym) getestet. (B) Filterbindung mit der Selektion auf ssDNA (D3-Bibliothek). Auch hier wurde die Interaktion der Nukleinsäuren mit verschiedenen Konzentrationen an YbiB und Negativkontrollen (ohne Protein, ssTrpD, DeoA) analysiert. Die Selektionsrunden sind bei beiden Diagrammen gemäß der Legende farblich markiert. Die verwendeten Proteine sind mit den eingesetzten Konzentrationen unterhalb der Diagramme angegeben. Auf der y-Achse ist der Anteil der gebundenen Radioaktivität (normiert auf die Gesamtradioaktivität je Markierungsreaktion) aufgetragen. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die daraus resultierenden Standardabweichungen wieder.

Beide Ausgangsbibliotheken zeigten bereits zu Beginn der Selektion eine relativ starke Bindung an YbiB (dunkelblaue Balken). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den biophysikalischen Messungen, dass YbiB sequenzunspezifisch mit hoher Affinität Nukleinsäuren bindet (4.2.1). Die beiden verwendeten Kontrollproteine bei der ssRNA-Bibliothek, Streptavidin und Lysozym, zeigten erwartungsgemäß keine Bindung an die Oligonukleotide (**Abbildung 4.17 A**). Bei der D3-Bibliothek wurden als Kontrollen die mit YbiB verwandten Proteine DeoA (*E. coli*-Vertreter der NP-II-Familie) und ssTrpD verwendet (vgl. Abb. 1.1). Sie binden auch in den Filtertests nicht an die Oligonukleotide (**Abbildung 4.17 B**). Somit konnte erneut mit einer unabhängigen Methode gezeigt werden, dass die nächsten Verwandten der TrpD2-Proteine nicht in der Lage sind, Nukleinsäuren zu binden (vgl. 4.2.1).

Bei der A50-Bibliothek konnte durch die Selektionsrunden eine deutliche Verbesserung der anfänglichen Interaktion mit YbiB erreicht werden. Dabei zeigte sich vor allem nach dem sechsten Selektionszyklus ein erheblicher Anstieg der Menge an gebundenen Oligonukleotiden, die im weiteren Verlauf des Experiments nur noch wenig erhöht werden konnte. Dieses Ergebnis war bei allen getesteten Konzentrationen an YbiB zu beobachten, auch wenn jeweils die maximal gebundene Radioaktivität mit sinkender Proteinkonzentration, wie erwartet, abnahm. Weil nach der sechsten Selektionsrunde die Bindung kaum noch verbessert werden konnte, erschienen weitere Selektionszyklen

als nicht sinnvoll. Deshalb wurde die Selektion beendet und mit der Analyse der selektierten Sequenzmotive fortgefahren.

Bei der D3-Bibliothek dagegen zeigte sich nach acht Selektionsrunden keine Verbesserung der ssDNA-Bindung an YbiB. Auch der neunte Selektionszyklus führte noch zu keiner zufriedenstellenden Verbesserung. Aus diesem Grund wurde die Selektion weiter fortgesetzt. Es erfolgten drei weitere Runden gemäß 3.2.15. Anschließend wurde durch erneute Filterbindung (3.4.12) das Ergebnis der Anreicherung überprüft (**Abbildung 4.18**).

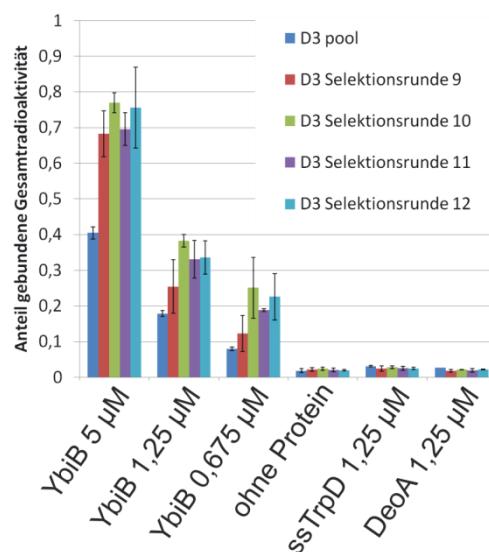


Abbildung 4.18: Analyse der SELEX-Anreicherung aus der D3-Bibliothek bis Selektionsrunde 12. Durch Filterbindung wurde die Interaktion der Oligonukleotide mit verschiedenen Konzentrationen YbiB und drei Negativkontrollen (ohne Protein, ssTrpD, DeoA) getestet. Die Selektionsrunden sind gemäß der Legende farblich markiert. Die verwendeten Proteine mit den eingesetzten Konzentrationen sind unterhalb des Diagramms angegeben. Auf der y-Achse ist der Anteil der gebundenen Radioaktivität aufgetragen. Alle Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die resultierenden Standardabweichungen wieder.

Durch die zusätzlichen Selektionsrunden konnte die Bindung an YbiB tatsächlich weiter verbessert werden. Dabei führte vor allem der zehnte Selektionszyklus zu einer verstärkten Interaktion der Oligonukleotide mit YbiB, die dann über die weiteren beiden Runden konstant blieb. Die Selektion wurde nun auch für ssDNA-Bibliothek beendet und die selektierten Sequenzen einzeln auf ihre Bindung an YbiB getestet.

Dazu wurde die, von der ssRNA abgeleitete, doppelsträngige DNA der Selektionsrunde sechs aus der A50-Bibliothek und die DNA der Selektionsrunde zehn aus der D3-Bibliothek in einen Vektor ligiert und damit *E. coli* transformiert (3.1.3). Die Plasmide wurden anschließend aus mehreren Einzelklonen isoliert und die Inserts sequenziert. Darauf aufbauend wurde für beide Selektionen ein multiples Sequenzalignment erstellt und die bei der Selektion angereicherten Sequenzmotive jeweils miteinander verglichen (**Abbildung 4.19**).

A

	*	20	*	40	*	60	*							
Variante2	:	-	-	-	-	-	-							
Variante3	:	-	-	-	-	-	-							
Variante4	:	-	-	-	-	-	-							
Variante26	:	-	-	-	-	-	-							
Variante15	:	-	-	-	-	-	-							
Variante17	:	-	-	-	-	-	-							
Variante21	:	-	-	-	-	-	-							
Variante28	:	-	-	-	-	-	-							
Variante6	:	-	-	-	-	-	-							
Variante7	:	-	-	-	-	-	-							
Variante5	:	ATTTCCCATTGTCCACTCTAGATCTAATTGGGAGGTAATAGGGCGGAGGG				-AGA-	-							
Konsensus	:	g	gTg	a	gg	g	AGGG	G	G	cac	t	t	t	A

B

	*	20	*	40	
Variante4	CGTCATAATACATTGC	CACCCGAGCAGGGTTGTATATCCTCTA	----		: 44
Variante10	CGTCATA-TACATTGC	CACCCGAGCAGGGTTGTATATCCTCTA	----		: 43
Variante29	CGTATAATACATTGC	CACCCGAGCAGGGTTGTATATCCTCTA	----		: 44
Variante11	-TGGAGAACATCAGTAACG	CACCGGGTCGAGGGTTACA-ATCTTCTT	----		: 43
Variante6	ATCCGATACTGAACCGC	TAATCGCGCAGATTTCATATGAATT	----		: 43
Variante7	---CCCGCTACGAATTCT	CCACCATTTCTGACTCTGCATGCTTAT	----		: 43
Variante25	-----TAGACTGATCCA	AAACTACTCACGCCTGACCAACACTCCTCC	----		: 43
Variante21	-----CGACCCCTAAGG	CTGCTTAAGAGATCTGACGAATGGCATAACCG	----		: 44
Konsensus	g t c c ca c c ca g tt a at T				

Abbildung 4.19: Multiples Sequenzalignement der aus den beiden SELEX Experimenten isolierten Varianten. (A) Alignment der Sequenzen der Selektionsrunde 6 mit der A50 (ssRNA) Bibliothek. (B) Alignment der Sequenzen der Selektionsrunde 10 mit der D3 (ssDNA) Bibliothek. Die Positionen wurden in beiden Alignments nach ihrer Konserviertheit gefärbt (Schwarz: 100% konserviert, dunkelgrau > 80 % konserviert; hellgrau > 60 % konserviert). Im Konsensus werden vollständig konservierte Basen des multiplen Sequenzalignments durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Kleinbuchstaben markieren Basen, die mindestens zu 80 % konserviert sind. Von den orange markierten Sequenzen wurde später die Interaktion mit YbiB über Filterbindung getestet.

Die elf sequenzierten Varianten aus der A50-Bibliothek lieferten 5 unterschiedliche Nukleinsäuresequenzen. Alle zeigten im multiplen Sequenzalignement einen vollständig konservierten Bereich von Position 41 - 44. In zehn der elf Sequenzen waren darüber hinaus weitere Bereiche der Sequenzen ebenfalls stark konserviert; lediglich Variante 5 zeigte wenig Homologie zu den restlichen Sequenzen (**Abbildung 4.19 A**). Jeweils ein Vertreter jeder Sequenzfamilie wurde im Anschluss weiter analysiert.

Die acht sequenzierten Varianten der D3-Bibliothek lieferten 6 unterschiedliche Basenabfolgen. Die drei Varianten 4, 11 und 6 zeigten über den gesamten Sequenzbereich eine relativ hohe Ähnlichkeit zueinander. Die restlichen Sequenzen zeigten untereinander und zu den anderen drei Motiven nur wenig Homologie (**Abbildung 4.19 B**). Alle sechs nicht redundanten Sequenzen wurden weiter analysiert.

Um die am stärksten bindenden Varianten zu identifizieren, wurden nun für alle in **Abbildung 4.19** orange markierten Sequenzen die Dissoziationskonstanten der Interaktion mit YbiB über Filtertests quantifiziert (3.4.12). Obwohl mit dieser Methode lediglich apparente K_D -Werte bestimmt werden können, eignet sie sich sehr gut, um die Affinitäten vieler verschiedener Sequenzen schnell miteinander zu vergleichen. Dazu wurden die einzelnen Oligonukleotide zunächst radioaktiv markiert, und jeweils mit

verschiedenen Konzentrationen YbiB inkubiert. Anschließend wurde die gebundene Radioaktivität quantifiziert. Das Protein befand sich dabei in den Ansätzen stets in einem großen Überschuss zu den Oligonukleotiden. Somit entspricht die Proteinkonzentration, bei der die Hälfte des maximalen Bindungssignals in der Sättigung erreicht wird, dem apparenten K_D -Wert der Interaktion. (Grundvoraussetzung für eine Bestimmung des K_D -Werts ist also eine Sättigung der Bindung bei steigenden Proteinkonzentrationen. Der Absolutwert der am Filter gebundenen Radioaktivität hat hingegen keine Aussagekraft für die Affinität, er ergibt sich v.a. aus der Effizienz der radioaktiven Markierung des Oligos.) Es wurden auf diese Weise zunächst die Affinitäten der Sequenzen aus der A50-Bibliothek (ssRNA) isolierten Oligonukleotide für YbiB bestimmt (**Abbildung 4.20**).

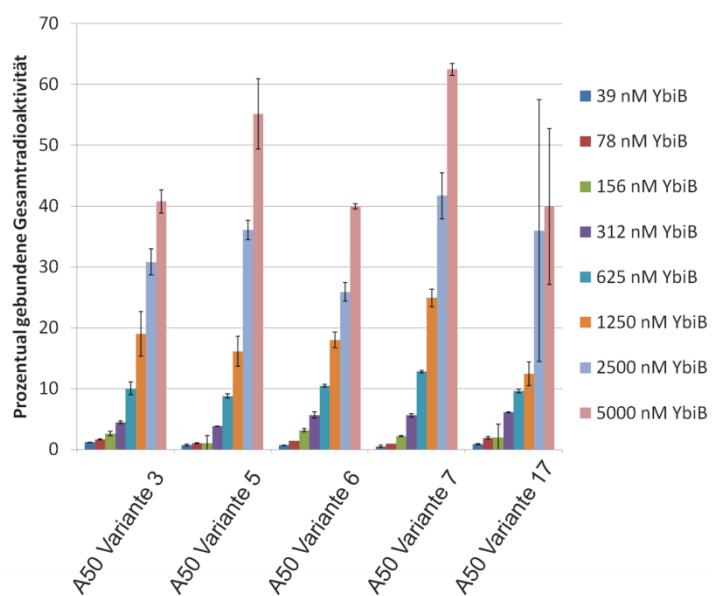


Abbildung 4.20: Bestimmung der Affinität isolierter ssRNA-Sequenzen für YbiB durch Filterbindung. Unterschiedliche Konzentrationen an YbiB (farbig markiert) wurden mit durch SELEX in Selektionsrunde 6 isolierten, radioaktiv markierten Sequenzen (unterhalb der Balken angegeben) inkubiert und der Komplex auf Filtern zurückgehalten. Auf der y-Achse ist die prozentual am Filter gebundene Radioaktivität aufgetragen. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die berechneten Standardabweichungen wieder.

Überraschenderweise konnte für vier der fünf getesteten Sequenzen eindeutig keine Sättigung der Bindung bis $5 \mu\text{M}$ Proteinkonzentration beobachtet werden. Nur bei Klon 17 könnte möglicherweise bei der höchsten Proteinkonzentration Sättigung erreicht worden sein. Aufgrund der großen Standardabweichungen bei den beiden höchsten Proteinkonzentrationen ist das Bindungsverhalten hier jedoch nicht zweifelsfrei zu beurteilen. Der K_D -Wert für die getesteten Interaktionen ist somit stets größer als $2,5 \mu\text{M}$. Trotz der sehr vielversprechend wirkenden Verbesserung der Bindung im Laufe der Selektionsrunden (vgl. **Abbildung 4.17**) konnten also nur sehr niedrig affine Oligonukleotide unter den sequenzierten Klonen gefunden werden. Dementsprechend ist nicht davon auszugehen, dass mit der Selektion tatsächlich

spezifische Aptamere für YbiB angereichert wurden. Die Ursache für dieses Ergebnis konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise würde die Analyse weiterer Sequenzen aus der Selektion mit der A50-Bibliothek doch noch zur Identifikation stärker bindender Oligonukleotide führen. Dabei wäre es durchaus sinnvoll, auch spätere Selektionsrunden zu analysieren und die Dissoziationskonstanten daraus isolierter Oligonukleotide für YbiB zu ermitteln.

Analog wurden nun die Affinitäten der aus der D3-Bibliothek (ssDNA) isolierten Oligonukleotide für YbiB bestimmt (**Abbildung 4.21**).

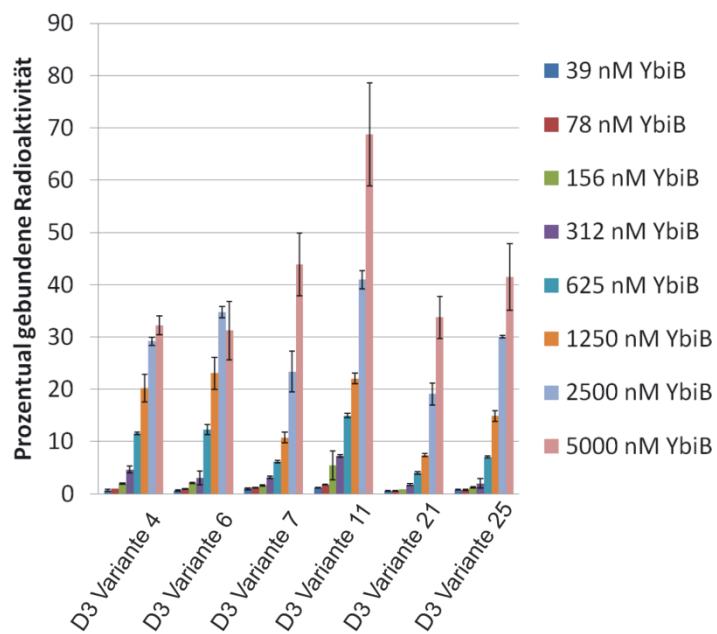


Abbildung 4.21: Bestimmung der Affinität isolierter ssDNA-Sequenzen für YbiB durch Filterbindung. Unterschiedlichen Konzentrationen an YbiB (farbig markiert) wurden mit durch SELEX in Selektionsrunde 10 isolierten, radioaktiv markierten Sequenzen (unterhalb der Balken angegeben) inkubiert und der Komplex auf Filtern zurückgehalten. Auf der y-Achse ist die prozentual am Filter gebundene Radioaktivität aufgetragen. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die berechneten Standardabweichungen wieder

Hier zeigten vier der getesteten Sequenzen ebenfalls keine Sättigung der Bindung bis $5 \mu\text{M}$ Proteinkonzentration, was erneut auf einen hohen K_D -Wert und somit eine unspezifische Bindung hindeutet. Für die Klone 4 und 6 dagegen wurde eine deutlich höhere Affinität gemessen. Da hier die Bindung im getesteten Konzentrationsbereich jeweils eine Sättigung zeigte, konnte für beide Oligonukleotide ein K_D -Wert von ca. 900 nM bestimmt werden. Dieser Wert ist deutlich niedriger als bei den anderen getesteten Oligonukleotiden. Somit konnten tatsächlich mittels SELEX besser an YbiB bindende ssDNA-Sequenzmotive gefunden werden. Ob es sich dabei allerdings tatsächlich um eine für YbiB funktionell wichtige Sequenzspezifität handelt oder ob lediglich spezifische Aptamere für das Protein isoliert wurden, kann erst durch weitere Analysen geklärt werden.

Dazu wurde bereits mit den vollständigen Sequenzen der beiden isolierten Aptamere das *E. coli*-Genom auf das Vorkommen ähnlicher Sequenzmotive hin durchsucht. Dabei ergab sich allerdings eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse von den gewählten Parametern der BLAST-Suche. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wird derzeit von Alexandra Holinski im Rahmen ihrer Masterarbeit in den beiden relativ langen Sequenzen der für die Interaktion mit YbiB entscheidende Bereich eingegrenzt. Anschließend soll mit diesen Sequenzen nochmals das Genom von *E. coli* durchsucht werden. *In vitro* Bindungsstudien durch Fluoreszenzpolarisation zeigten bereits, dass die isolierten Aptamere (ohne *priming sites*) deutlich besser an YbiB binden als gleich lange dT-Oligonukleotide. Dieser Effekt tritt umso deutlicher in Erscheinung, je höher die eingesetzte Phosphatkonzentration im Messpuffer ist (A. Holinski, persönliche Mitteilung).

4.3 Kristallisation von YbiB im Komplex mit Nukleinsäuren

Ausgehend von der Apostruktur von YbiB konnte durch mehrere biochemische Experimente die Fähigkeit des Proteins zur Bindung von einzelsträngiger DNA und RNA gezeigt werden. Dabei interagieren sehr wahrscheinlich positiv geladene Seitenketten mit dem Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren. Für die weitere funktionelle Charakterisierung der TrpD2-Proteinfamilie sollte im Rahmen dieser Arbeit YbiB gemeinsam mit einem gebundenen Oligonukleotid kristallisiert und von diesem Komplex die Röntgenstruktur gelöst werden. Diese wäre von großem Wert, da sowohl die genaue Bindungsstelle an YbiB, sowie die Orientierung der Nukleinsäure im Komplex unklar sind. Zusätzlich werden wahrscheinlich Form und Größe des putativen aktiven Zentrums von YbiB stark von den gebundenen Nukleinsäuren beeinflusst, weshalb Ansätze zur Funktionsaufklärung wie *docking* erst möglich sind, wenn eine hochauflöste Struktur des Komplexes vorliegt.

4.3.1 Strategie

Zunächst wurde versucht, Bedingungen zu identifizieren, bei denen YbiB zusammen mit gebundenem Oligonukleotid für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle ausbildet. In Kooperation mit Prof. Olga Mayans wurden Oligonukleotide verschiedener Länge und Sequenz zusammen mit YbiB in Kristallisationsscreens eingesetzt. Dabei wurden sehr viele Kristalle gefunden. Durch Messung und Analyse der Beugungsmuster sollten anschließend Kristalle, die den Komplex enthielten, von denjenigen, die nur aus YbiB bestanden, unterschieden werden. Bei über 200 getesteten Kristallen wurden ausschließlich solche gefunden, die aus dem Protein alleine bestanden. Möglicherweise wird durch die hohen Salzkonzentrationen in den Kristallisationsansätzen die Interaktion von YbiB mit den Oligonukleotiden unterbunden und so die Kristallisation

des Komplexes verhindert. Mit herkömmlichen Testansätzen konnte somit die Röntgenstruktur des Komplexes nicht gelöst werden.

Da vor allem die Analyse der Kristalle sehr aufwändig war, musste versucht werden, bei zukünftigen Kristallisationsscreens die Zahl der falschpositiven Ergebnisse zu reduzieren. Durch kovalente Fixierung der Nukleinsäuren an YbiB könnte die Dissoziation der beiden Interaktionspartner verhindert werden, wodurch entstandene Kristalle sicher den Komplex enthalten würden. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass das Oligonukleotid in seiner nativen Bindungsstelle am Protein fixiert wird und der Komplex möglichst homogen ist, um gute Beugungsmuster bei der Röntgenkristallographie zu gewährleisten. Aus diesem Grund konnte kein *crosslinking* mit Chemikalien durchgeführt werden, da hier die Oligonukleotide an unterschiedlichsten Stellen und in verschiedenen Orientierungen an YbiB fixiert worden wären (vgl. 4.4.3). Dagegen würde die kovalente Verknüpfung des Oligonukleotids mit YbiB durch eine in der Oberflächenfalte des Protein inkorporierte, nichtnatürliche Aminosäure (Chin et al., 2002) zu einer definierten Konformation des Komplexes unter Fixierung der nativen Bindungskonformation führen. Die Verknüpfung zwischen dem Protein und den Oligonukleotiden wurde in dieser Arbeit mit der lichtaktivierbaren, nichtnatürlichen Aminosäure p-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBPA) durchgeführt. Auf diese Weise wurden bereits Nukleinsäuren mit Proteinen erfolgreich kovalent verknüpft (Lee et al., 2009).

4.3.2 Auswahl und Evaluierung der YbiB-pBPA Varianten

Zunächst mussten geeignete Positionen in YbiB für den Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure identifiziert werden. Mögliche Kandidaten dürfen aufgrund der Reichweite des *photocrosslinks* maximal einen Abstand von 3,1 Å zur vermutlichen Lage der Nukleinsäuren aufweisen. Zusätzlich sollten vielversprechende Positionen möglichst oberflächenexponiert sein, um die Wahrscheinlichkeit für einen intramolekularen *crosslink* innerhalb des Proteins zu verringern. Bei der zu mutierenden Aminosäure sollte es sich außerdem um einen großen, aromatischen Rest handeln, da in so einem Fall der Austausch zur noch größeren pBPA-Seitenkette nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität und Struktur von YbiB zeigen sollte. Mit diesen Einschränkungen konnten die vielversprechenden Positionen für den Einbau von pBPA in YbiB auf zwei Kandidaten reduziert werden. Dabei handelt es sich um das Histidin 204 und das Tyrosin 207, zwei Residuen, von denen zudem zu vermuten ist, dass sie mit der Nukleinsäure katalytisch interagieren (**Abbildung 4.9**). Ihre Lage auf dem Protein in Relation zur angenommenen Nukleinsäurebindestelle ist **Abbildung 4.22** zu entnehmen.

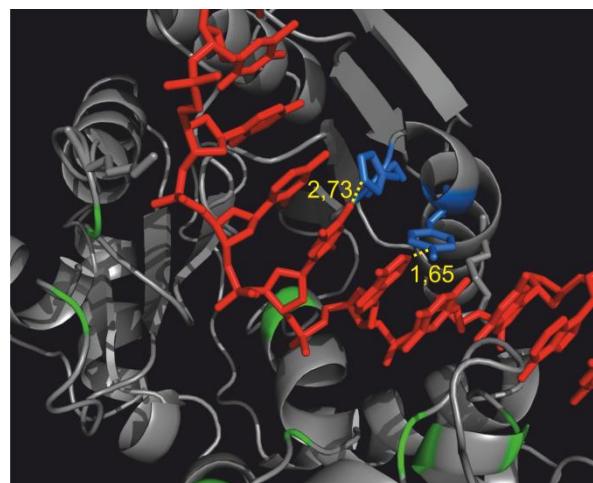


Abbildung 4.22: Lage der gegen pBPA ausgetauschten Residuen in YbiB. Bändermodell der Nukleinsäurebindestelle einer Untereinheit von YbiB. Ein DNA-Einzelstrang wurde in die Bindestelle eingepasst und ist rot dargestellt. Konservierte Lysine und Arginine sind grün gefärbt, H204 und Y207 sind blau gezeigt. Die Abstände zwischen diesen beiden Aminosäuren und den Nukleobasen sind gelb markiert und angegeben.

Beide Varianten wurden entsprechend 3.3.8 hergestellt und ihre Eigenschaften analysiert. Mit dem besser zu reinigenden und effizienter mit Oligonukleotiden verknüpfbaren Protein sollte die Kristallisation des Komplexes erneut getestet werden.

Zunächst wurde in *ybiB* an den entsprechenden, für H204 und Y207 codierenden, Positionen jeweils das *amber*-Stoppcodon (TAG) eingeführt (3.2.6), diese Konstrukte in den pQE60-Expressionsvektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft (3.2.12). Anschließend wurden *E. coli* M15-Zellen mit dem pEVOL-Plasmid transformiert, welches den Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure pBPA durch Suppression des *amber*-Stoppcodons ermöglicht. In diesen Stamm wurden nun die korrekt sequenzierten pQE60-Plasmide mit den beiden *ybiB*-TAG-Varianten transformiert. Die Testexpression zeigte, dass beide Varianten löslich in *E. coli* hergestellt wurden, allerdings anders als beim Wildtyp sich ein erheblicher Teil des Proteins in der unlöslichen Fraktion befindet (Daten nicht gezeigt). Von jeder Variante wurde anschließend eine präparative Expression in jeweils 1 l LB-Selektivmedium durchgeführt. Dabei entsprach das Vorgehen 3.3.8, wobei die Zellen nach der Induktion für 6 h bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proteine durch Metallchelataffinitätschromatographie gereinigt. Auf diese Weise konnten die YbiB-Varianten in ausreichender Reinheit und Menge für weitere Analysen isoliert werden. Die Ausbeute betrug für YbiB H204pBPA 2,6 mg, für YbiB Y207pBPA 3,4 mg an sauberem Protein.

Für beide YbiB-Varianten wurde nun die Quervernetzung mit Oligonukleotiden getestet. Dazu wurden 10 µM Protein in verschiedenen molaren Verhältnissen mit einem 12 b dT-Oligonukleotid gemischt und die lichtinduzierte Quervernetzung gemäß

3.3.9 durchgeführt. Das Ergebnis des *crosslinks* wurde mittels SDS-PAGE (3.4.3) analysiert (**Abbildung 4.23**).

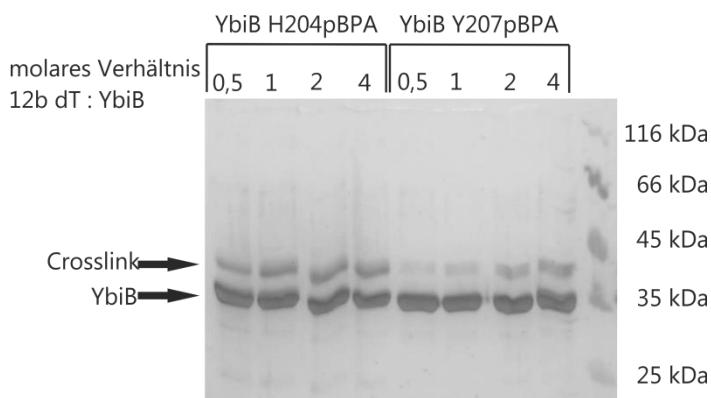


Abbildung 4.23: Crosslink der YbiB-Varianten mit einem 12 b dT-Oligonukleotid. Komplex und freies Protein wurden über SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) getrennt und durch Silberfärbung visualisiert. Die Quervernetzung wurde jeweils mit unterschiedlichen Mengen Oligonukleotid getestet. Die molaren Verhältnisse sind jeweils über den entsprechenden Spuren angegeben. Es konnte für beide Proteine sowohl die Bande für das YbiB Monomer bei ca. 35 kDa, wie auch die Bande für das Protein mit kovalent gebundenem Oligonukleotid bei ungefähr 39 kDa gefunden werden.

Neben der Bande für das freie YbiB konnte bei beiden Proteinen eine Quervernetzung von YbiB und dem Oligonukleotid durch das Auftreten einer zweiten Bande mit höherem Molekulargewicht beobachtet werden. Bei der Variante H204pBPA blieb ab einem molaren Verhältnis von Oligonukleotid zu YbiB von 1:1 die Menge an Komplex annähernd konstant. Bei Y207pBPA dagegen stieg die Ausbeute an quervernetztem Protein bis zu einem molaren Verhältnis des Oligonukleotids zu YbiB von 4:1 immer weiter an. Insgesamt konnte bei der Variante YbiB H204pBPA deutlich mehr quervernetzter Komplex gefunden werden, sein Anteil am Gesamtprotein wurde anhand des Gels auf ca. 5 % – 10 % geschätzt. Bei den restlichen 90 % - 95 % kommt es wahrscheinlich zu einer intramolekularen Reaktion mit pBPA. Eine kovalente Bindung des Oligonukleotids an beide Untereinheiten des YbiB Dimers mit einer daraus resultierenden Bande bei ca. 70 kDa wurde bei keiner der beiden Varianten beobachtet. Vermutlich ist der Grund dafür die relativ geringe Effizienz der lichtinduzierten, intermolekularen Quervernetzungsreaktion. Ausgehend von 10% Effizienz für die einfache Quervernetzung würden rechnerisch nur 1 % beider Untereinheiten des Dimers doppelt mit dem Oligonukleotid quervernetzt werden.

4.3.3 Präparative Reinigung des Komplexes zur Kristallisation

Die Effizienz der intermolekularen Quervernetzung zwischen dem Oligonukleotid und YbiB war bei Einbau von pBPA an der Position 204 größer, weshalb die weiteren Versuche zur Kristallisation mit diesem Protein durchgeführt wurden. Dazu wurden nun größere Mengen des Komplexes hergestellt und selektiv von ungebundenem Protein und Oligonukleotiden getrennt.

Bei einem typischen *screening* von geeigneten Kristallisationsbedingungen werden in etwa 3 mg Komplex benötigt (Prof. Christine Ziegler, persönliche Mitteilung). Ausgehend von der geschätzten Verknüpfungseffizienz für YbiB H204pBPA und der Ausbeute von nur 2,6 mg/l wäre dafür die Expression des Proteins in einem Kulturvolumen von mindestens 12 Litern erforderlich. Da die Expressionsansätze aufgrund des Einsatzes der nichtnatürlichen Aminosäure relativ teuer sind, wurde versucht, die Expression zu optimieren. Eine Expression bei 25°C über Nacht statt 37°C für 6 Stunden (3.3.8) führte zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeit der Variante und somit zu einer besseren Ausbeute (**Abbildung 4.24**).

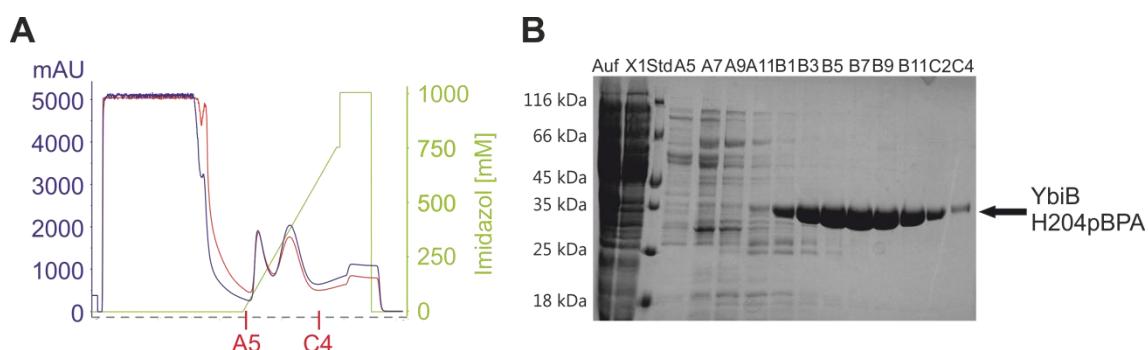


Abbildung 4.24: Optimierte Expression und Reinigung von YbiB H204pBPA über Metallchelat-Affinitätschromatographie. (A) Elutionsprofil der Reinigung von YbiB H204pBPA durch Metallchelataffinitätschromatographie. Der Lauf wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot) verfolgt. Die Elution erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten von 0 - 750 mM (grün). (B) SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) des Auftrags auf die Säule (Auf), der Durchlaufraktion X1, dem *low molecular weight marker* (Std) sowie der Elutionsfraktionen A5 bis C4. Die Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa wurde als YbiB H204pBPA identifiziert und ist markiert. Die Elutionsfraktionen B3 bis C4 zeigten eine gute Reinheit des Proteins und wurden vereinigt.

Die Fraktionen B3 bis C4 wurden vereinigt, dialysiert und anschließend die Konzentration des Proteins ermittelt. Dabei ergab sich eine Ausbeute von ca. 10 mg/l für die Reinigung von YbiB H204pBPA unter den modifizierten Bedingungen. Auf diese Weise wurde die Herstellung ausreichender Mengen des YbiB-Oligonukleotid-Komplexes mit deutlich geringerem Aufwand und Kosten für die Proteinexpression möglich.

Um eine möglichst homogene Präparation des Komplexes für Kristallisationsversuche herzustellen, muss von diesem freies Protein und freies Oligonukleotid effizient abgetrennt werden. Dafür wurde ein Anionenaustauscher verwendet, der die Separation dieser drei Spezies anhand ihrer jeweils unterschiedlichen Nettoladung ermöglichte (3.3.6). Es musste allerdings vor der Reinigung sicher gestellt werden, dass nicht kovalent fixierte Komplexe aus YbiB und Oligonukleotid dissoziert vorliegen, da nur so eine selektive Reinigung des quervernetzten Komplexes möglich war. Um die Interaktion zwischen YbiB und den Nukleinsäuren durch kompetitive Inhibition zu unterbinden, wurde den Reaktionsansätzen nach dem lichtinduzierten *crosslink* 100 mM Kaliumphosphat zugegeben (vgl. 4.2.1). Das gesamte Vorgehen bei der Herstellung und

Reinigung des kovalenten YbiB-Oligonukleotid-Komplexes ist schematisch **Abbildung 4.25** zu entnehmen.

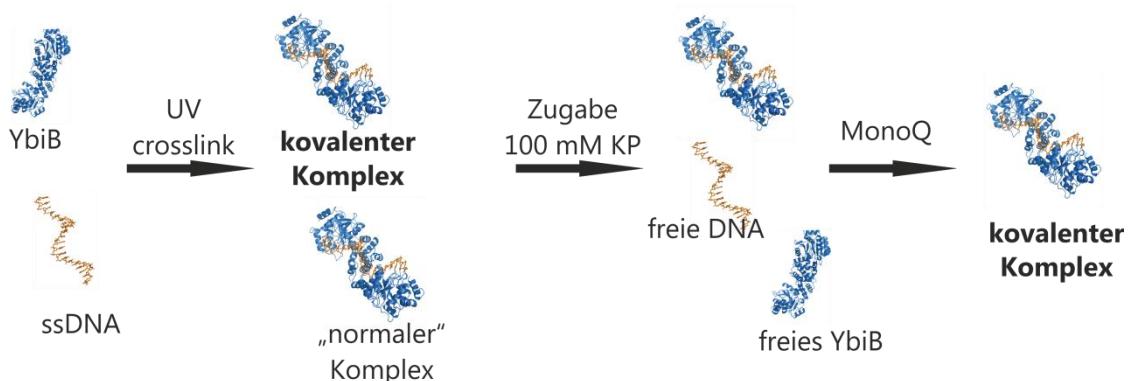


Abbildung 4.25: Ablauf der Reinigung des quervernetzten YbiB-DNA-Komplexes. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird zunächst bei einem Teil der Proteine das gebundene Oligonukleotid kovalent fixiert. Anschließend werden durch Zugabe von großen Mengen Phosphat die nicht verknüpften Komplexe in ihre Bestandteile dissoziert. Auf einem Anionenaustauscher (MonoQ) können die drei in den Ansätzen enthaltenen Komponenten voneinander getrennt werden.

Für die Kristallisationstests wurde YbiB mit einem 12 b langen dT-Oligonukleotid quervernetzt (3.3.9), der Komplex nach diesem Schema gereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert (**Abbildung 4.26**).

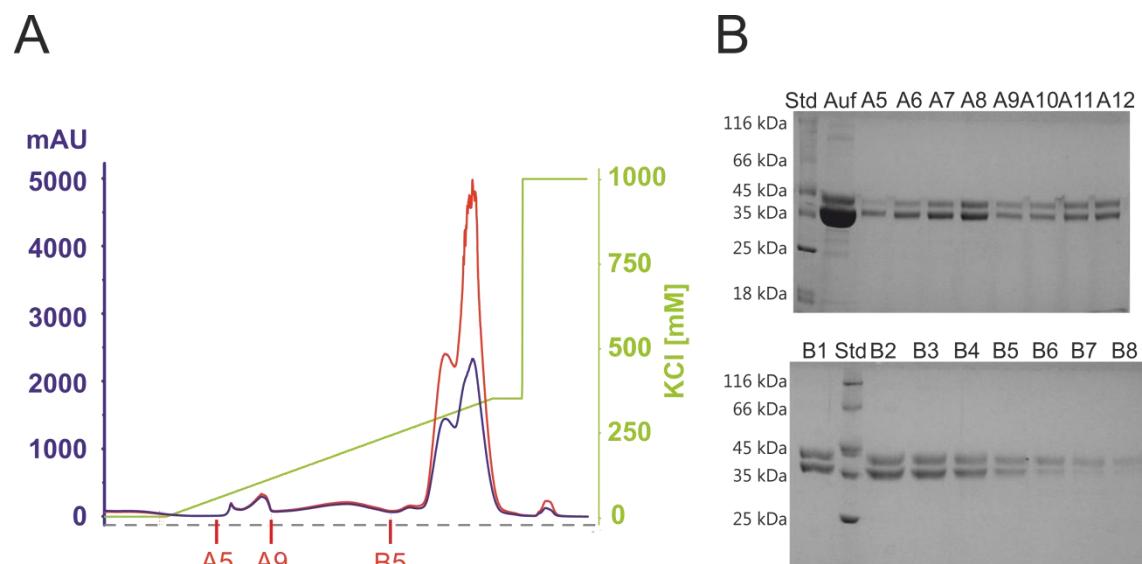


Abbildung 4.26: Reinigung des Komplexes aus YbiB-H204pBPA mit quervernetztem 12 b dT-Oligonukleotid. (A) Elutionsprofil des lichtinduziert-quervernetzten Komplexes von YbiB-H204pBPA mit einem 12 b dT-Oligonukleotid (Anionenaustauschchromatographie (MonoQ)). Der Lauf wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot) verfolgt. Die Elution erfolgte über einen linearen KCl-Gradienten von 0 – 300 mM (grün). (B) SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) des Auftrags auf die Säule (Auf), des *low molecular weight markers* (Std) und der Elutionsfraktionen A5 bis B8. Die Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa entsprach dem freien YbiB Monomer, die darüber liegende dem kovalenten Komplex von YbiB mit dem Oligonukleotid. Die Fraktionen A9 bis B5 wurden vereinigt und für die Kristallisation verwendet.

Im Elutionsprofil zeigte sich ein *Doppelpeak*, bei dem es sich, wie aus der höheren Absorption bei 260 nm im Vergleich zu 280 nm hervorgeht, um die freien Oligonukleotide handelte. Nachdem der kovalent verknüpfte Komplex aus YbiB und der DNA wegen der geringeren Nettoladung vor dem freien Oligonukleotid von der Säule eluieren muss, wurden nur vor diesem *Doppelpeak* eluierende Fraktionen durch SDS-PAGE analysiert. Alle Fraktionen lieferten dabei sowohl eine Bande für mit Oligonukleotid quervernetztes, als auch eine Bande für freies YbiB-Monomer. Die Fraktionen A9 bis B5 wurden vereinigt, da hier die Intensitäten beider Banden annähernd gleich waren. Diese Fraktionen enthielten somit zu nahezu 100% einfach-quervernetzte YbiB-Dimere, denn bei diesen ist jeweils nur eine Untereinheit mit einem Oligonukleotid kovalent verknüpft, das zweite Protomer läuft auf dem denaturierenden Gel separat. Der kovalente Komplex zwischen YbiB H204pBPA und einem 12 b dT-Oligonukleotid konnte also in ausreichender Menge hergestellt und selektiv gereinigt werden. Kristallisationsversuche mit diesem Konstrukt werden in Kürze in Kooperation mit Arbeitsgruppe von Prof. Christine Ziegler (Universität Regensburg) durchgeführt.

Um noch homogenere Kristalle zu züchten, wurde zusätzlich versucht, eine Variante von YbiB, die aufgrund des Austausches L40E als Monomer vorliegt, (A. Holinski, pers. Mitteilung) kovalent mit Oligonukleotiden zu verknüpfen. Wie beim dimeren Protein wurde in dieses Konstrukt an der Position 204 das *amber*-Stoppcodon eingeführt und das Protein unter Einbau von pBPA hergestellt. Dabei zeigte sich, dass das Protein bei einer Expressionstemperatur von 25°C fast vollständig unlöslich war. Weitere Tests bei 20°C ergaben zwar eine Verbesserung, allerdings war die Ausbeute mit ca. 2 mg/l noch deutlich zu gering, um genügend Komplex für die Kristallisationsversuche herzustellen. Diese *ybiB*-Variante soll nun in einen pET-Vektor umkloniert werden, um seine Expression in *E. coli* ArcticExpress Zellen zu testen. Dieser Stamm zeigt Wachstum bis zu einer Temperatur von 12°C. Außerdem werden Chaperone überexprimiert, was zusätzlich die Löslichkeit und somit die Ausbeute von YbiB L40E H204pBPA erhöhen könnte.

4.4 Funktionsanalyse von YbiB

Die Regulation von *ybiB*, sowie die vergleichenden Proteomanalyse von *E. coli* legen eine zelluläre Aufgabe des Proteins im Rahmen der Stressantwort und des Nukleinsäuremetabolismus nahe. Durch umfassende biochemische Experimente konnten einzelsträngige DNA und RNA als ein Ligand von YbiB identifiziert werden, die Bindung erfolgt dabei offensichtlich ohne Sequenzspezifität. Darüber hinaus ist die Art der von YbiB katalysierten Reaktion unklar. Da ein computergestütztes Liganden-docking gegenwärtig nicht durchführbar ist, wurde versucht, durch weitere biochemische Analysen Hinweise auf die mögliche Funktion von YbiB zu gewinnen.

4.4.1 Suche nach Interaktionspartnern

Die Identifikation von Interaktionspartnern bekannter Funktion kann wertvolle Hinweise auf die Funktion des zu untersuchenden Proteins liefern. Deshalb wurde im Zuge seiner funktionellen Charakterisierung auch für YbiB versucht, mit verschiedenen Methoden Interaktionen mit anderen Proteinen nachzuweisen.

Bei einem *high throughput screening* nach Proteinkomplexen in *E. coli* wurden für YbiB zehn mögliche Interaktionspartner gefunden (Arifuzzaman et al., 2006), unter anderem die DNA Helikase DinG, die mit *ybiB* zusammen ein Operon bildet (**Abbildung 4.3**). Nachdem solche Studien sehr fehleranfällig sind und oft eine große Anzahl an falsch positiven Resultaten liefern (Garcia-Jimenez et al., 2010), sollten die einzelnen Treffer biochemisch auf Interaktion mit YbiB getestet werden. Für vier der zehn Proteine wurde aufgrund ihrer bekannten Funktion ein Zusammenhang mit YbiB von vornherein ausgeschlossen. Sechs Proteine wurden weiter analysiert (Roderer, 2009) und ihre Komplexbildung mit YbiB zunächst mit dem *yeast two hybrid* System überprüft. Dabei zeigte keines der getesteten Proteine Interaktion mit YbiB (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der N-terminalen Fusion der zu analysierenden Proteine mit einer DNA-Bindedomäne bzw. der entsprechenden Transkriptionaktivatordomäne können jedoch *yeast two hybrid* Analysen schnell zu falsch negativen Resultaten führen. So können die Fusionsproteine unlöslich in den Zellen vorliegen oder eine Komplexbildung verhindert werden, wenn dafür bei den zu testenden Proteinen die N-terminalen Regionen wichtig sind. Dementsprechend konnte allein aufgrund der negativen *yeast two hybrid* Analysen die Komplexbildung zwischen YbiB und den möglichen Interaktionspartnern nicht ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund wurden die sechs Proteine gereinigt, um die Komplexbildung mit YbiB *in vitro* mit verschiedenen Methoden zu analysieren (Roderer, 2009). Dabei konnte nur für den Transkriptionselongationsfaktor GreA eine Interaktion mit YbiB gefunden werden. Allerdings zeigte diese Wechselwirkung eine starke Abhängigkeit von den Pufferbedingungen. So war nur bei Ionenstärken weit unterhalb der physiologischen Salzkonzentration in den *E. coli* Zellen (< 50 mM NaCl) die Interaktion zwischen YbiB und GreA detektierbar. Dementsprechend konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob dieser Komplex auch intrazellulär gebildet wird und dort eine physiologische Funktion hat. Dies wurde anschließend durch *in vivo*-Formaldehyd-*crosslinking* in *E. coli*-Zellen überprüft (Behr, 2010). Falls es zu einer Interaktion zwischen YbiB und GreA in den Zellen kommt, sollte ihr Komplex durch Formaldehyd kovalent fixiert, gereinigt und analysiert werden können. Diese Experimente lieferten keine Hinweise auf das Vorkommen des YbiB-GreA-Komplexes in *E. coli* und konnten somit die Wechselwirkung beider Proteine *in vivo* nicht bestätigen. Wahrscheinlich kann GreA *in vitro* aufgrund seiner Form und der stark negativ geladenen Oberfläche (**Abbildung 4.27**) mit der positiv geladenen Nukleinsäurebindestelle von YbiB interagieren.

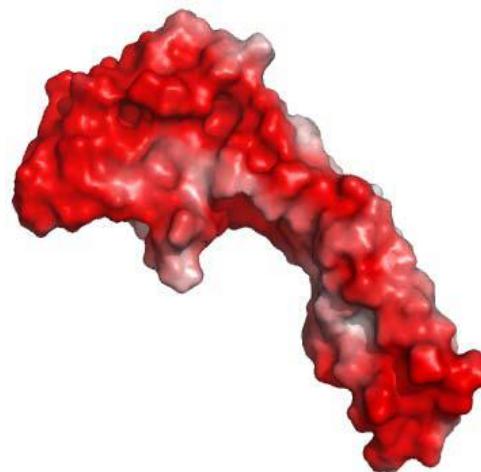


Abbildung 4.27: Oberflächenstruktur von *E. coli* GreA (pdb: 1GRJ). Die Struktur ist entsprechend seiner Ladungsverteilung eingefärbt. Rote Bereiche sind negativ geladen, während eine Blaufärbung positiv geladene Residuen kennzeichnet. Die Darstellung wurde aus Roderer (2009) übernommen.

In den Zellen wird vermutlich dagegen durch Ionen diese schwache Wechselwirkung inhibiert und es kommt zu keiner Komplexbildung mehr. Die Resultate zeigen, dass es sich bei den Treffern aus einem *high throughput screening* für YbiB ausschließlich um falsch positive Ergebnisse handelte. Unter diesen Proteinen ist also kein Interaktionspartner für YbiB zu finden.

Im Weiteren wurde versucht, mögliche Komplexpartner von YbiB durch Coimmunpräzipitation direkt aus dem *E. coli* Zelllysat zu reinigen. Dafür wurde zunächst *ybiB* 3'-terminal im Genom mit dem immunogenen *flag*-Peptid fusioniert (3.2.13). Das Protein sollte anschließend mit dem anti-*flag* Antikörper gereinigt und durch einen Vergleich mit der Proteinzusammensetzung einer analogen Reinigung aus einem Stamm ohne *ybiB::flag* mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Durch *western blot* Analysen konnte gezeigt werden, dass das *flag*-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und vom anti-*flag* Antikörper neben zwei schwachen Kreuzreaktionen relativ spezifisch erkannt wird (Abbildung 4.28).

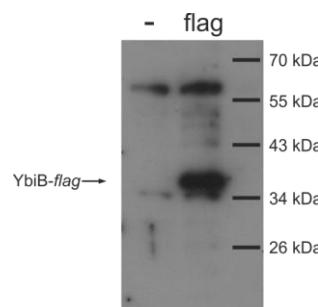


Abbildung 4.28: Expressionsanalyse von YbiB-flag durch western blot. Die erste Spur enthält eine Probe des löslichen Zellüberstands des *E. coli* MG1655 Wildtyp-Stamms (-). In der zweiten Spur wurde eine entsprechende Probe des Stammes mit *ybiB::flag* aufgetragen (flag). Die Bande in der zweiten Spur bei ca. 35 kDa entspricht *ybiB*. Die Beladung für die SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) wurde in beiden Spuren auf gleiche Zellzahl normiert. Die Detektion erfolgte über einen Antikörper gegen den C-terminalen *flag*-tag.

Darauf aufbauend wurde eine Coimmunpräzipitation von YbiB und seinen möglichen Interaktionspartnern durchgeführt (3.3.14). Hier ergab sich eine unzureichende Spezifität des verwendeten Antikörpers. Auf einem SDS-Gel wurden sowohl bei der Negativkontrolle, als auch im Reaktionsansatz sehr viele Proteinbanden gefunden (Daten nicht gezeigt), so dass zwischen den beiden Ansätzen keine Unterschiede detektiert werden konnten. Durch Vorreinigung der Zelllysate mit unspezifischen Antikörpern (3.3.14) sollte dieser Hintergrund reduziert werden. So konnte zwar ein wesentlicher Anteil der Proteine abgetrennt werden, allerdings waren immer noch zu viele Banden in den jeweiligen Spuren zu finden, um verlässlich Unterschiede zwischen Reaktionsansatz und Kontrolle detektieren zu können. Die Coimmunpräzipitationen lieferten so keinerlei Anzeichen für eine Interaktion von YbiB mit anderen Proteinen in *E. coli*.

Zusätzlich wurden bioinformatische Analysen durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion von YbiB mit einem anderen Protein abschätzen zu können. Dazu wurde das Programm PresCont (Zellner, 2011) zum Auffinden von möglichen Kontaktflächen verwendet. Dabei wurde lediglich die Oberflächenregion, die für die Homodimerisierung von YbiB wichtig ist, identifiziert (Zellner, 2011). Weitere mögliche Interaktionsstellen konnten nicht gefunden werden. Somit ergab auch die bioinformatische Überprüfung keinerlei Hinweise darauf, dass YbiB als Teil eines heterooligomeren Komplexes in *E. coli* vorliegt.

Aufgrund dieser Resultate ist im Moment davon auszugehen, dass YbiB in den Zellen als Homodimer vorliegt und so seine Funktion ausführt, ohne einen permanenten Komplex mit anderen Proteinen einzugehen. Mögliche Hinweise auf die Rolle des Proteins lassen sich somit nicht aus seinen Interaktionspartnern ableiten. Andererseits zeigen diese Ergebnisse auch, dass YbiB vermutlich ohne die direkte Beteiligung eines anderen Proteins in der Lage ist, seine Aufgabe in der Zelle zu erfüllen. Dementsprechend sollten *in vitro* Analysen mit YbiB alleine zur Identifikation seiner Funktion geeignet sein.

4.4.2 Ansätze zur Funktionsaufklärung *in vitro*

Zunächst wurde untersucht, ob YbiB in der Lage ist, die Reaktionen der nahe verwandten TrpD- oder NP-II-Proteinfamilien zu katalysieren. Die Kondensation von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) mit Anthranilat wurde dabei fluorometrisch gemessen (durchgeführt von Dr. Patrick Babinger). Die phosphorolytische Abspaltung der Base von Thymidin wurde mit einem diskontinuierlichen *assay* an der HPLC detektiert. Dabei erfolgte die Trennung des Nukleosids und der freien Base gemäß 3.4.11. YbiB zeigte bei keiner der beiden getesteten Reaktionen einen katalytischen Umsatz der Substrate. Auch bei anderen getesteten Nukleosiden war YbiB nicht in der Lage, die Base phosphorolytisch von der Ribose abzuspalten. Bioinformatische Analysen hatte dies bereits zuvor nahe gelegt, da den TrpD2-Proteinen praktisch alle

katalytisch wichtigen Aminosäuren der TrpD und NP-II-Enzyme fehlen (**Abbildung 4.2**).

Mit einzelsträngigen Oligonukleotiden konnte bereits ein wahrscheinliches Substrat für YbiB identifiziert werden. Nahe der Nukleinsäurebindestelle besitzt das Protein eine weitere Vertiefung auf der Oberfläche, die zahlreiche konservierte Aminosäuren enthält und somit das putative aktive Zentrum bildet (**Abbildung 4.8 B**). Es handelt sich bei YbiB also sehr wahrscheinlich um ein Protein, dessen Funktion über die reine Bindung von Oligonukleotiden hinausgeht. Aufgrund seiner vermuteten Beteiligung in der SOS-Antwort von *E. coli* erscheint es als durchaus möglich, dass YbiB beschädigte DNA-Basen in einzelsträngigen Oligonukleotiden erkennt und diese anschließend phosphorolytisch, analog zur Reaktion der NP-II-Enzyme, aus dem Genom entfernt (**Abbildung 4.29**).

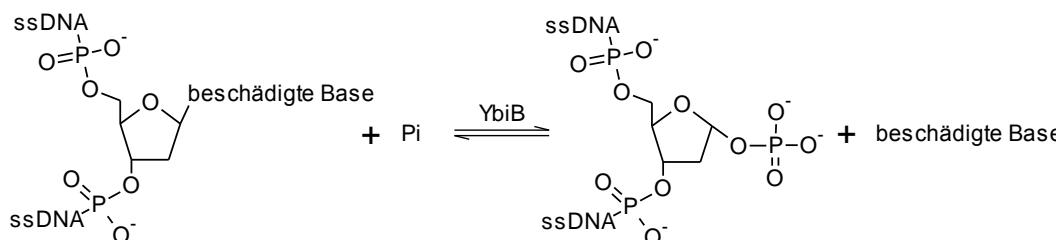


Abbildung 4.29: Möglicher Ablauf der Reparatur von DNA-Schädigungen durch YbiB.

Zunächst wurde untersucht, ob einzelne Basen phosphorolytisch aus einem Oligonukleotid entfernt werden können. Für intakte, synthetische ssDNA-Fragmente konnte mittels HPLC-Analyse keine Freisetzung von Basen durch YbiB gefunden werden. Da eine große Zahl möglicher DNA-Schädigungen bekannt ist, war ein umfassender Test mit synthetischen Oligonukleotiden, die modifizierte Basen enthalten, zu kosten- wie auch zeitintensiv. Weitere experimentelle Hinweise auf die Art des erkannten Schadens wären notwendig, um *in vitro* Tests auf Bindung an YbiB und Umsatz durchführen zu können.

Der angenommene, phosphorolytische Mechanismus der Reaktion von YbiB wurde dagegen durch Inkubation des Proteins mit ^{32}P -Phosphat überprüft, wobei hier als zweites Substrat nicht einzelne Nukleoside, sondern einzelsträngige, genomicsche Nukleinsäuren verwendet wurden. Dabei sollte durch YbiB radioaktives Phosphat in die DNA eingebaut werden, welches detektiert werden kann. Die Analyse der Ansätze durch Größenausschlusschromatographie und Szintillationsmessung ergaben gute Hinweise auf den Einbau von radioaktivem Phosphat in die DNA. Weitere Tests mit *dot blot* lieferten dagegen aufgrund von technischen Problemen keine auswertbaren Ergebnisse. Die phosphorolytische Entfernung von Basen aus Nukleinsäuren durch YbiB konnte somit noch nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Neben dem Herausschneiden einer Base könnte YbiB auch in einem zweiten Schritt den Einbau einer neuen, intakten Base an der entsprechenden Stelle katalysieren. Dabei würde die

phosphorolytische Entfernung des Schadens aufgrund der Reversibilität der Reaktion die Reparatur der DNA durch Einbau einer freien Base ermöglichen (**Abbildung 4.29**). In diesem Fall müssten freie DNA- oder RNA-Basen von YbiB gebunden werden können, was durch Gleichgewichtsdialyse überprüft wurde. Dabei zeigte keine der getesteten Basen Bindung an YbiB (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate unterstützen somit nicht die Hypothese von der Reparatur eines DNA-Schadens durch YbiB alleine. Gleichzeitig ist allerdings vorstellbar, dass erst die Bindung eines beschädigten einzelsträngigen Oligonukleotids die Bindung der freien Base zur Reparatur des Schadens ermöglicht.

Rationelle Ansätze führten also zu keinen weiteren Erkenntnissen über die Funktion von YbiB. Es konnte zwar eine Hypothese über die wahrscheinlichste Funktion des Proteins aufgestellt werden, ihre experimentelle Bestätigung steht allerdings noch aus.

4.4.3 *In vivo* Formaldehyd *crosslinking* von Nukleinsäuren an YbiB und deren Analyse

Die *in vitro*-Analysen zeigten, dass die Identifikation einzelsträngiger Nukleinsäuren als Substrat alleine nicht ausreichend ist, um daraus die Funktion von YbiB abzuleiten. Zusätzliche Informationen, z.B. ob YbiB innerhalb der *E. coli* Zellen bevorzugt RNA, DNA oder modifizierte Nukleinsäuren bindet, könnten die funktionelle Zuweisung des Proteins erleichtern. Zu diesem Zweck wurde versucht, *in vivo* die natürlichen Substrate von YbiB kovalent durch Formaldehyd am Protein zu fixieren und so für weitere Analysen selektiv aus den Zellen zu isolieren. Ein solches Vorgehen wurde bereits häufig verwendet, um Protein-Nukleinsäure-Komplexe zu fixieren, zu reinigen und durch weitere Analysen spezifische Bindungsregionen zu identifizieren (Wade et al., 2004). Der Ablauf eines solchen *in vivo* Formaldehyd-*crosslinks* ist schematisch in **Abbildung 4.30** gezeigt.

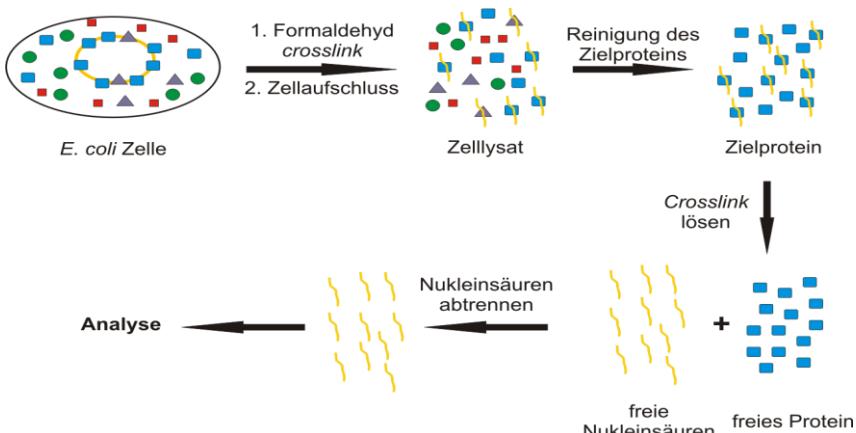


Abbildung 4.30: Ablauf des *in vivo* Formaldehyd *crosslinks* mit anschließender Analytik. Lebende *E. coli* Zellen werden mit Formaldehyd fixiert und anschließend aufgeschlossen. Aus dem Zelllysat wird das Zielprotein selektiv gereinigt und die Oligonukleotide wieder vom Protein getrennt. Die Nukleinsäuren werden dann analysiert.

Die isolierten Nukleinsäuren wurden zur Analyse in Nukleoside zerlegt (3.4.10) und diese mittels HPLC getrennt (3.4.11). Die Menge an isolierten Desoxyribonukleosiden und Ribonukleosiden sollte dabei zeigen, ob YbiB innerhalb der Zelle bevorzugt eine der beiden Nukleinsäurespezies bindet. Sind modifizierte Nukleobasen Substrate von YbiB, würden bei der HPLC-Analyse neben den normalen Nukleosiden weitere Substanzen auftauchen, die anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden können.

Zunächst wurde untersucht, ob mit dem *in vivo crosslink* Nukleinsäuren gemeinsam mit YbiB aus den Zellen isoliert werden können. Dafür wurden *E. coli* M15 Zellen, die YbiB vom Plasmid pQE60_ybiB, exprimierten, mit 1 % Formaldehyd für 20 min bei 37°C fixiert (3.4.9). Auf Induktion der Genexpression mit IPTG wurde in diesem Experiment verzichtet. Nach dem Zellaufschluss wurde das Protein mittels Metallchelataffinitätschromatographie (3.3.3) gereinigt und die Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE (3.4.3) weiter analysiert (Abbildung 4.31).

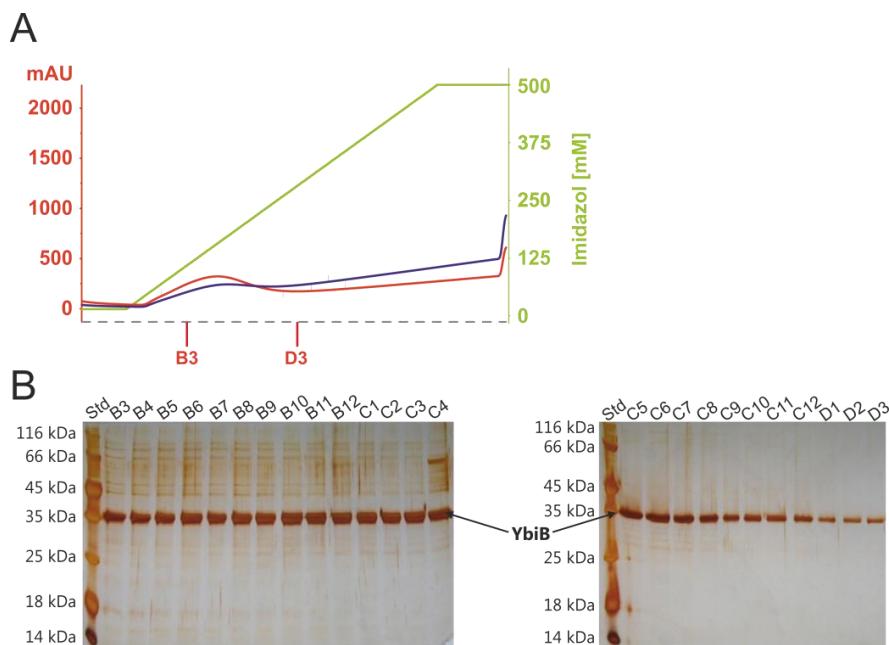


Abbildung 4.31: Reinigung von YbiB nach *in vivo* Quervernetzung mit Formaldehyd. (A) Elutionsprofil der Metallchelataffinitätschromatographie aus zuvor mit Formaldehyd fixierten *E. coli* Zellen. Der Lauf wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot) verfolgt. Die Elution erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten von 0 - 500 mM (grün). (B) SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) des *low molecular weight marker* (Std) und der Elutionsfraktionen B3 bis D5. Die Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa entspricht YbiB und ist markiert.

Es ergab sich ein relativ breiter Elutionspeak, der eine stärkere Absorption bei 260 nm als bei 280 nm zeigte und deshalb sehr wahrscheinlich Nukleinsäuren enthielt. Die betreffenden Fraktionen zeigten allerdings neben YbiB noch Verunreinigungen durch weitere Proteine. Dementsprechend ist unklar, ob die Nukleinsäuren an YbiB oder eines der anderen Proteine fixiert wurden. Um dies zu überprüfen, wurden die

Elutionsfraktionen B3 bis C7 vereinigt und durch Chromatographie mit einer Heparinsäule (3.3.7) getrennt (**Abbildung 4.32**).

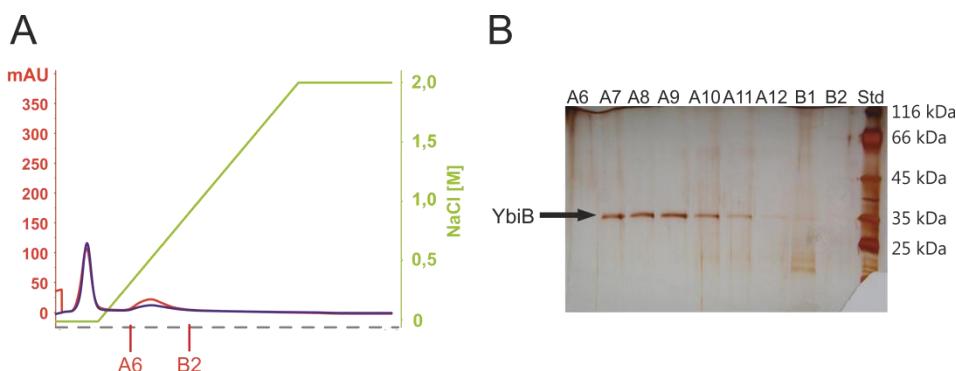


Abbildung 4.32: Analyse des *in vivo* crosslinks durch Affinätschromatographie mit einer Heparinsäule. (A) Elutionsprofil der vereinigten Fraktionen aus der Metallchelataffinätschromatographie auf einer Heparinsäule. Der Lauf wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot) verfolgt. Die Elution erfolgte über einen linearen NaCl-Gradienten von 0 – 2 M (grün). (B) SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) des low molecular weight markers (Std) und der Elutionsfraktionen A6 bis B2. Die markierte Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa entspricht YbiB.

Hier zeigte sich zunächst ein *peak* während des Waschens der Säule, vor Beginn der Gradientenelution (**Abbildung 4.32 A**). Ein Teil der aufgetragenen Proteine bindet somit nicht an die Heparinsäule. Während der eigentlichen Elution ergab sich nur noch ein weiterer *peak*, der wiederum neben Proteinen noch Nukleinsäuren enthielt, wie Absorptionsspektren der entsprechenden Fraktionen bestätigten. Das Silbergel zeigte, dass YbiB als einziges Protein enthalten war (**Abbildung 4.32 B**). Nukleinsäuren können also durch den *in vivo* Formaldehyd *crosslink* an YbiB fixiert werden.

Diese wurden nun nach Zerlegung in Nukleoside (3.4.10) mittels *reversed phase* HPLC genauer analysiert (3.4.11). Als Negativkontrolle wurden *E. coli* M15 Zellen verwendet, die die *E. coli* TNP vom Plasmid pQE70_deoA exprimieren, welche in *in vitro* Experimenten keine Nukleinsäure-Bindung zeigte (vgl. **Abbildung 4.17** und **Abbildung 4.18**). Beide *E. coli*-Stämme wurden auf gleiche Weise fixiert, die Proteine gereinigt (3.4.9), die Quervernetzung zwischen den Proteinen und den Nukleinsäuren gelöst (3.4.10), und die isolierten Nukleinsäuren analysiert (**Abbildung 4.33**). Auf den Reinigungsschritt mit der Heparinsäule wurde nun verzichtet, da YbiB bereits nach der Metallchelataffinätschromatographie stark angereichert war. Der Hintergrund bei der HPLC-Analyse, verursacht durch Nukleinsäuren, die an andere Proteine fixiert worden waren sollte folglich nur einen geringen Anteil der Gesamt nukleosidpräparation darstellen. Zusätzlich wurden die Reinigungen mit einem Stufengradienten wie unter 3.4.9 beschrieben durchgeführt. Daraus resultierten schärfere Elutionspeaks und somit höher konzentrierte Nukleinsäurepräparationen, was die weitere Analyse erheblich vereinfachte.

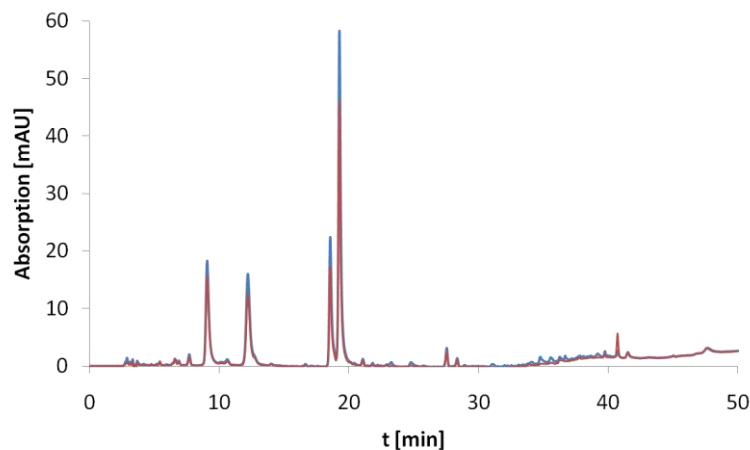


Abbildung 4.33: HPLC-Analyse der mit YbiB und DeoA in *E. coli* quervernetzten Nukleinsäuren. Die Quervernetzungsreaktion wurde in beiden Fällen jeweils mit 1 % Formaldehyd, für 10 min bei 37°C durchgeführt. Die isolierten Nukleinsäuren wurden in Nukleoside verdaut (3.4.10) und auf einer BISCHOFF Kromasil100 C18 5 µm, 250 x 4 mm Säule getrennt. Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm verfolgt. Sowohl bei DeoA (blaues Elutionsprofil), wie auch bei YbiB (rotes Elutionsprofil) werden die Hauptpeaks von den vier natürlich vorkommenden Ribonukleosiden gebildet.

Dabei zeigten sich für beide Nukleinsäurenpräparationen vier Hauptpeaks mit identischen Retentionszeiten und jeweils vergleichbaren Intensitäten, die anhand von Standardnukleosiden (**Abbildung 7.2**) als Ribonukleoside identifiziert wurden. Desoxyribonukleoside wurden dagegen kaum gefunden. Nachdem sich für YbiB und die Negativkontrolle identische Elutionsprofile ergaben, sind keine Aussagen über die Bindungseigenschaften von YbiB innerhalb der Zellen möglich. Deshalb wurde versucht, durch Veränderung der experimentellen Parameter die unspezifische Quervernetzung von Nukleinsäuren mit DeoA zu unterdrücken. Allerdings führte weder die Variation der Formaldehydkonzentration von 0,2 % bis 1 %, noch unterschiedliche Reaktionszeiten zwischen 2 min und 20 min zu einer wesentlichen Veränderung der HPLC-Laufprofile. Weitere Experimente, bei denen den Kulturen Mitomycin C zugegeben wurde, lieferten ebenfalls keinen Unterschied zwischen isolierten Nukleosiden mit DeoA und YbiB (Daten nicht gezeigt).

Wahrscheinlich kann aufgrund der Überexpression beider Proteine kein Unterschied zwischen YbiB und der Kontrolle beobachtet werden. Nachdem vermutlich nur geringe Mengen des Substrats von YbiB in den Zellen vorliegen, werden hauptsächlich unspezifisch bindende Nukleinsäuren an den Proteinen fixiert. Die geringe Menge an spezifischem Substrat wird dann wegen des starken Hintergrundsignals nicht mehr detektiert. Die Verringerung der intrazellulären Konzentration von YbiB sollte also eine Unterscheidung zwischen den spezifisch bindenden Nukleinsäuren und dem Hintergrundsignal erlauben.

Deshalb wurden die weiteren *in vivo crosslink* Experimente mit genomisch codiertem *ybiB* unter Kontrolle seines natürlichen Promotors durchgeführt. Zur Reinigung des Proteins wurde das Gen 3'-terminal mit einem *strep-II®-tag* fusioniert (3.2.13 &

3.2.14). Als Negativkontrolle wurde *sstrpD* ebenfalls mit 3'-terminalem *strep-II[®]-tag* anstelle von *ybiB* im Genom platziert. Die Induktion erfolgte in beiden Fällen durch Zugabe von 0,2 µg/ml Mitomycin C, zwei Stunden vor der Fixierung der Zellen mit Formaldehyd. Mittels *western blot* wurde überprüft, ob beide Proteine korrekt als Fusion mit dem Affinitätstag hergestellt werden (**Abbildung 4.34**).

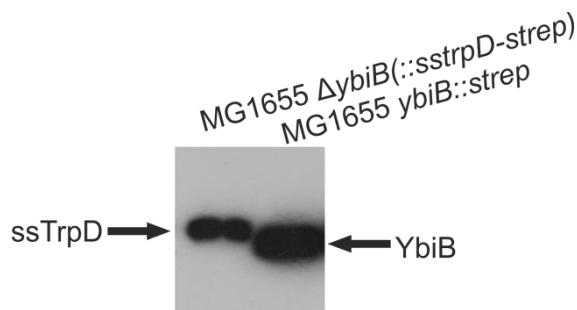


Abbildung 4.34: Expressionsanalyse von genomisch codiertem YbiB und ssTrpD in *E. coli* MG1655 Zellen. Die Bande in der ersten Spur zeigt die Expression von genomisch codiertem *sstrpD_strep* unter Zugabe von 0,2 µg/ml MMC. Für *ybiB_strep* ist unter den gleichen Expressionbedingungen eine höhere Proteinmenge in den *E. coli* Zellen zu finden (Spur 2). Die Beladung für die SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) wurde in beiden Spuren auf gleiche Gesamtproteinmenge normiert. Die Detektion erfolgte über einen Antikörper gegen den C-terminalen *strep-II[®]-tag*.

Dabei zeigte sich für ssTrpD, dass vermutlich aufgrund der nicht für *E. coli* optimierten *codon usage* etwas weniger Protein hergestellt wurde. Mit beiden Stämmen wurden gemäß 3.4.9 die *in vivo* Formaldehyd *crosslinks* durchgeführt und anschließend die Proteine mit Streptactin *beads* im *batch*-Verfahren gereinigt (3.4.9). Die folgenden HPLC-Analysen der isolierten Nukleinsäuren zeigte erneut nahezu identische Elutionsprofile für YbiB und die Negativkontrolle (**Abbildung 4.35**).

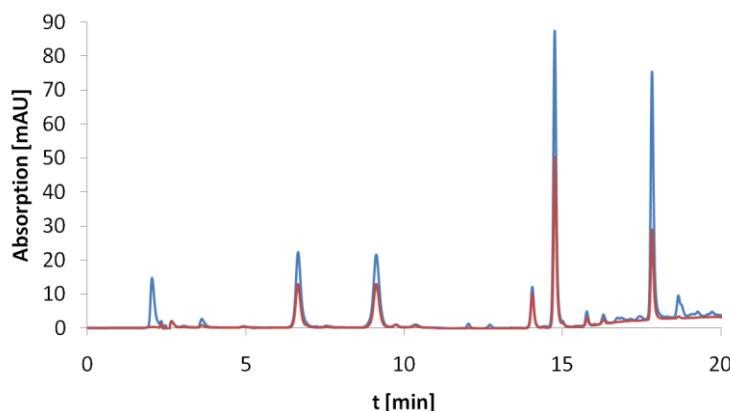


Abbildung 4.35: HPLC-Analyse der mit genomisch codiertem YbiB und ssTrpD in *E. coli* quervernetzten Nukleinsäuren. Die Quervernetzungsreaktion wurde jeweils mit 0,1 % Formaldehyd, für 3 min bei 37°C durchgeführt. Beide Nukleinsäurepräparationen wurden in Nukleoside verdaut (3.4.10) und auf einer PHENOMENEX LunaPFP 3 µm, 150 x 3 mm Säule getrennt. Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm verfolgt. Sowohl bei ssTrpD (blaues Elutionsprofil), wie auch bei YbiB (rotes Elutionsprofil) werden die Hauptpeaks von den vier natürlich vorkommenden Ribonukleosiden gebildet.

In beiden Fällen wurden, wie auch bei den plasmidcodierten Proteinen, vergleichbare Mengen Ribonukleinsäuren isoliert (Abbildung 7.3). Aufgrund der geringen Spezifität der Quervernetzung wurde versucht, die *crosslink*-Bedingungen so zu verändern, dass mit ssTrpD keine Nukleinsäuren aus den Zellen isoliert werden. Trotzt vieler Ansätze (0,005 % bis 1 % Formaldehyd bei 1 min bis 20 min Inkubationszeit) konnte die Quervernetzung zwischen TrpD und Nukleinsäuren nie vollständig unterdrückt werden (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnten Probleme beim Abstoppen der Quervernetzungsreaktion mit Glycin sein. Auch die große Menge an freier RNA in den Zellen könnte erklären, warum bei allen Experimenten stets Ribonukleinsäuren mit den Proteinen isoliert wurden.

Nachdem durch Variation der *crosslink*-Bedingungen keine ausreichende Spezifität der Quervernetzungsreaktion erreicht werden konnte, sollte diese durch Behandlung der Ansätze mit Mikrokokken-Nuklease (MNase) verbessert werden. In der Oberflächenfalte von YbiB spezifisch gebundene Nukleinsäuren sollten dabei der MNase nicht mehr zugänglich sein und somit im Gegensatz zu unspezifisch an der Oberfläche eines Proteins fixierten Nukleinsäuren vor Abbau geschützt werden. Der MNase-Verdau wurde zunächst mit einem *in vitro* durch Quervernetzung mit pBPA erzeugten YbiB–Oligonukleotid-Komplex (3.3.9) getestet. Die Analyse durch SDS-PAGE ergab, dass einige Nukleotide vom Protein vor Abbau geschützt wurden, wie die Bande oberhalb des freien YbiB Monomers zeigt (Abbildung 4.36). Die überstehenden Nukleotidenden sind dagegen zugänglich und können verdaut werden.

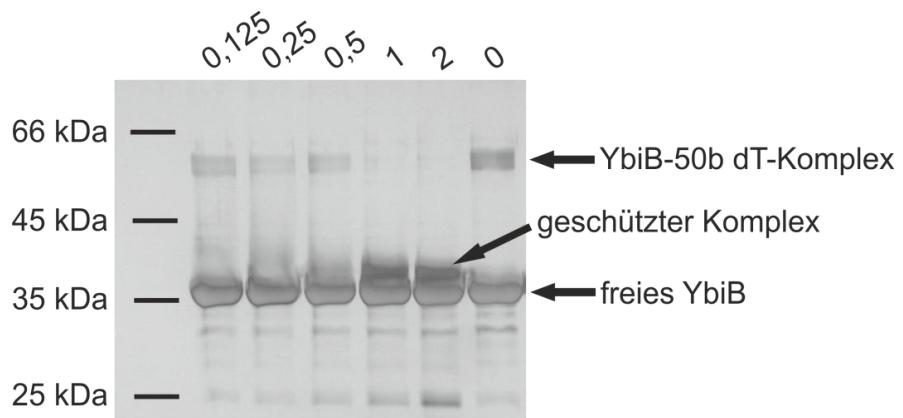


Abbildung 4.36: Analyse der MNase-Behandlung von YbiB H204pBPA mit kovalent verknüpftem 50 b dT-Oligonukleotid. Die Abbaureaktion der Oligonukleotide wurde für 3 min in 50 mM TrisHCl, 2 mM KP pH 7,5, 2,5 mM CaCl₂ durchgeführt. Über den einzelnen Spuren der SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) ist jeweils die Menge an eingesetzter MNase in *units* angegeben. Mit 0 U MNase ist neben dem freien YbiB Monomer eine Bande mit hohem Molekulargewicht zu sehen, die dem quervernetzten Komplex zwischen YbiB und dem Oligonukleotid entspricht. Durch Behandlung mit MNase wird diese zunehmend abgebaut. Nur wenige Nukleotide werden vor dem Verdau geschützt und verbleiben an YbiB.

Beim *in vivo* *crosslinking* lieferte dagegen die MNase-Behandlung der isolierten Protein-Nukleinsäure-Komplexe nicht das erhoffte Ergebnis. Hier konnte keine MNase

Konzentration gefunden werden, bei der selektiv mehr Nukleinsäuren bei ssTrpD als bei YbiB entfernt wurden (Daten nicht gezeigt).

Da alle Optimierungsversuche keine positiven Auswirkungen auf die Spezifität der Quervernetzungsreaktion gebracht haben, wurden die Untersuchungen der *in vivo* Substratspezifität von YbiB durch Formaldehyd *crosslinking* beendet. Nachdem das vermutete Substrat von YbiB, eine beschädigte DNA-Base, vermutlich nur in äußerst geringen Mengen innerhalb der *E. coli* Zellen vorliegt, ist seine Anreicherung durch die Quervernetzung wahrscheinlich nicht ausreichend, um es detektieren zu können.

4.4.4 Wachstumsverhalten verschiedener *E. coli*-Stämme unter mutagenen Bedingungen

Jedes Protein erfüllt in der Zelle spezifische Aufgaben, die unter bestimmten Bedingungen für das Überleben des Organismus von Vorteil sind. Dabei können die jeweiligen Funktionen entweder ständig benötigt werden oder nur zu bestimmten Zeitpunkten, wie beispielsweise bei der Reaktion auf Umwelteinflüsse, wichtig sein. Die Auswirkungen eines *knockouts* führen häufig zu Veränderungen innerhalb der Zelle, die mit einem geeigneten Testsystem als Phänotyp beobachtet werden können. Dabei sind Abweichungen im Wachstumsverhalten der Zellen, ihrer Morphologie, sowie ihrer Metabolitenzusammensetzung mögliche Signale, die detektiert werden. Sind Bedingungen identifiziert, bei denen die An- oder Abwesenheit eines bestimmten Proteins einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen hat, können daraus oft sehr wertvolle Informationen über die Funktion des jeweiligen Proteins abgeleitet werden. Bisherige Resultate hatten bereits eine Beteiligung von YbiB an der SOS-Antwort in *E. coli* gezeigt (vgl. 4.1.2 und 4.1.3) und zur Hypothese geführt, dass es sich bei YbiB um ein neuartiges DNA-Reparaturenzym handelt. Deshalb sollte das Wachstumsverhalten eines *E. coli* *ybiB* *knockout*-Stamms und des Wildtyps unter DNA schädigenden Bedingungen verglichen werden.

Zunächst wurde der Einfluss von Wasserstoffperoxid und Mitomycin C auf den *E. coli* MG1655 *ΔybiB*-Stamm und den entsprechenden Wildtyp durch Absterbekurven (3.1.4) analysiert. Durch Wasserstoffperoxid werden, über die metallabhängige Fenton-Reaktion, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies in den Zellen gebildet, die sowohl zu DNA-Doppelstrangbrüchen, wie auch zu zahlreichen oxidativen Modifikationen einzelner DNA-Basen führen können (Imlay et al., 1988; Jaruga and Dizdaroglu, 1996). Bei Mitomycin C dagegen handelt es sich um ein alkylierendes Agens, welches nach seiner reduktiven Aktivierung bevorzugt Guanine und Adenine modifiziert und, aufgrund seiner Bifunktionalität, zusätzlich die kovalente Quervernetzung beider DNA-Stränge durchführen kann (Hashimoto and Shudo, 1985). Zur Auswertung wurde für beide Stämme jeweils der Logarithmus der Zellzahl gegen die entsprechende Mutagenkonzentration aufgetragen und verglichen (**Abbildung 4.37**).

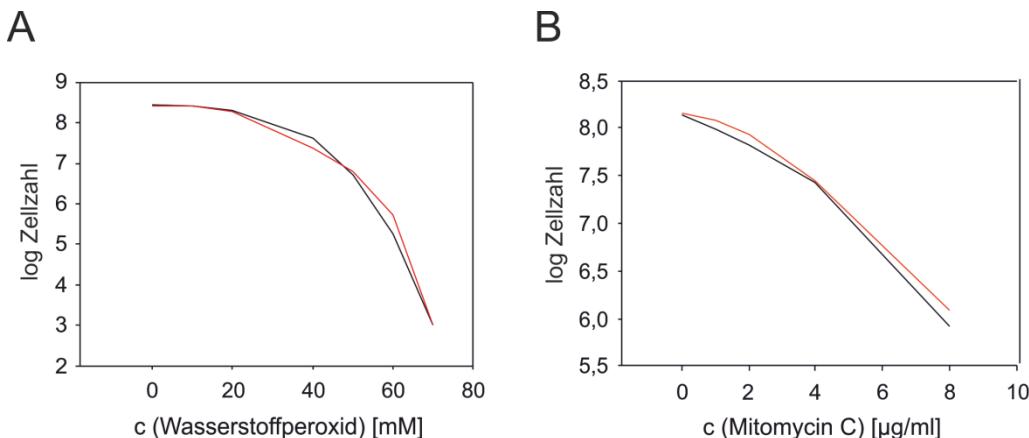


Abbildung 4.37: Überlebensrate von *E. coli* MG1665 *ybiB* (schwarz) und *E. coli* MG1655 (rot) unter dem Einfluss verschiedener Mutagene. Die beiden Stämme wurden mit verschiedenen Mengen Wasserstoffperoxid (A) und Mitomycin C (B) inkubiert. Die Zahl überlebender Zellen wurde bei jeder verwendeten Konzentration bestimmt und deren Logarithmus gegen die Konzentration der mutagenen Substanz aufgetragen.

Dabei ergab sich für die beiden getesteten Substanzen kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen dem MG1655 Wildtyp und dem *ybiB* knockout-Stamm. Die Abwesenheit des Proteins führt also zu keiner verminderten Resistenz der *E. coli* Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid und Mitomycin C. Mit Absterbekurven konnte somit für keine der beiden getesteten Substanzen ein Phänotyp durch das Fehlen von *ybiB* beobachtet werden. Um möglicherweise kleinere Unterschiede in der relativen Fitness beider Stämme detektieren zu können, wurde nun ihr Wachstum unter mutagenen Bedingungen verfolgt (3.1.5). Neben den bereits verwendeten Substanzen H₂O₂ und Mitomycin C wurde dabei zusätzlich der Einfluss eines weiteren alkylierenden Agens, Methylmethansulfonat (MMS), welches zur Methylierung von Adenin und Guanin führt (Lundin et al., 2005), untersucht. Dazu wurden den Kulturen beider Stämme variierende Konzentrationen der mutagenen Substanzen zugegeben und deren Wachstum über einen Zeitraum von 8 h bis 10 h verfolgt. Durch Zugabe aller Agenzien wurde zwar das Wachstum beider Stämme in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration gehemmt, allerdings verhielten sich auch hier der Wildtyp und der *ybiB* knockout nahezu identisch (Daten nicht gezeigt).

DNA-Reparatursysteme zeigen in *E. coli* bekanntermaßen eine hohe Redundanz bzw. überlappende Spezifitäten (Friedberg et al., 2006). So könnte auch der knockout von *ybiB* durch andere Systeme kompensiert werden und deshalb weiterhin ein normales Wachstum der Zellen möglich sein. Um solche Phänomene weitgehend auszuschließen, wurden die weiteren Analysen im *E. coli* DM49-Stamm durchgeführt. Dieser besitzt aufgrund einer Mutation im *lexA*-Gen einen nicht mehr spaltbaren LexA-Repressor, was die Induktion der SOS-Antwort wirkungsvoll verhindert (Mount et al., 1972). Es werden kaum DNA-Reparaturenzyme gebildet, was eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit dieses Stamms gegenüber nukleinsäureschädigenden Bedingungen zur Folge hat. Aufgrund dieser Eigenschaft der DM49-Zellen kann hier der Einfluss von

YbiB auf die Resistenz gegenüber mutagenen Substanzen nahezu unabhängig von anderen Reparaturenzymen untersucht werden. Nachdem *ybiB* selbst im *E. coli* Genom ebenfalls unter der Kontrolle des LexA-RecA-Systems steht und somit nicht exprimiert wird, wurde YbiB für die geplanten Analysen plasmidcodiert in den DM49-Zellen hergestellt. Um dabei artifizielle Effekte aufgrund hoher, nicht nativer Proteinmengen auszuschließen, wurde *ybiB* schwach konstitutiv auf dem pTNA-Plasmid (2.6) exprimiert. Als Kontrollen für Wachstumsanalysen wurden neben DM49 Zellen mit dem leeren pTNA-Plasmid auch Zellen verwendet, die die Nukleosidphosphorylase *deoA* exprimierten. Die Löslichkeit und Menge an plasmidcodiertem YbiB und DeoA wurde durch *western blot* (3.4.6) über den zusätzlich mit eingebauten *his₆-tag* überprüft (Abbildung 4.38).

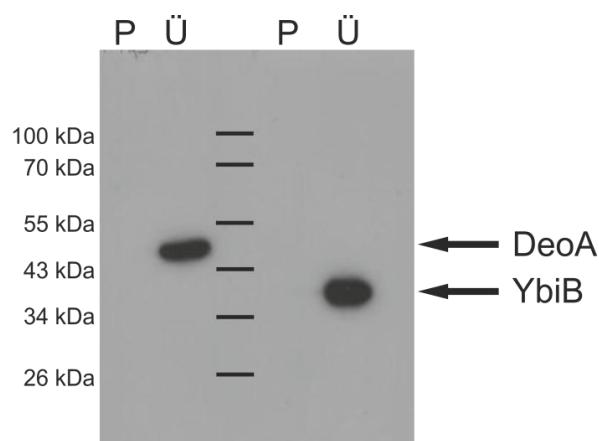


Abbildung 4.38: Expressionsanalyse von *ybiB* und *deoA* in *E. coli* DM49-Zellen mittels western blot. Die ersten beiden Spuren zeigen die unlösliche Fraktion (P) und das Zelllysat (Ü) des DM49 pTNA-*deoA*-Stamms. Rechts neben dem Größenstandard sind die unlösliche Fraktion (P) und der lösliche Überstand (Ü) aus den DM49 pTNA-*ybiB* Zellen zu sehen. Die Banden bei ca. 35 kDa und 45 kDa entsprechen YbiB bzw. DeoA. Die Beladung für die SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) wurde in jeder Spur auf die Zahl der eingesetzten *E. coli*-Zellen normiert. Die Detektion erfolgte über einen Antikörper gegen den C-terminalen *his₆-tag*.

Dabei zeigte sich, dass beide Proteine in den DM49-Zellen vollständig löslich und in annähernd identischen Mengen hergestellt werden. Somit kann ein unterschiedliches Wachstumsverhalten dieser beiden Stämme aufgrund differierender Expressionslevel von *deoA* und *ybiB* ausgeschlossen werden.

Zunächst wurde das Wachstum der drei verwendeten Stämme in LB_{Amp}-Medium ohne weitere Zusätze gemessen (3.1.5) (Abbildung 4.39). Da sich bei Messungen in 50 ml LB-Medium und Inkubation der Kulturen im Tischschüttler die Reproduzierbarkeit als problematisch erwiesen hatte, wurden im Weiteren alle Experimente in 24-well-Platten und einem *plate reader* durchgeführt.

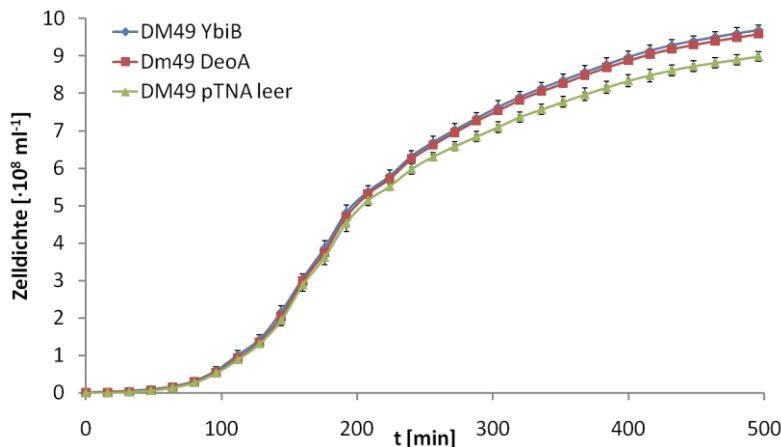


Abbildung 4.39: Wachstumskurven von *E. coli* DM49 pTNA_ybiB und Kontrollen in LB_{Amp}-Medium. Das Wachstum der jeweiligen Stämme wurde über 500 min durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Die daraus ermittelte Zellzahl ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten für jeden Stamm sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben.

Dabei zeigten die drei untersuchten Stämme bis 200 Minuten und einer Zelldichte von ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen / ml ein identisches Verhalten. Danach kommt es bei allen Stämmen zu einer Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit, die für DM49 pTNA jedoch etwas stärker ausfällt als bei den anderen beiden Stämmen. Der Unterschied war insgesamt relativ gering und nur bei hoher Zelldichte zu beobachten.

Das Wachstum dieser drei Stämme wurde nun unter Zusatz von verschiedenen mutagenen Substanzen analysiert. Dabei wurde zunächst der Einfluss von Mitomycin C auf die Zellen untersucht. Es wurde dem Medium in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und anschließend das Wachstum der Kulturen wie zuvor verfolgt (**Abbildung 4.40**).

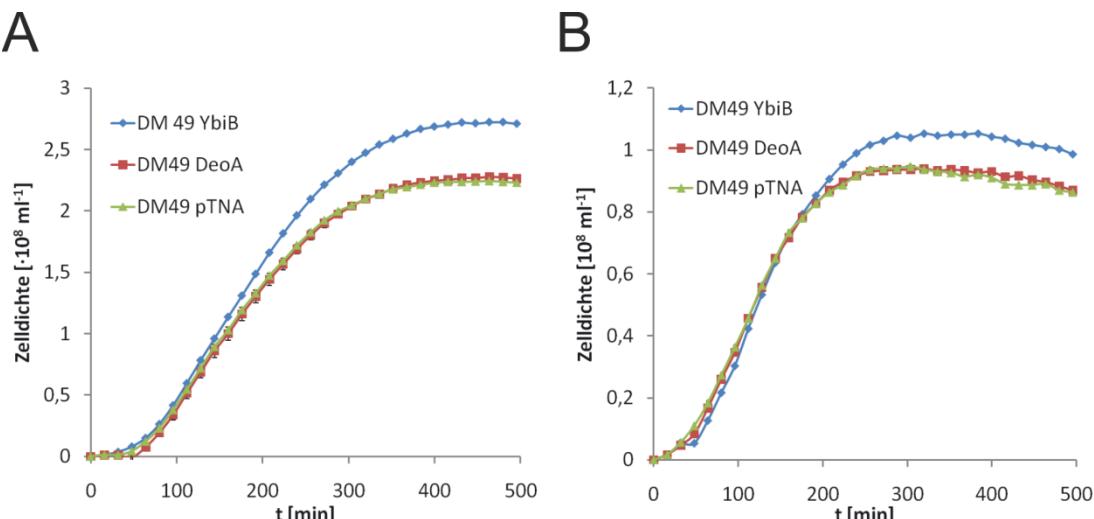


Abbildung 4.40: Wachstumsanalyse von *E. coli* DM49 pTNA_ybiB und Kontrollen unter Zusatz von Mitomycin C. Das Wachstum der Stämme wurde über 500 min unter Zusatz von 0,2 µg/ml (A) bzw. 0,33 µg/ml Mitomycin C (B) durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Die daraus ermittelte Zellzahl ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten für jeden Stamm sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Durch Mitomycin C wurde das Wachstum aller Stämme gehemmt und die maximal erreichbare Zelldichte deutlich herabgesetzt. Dabei zeigte sich jedoch auch, dass die DM49-Zellen mit YbiB bei den beiden getesteten Konzentrationen an Mitomycin C jeweils eine höhere Zelldichte erreichten als die beiden Kontrollstämme. Letztere sind bei den hier vorliegenden Zelldichten von unter $5 \cdot 10^8$ Zellen /ml, wie auch beim Test ohne Mutagen (**Abbildung 4.39**) deckungsgleich. Aus der Expression von *ybiB* ergab sich für die DM49 Zellen ein verbessertes Wachstum von ca. 15 bis 25 %, gemessen an der maximalen Zelldichte. Eine Generationszeit für die verschiedenen Stämme ließ sich hier aufgrund ihres nicht logarithmischen Wachstums nicht bestimmen. YbiB verleiht den DM49-Zellen also gegenüber dem DNA schädigenden Einfluss von Mitomycin C eine verbesserte Resistenz.

Das Wachstum von DM49 pTNA_ybiB und der Kontrolle DM49 pTNA_deoA wurde unter Zugabe von zwei weiteren mutagenen Substanzen, MMS und Wasserstoffperoxid in analoger Weise analysiert (**Abbildung 4.41**).

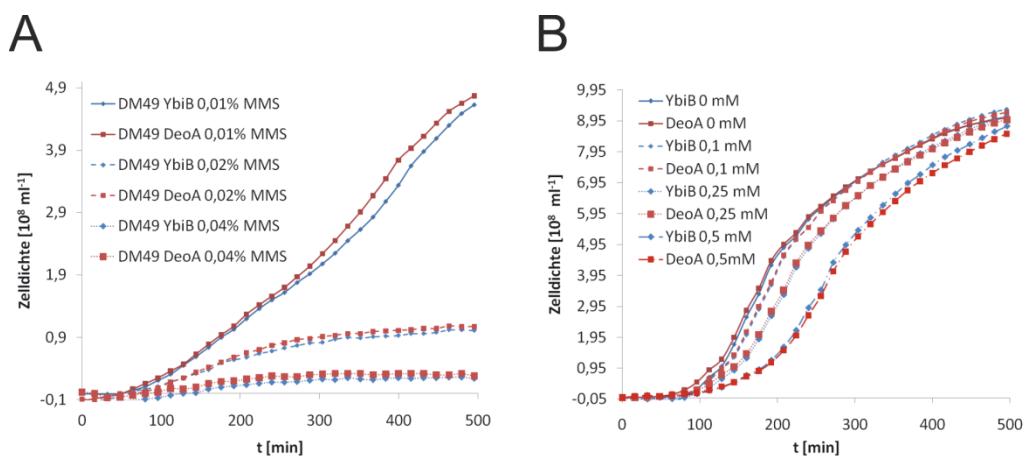


Abbildung 4.41: Wachstumsanalyse von *E. coli* DM49 pTNA_ybiB und der Kontrolle DM49 pTNA_deoA unter Zusatz von MMS und H₂O₂. Das Wachstum der Stämme wurde über 500 min unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen MMS (A) bzw. Wasserstoffperoxid (B) durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Die daraus ermittelte Zellzahl ist gegen die Zeit aufgetragen.

Dabei ergab sich bei beiden Substanzen kein Wachstumsvorteil durch die Expression von *ybiB* in den DM49 Zellen. Das Protein hat somit nur dann einen positiven Effekt auf das Zellwachstum, wenn Mitomycin C den Kulturen zugegeben wurde. Diese Resultate deuten darauf hin, dass YbiB wahrscheinlich spezifisch an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist, wie sie von Mitomycin C induziert werden. Anderweitig beschädigte Nukleinsäuren werden von YbiB dagegen vermutlich nicht erkannt.

Zur weiteren Charakterisierung der TrpD2-Proteinfamilie wurde überprüft, wie sich Austausche von vollständig konservierten Aminosäuren in YbiB auf den gefundenen Phänotyp auswirken. Die bereits auf ihre Nukleinsäurebindungseigenschaften getesteten Varianten von YbiB (4.2.2) wurden dazu, zusammen mit dem 3'-terminalen *his6tag* aus dem pQE60-Vektor über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in den

pTNA-Vektor kloniert und DM49-Zellen mit diesen Konstrukten transformiert. Anschließend wurden von diesen Stämmen Wachstumskurven mit 0,2 µg/ml Mitomycin C im Medium gemessen (**Abbildung 7.4**) und die maximal erreichte Zelldichte für jedes Konstrukt bestimmt. Durch Normierung auf das Wachstum der DM49-Zellen mit dem pTNA_deoA Plasmid konnte dann für jeden Stamm die relative Fitness gegenüber Mitomycin C bestimmt werden (**Tabelle 4.5**).

Tabelle 4.5: Relative Fitness verschiedener *E. coli* DM49 Stämme gegenüber Mitomycin C.

Stamm	Relative Fitness bei 0,2 µg/ml MMC ¹
DM49 pTNA leer	99 % (\pm 5,7 %)
DM49 pTNA_deoA	100 % (\pm 0,26 %)
DM49 pTNA_ybiB	123 % (\pm 2,7 %)
DM49 pTNA_ybiB E58A	106 % (\pm 1,8 %)
DM49 pTNA_ybiB H204A	104 % (\pm 4 %)
DM49 pTNA_ybiB E54A	93 % (\pm 8,3 %)
DM49 pTNA_ybiB L224A	90 % (\pm 4 %)
DM49 pTNA_ybiB E229A	86 % (\pm 4 %)
DM49 pTNA_ybiB Y207A	83 % (\pm 1,7 %)

¹Verhältnis der Zelldichte jedes Stammes nach 400 min Wachstum im Vergleich zu DM49 pTNA_deoA nach 400 min. Die Zahlen in Klammern geben die Standardabweichung der gemessenen Werte, ermittelt aus drei Messreihen, wieder.

Dabei führten alle Austausche von konservierten Aminosäuren zu einer verminderten Resistenz der DM49 Zellen gegenüber Mitomycin C im Vergleich zum ybiB Wildtyp. Die Effekte fielen bei den einzelnen Mutationen unterschiedlich stark aus, wobei nicht klar ist, warum einige ybiB-Varianten sogar ein schlechteres Wachstum zeigten als die beiden Negativkontrollen.

Die verringerte Resistenz der einzelnen YbiB-Varianten gegenüber Mitomycin C kann entweder durch Beeinflussung der Katalyse oder der Löslichkeit und Stabilität aufgrund der eingeführten Mutationen verursacht werden. Diese beiden Möglichkeiten können alleine durch Wachstumskurven nicht unterschieden werden. Um dies weiter zu untersuchen, wurde von zwei repräsentativen Varianten die Löslichkeit und Expression in den DM49-Zellen überprüft (**Abbildung 4.42**).

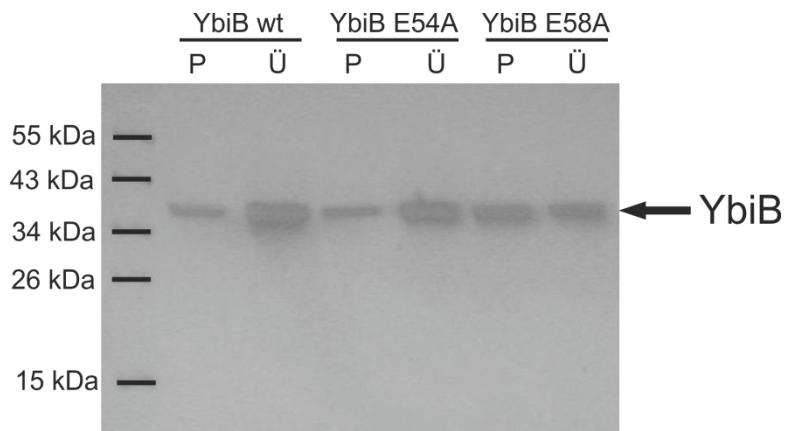


Abbildung 4.42: Expressionsanalyse verschiedener *ybiB* Varianten in *E. coli* DM49-Zellen durch western blot. Für YbiB wt und die beiden Varianten E54A und E58A wurden jeweils die Proteinmenge in der unlöslichen Fraktion (P) und dem Zelllysat (Ü) getestet. Die Banden bei ca. 35 kDa entsprechen dabei YbiB bzw. dessen Varianten. Die Beladung für die SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) wurde in jeder Spur auf die Zahl der eingesetzten *E. coli*-Zellen normiert. Die Detektion erfolgte über einen Antikörper gegen den C-terminalen *his₆-tag*.

Dabei zeigte sich, dass der Austausch E54A zu keiner Veränderung der Löslichkeit und Expression von YbiB führt. Dagegen wurde durch den E58A Austausch die Menge an löslichem Protein um die Hälfte verringert. Nachdem in den Wachstumstests die Variante YbiB-E58A eine deutlich höhere relative Fitness zeigte als -E54A (Tabelle 4.5) liegt offensichtlich keine direkte Korrelation zwischen der Löslichkeit der Varianten und der Resistenz der Stämme gegen Mitomycin C vor. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass zumindest ein Teil der eingeführten Mutationen tatsächlich die Fähigkeit von YbiB beeinflusst, DNA Schädigungen durch Mitomycin C zu verhindern oder zu reparieren. Eine genauere Evaluierung des Einflusses der einzelnen Austausche auf die funktionellen Eigenschaften von YbiB ist gegenwärtig nicht möglich. Diese kann erst durch Bestimmung der katalytischen Parameter für die einzelnen YbiB-Varianten *in vitro* erfolgen, sobald die genaue Funktion des Proteins bekannt ist.

5 Abschließende Diskussion

Alle im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Daten, sowie die abgeleiteten Fakten aus der Kristallstruktur von YbiB deuten darauf hin, dass es sich bei den TrpD2-Proteinen um neuartige Nukleinsäure-modifizierende Enzyme mit vermutlich einheitlicher Funktion handelt. Für YbiB wurde klar gezeigt, dass es weder NP-II- noch TrpD-Aktivität besitzt, dafür aber genauso wie das TrpD2-Protein aus *Aquifex aeolicus* in der Lage ist, einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden. Gleichwohl steht die eindeutige Identifikation seiner molekularen Funktion immer noch aus. Unter Beleuchtung der Nukleinsäurebindungseigenschaften des aktiven Zentrums, sowie der bereits durchgeführten Experimente zur funktionellen Analyse von YbiB soll im Folgenden eine Hypothese über die Aufgabe von YbiB in *E. coli* aufgestellt werden.

Gegenwärtig ist nicht eindeutig gezeigt, ob RNA oder ssDNA innerhalb der Zellen von YbiB bevorzugt als Substrat akzeptiert wird und auf welche Weise die gebundenen Nukleinsäuren anschließend vom Protein prozessiert werden. Dabei sind sowohl der gezielte Einbau spezifischer Modifikationen in die Nukleinsäuren, als auch deren Reparatur denkbar. Letzteres erscheint wahrscheinlicher, nachdem *ybiB* gemeinsam mit anderen Genen der SOS-Antwort als zelluläre Reaktion auf Beschädigungen des Erbmaterials in *E. coli* reguliert ist. Folglich stellt ssDNA vermutlich das Substrat von YbiB in der Zelle dar. Enzyme zur Reparatur von beschädigter RNA wurden zwar bereits identifiziert (Begley and Samson, 2003), diese Aktivitäten sind allerdings relativ selten, da Abbau und Neusynthese beschädigter RNA als sicherere Alternative bevorzugt durchgeführt wird. Deshalb wird hier ein Modell für YbiB als RNA-Reparaturenzym nicht weiterverfolgt.

5.1 Nukleinsäurebindung an YbiB

Die Interaktion von YbiB mit einzelsträngigen Nukleinsäuren wurde durch zahlreiche *in vitro*-Experimente gezeigt, wobei sich stets vergleichbare Bindungsparameter für ssDNA und RNA ergaben. Auch *crosslink*-Experimente mit Formaldehyd in *E. coli*-Zellen lieferten keine weiteren Aussagen über die Spezifität des Proteins. Zur weiteren Untersuchung dieser Frage soll YbiB mit eingebauter nichtnatürlicher Aminosäure (*ybiB*-H204pBPA) für *in vivo*-Experimente in *E. coli* exprimiert werden. Nachdem *in vitro* bereits eine spezifische Quervernetzung dieser YbiB-Variante mit Nukleinsäuren erreicht werden konnte, könnte sich so durch *in vivo crosslinking* das bevorzugte Substrat des Proteins identifizieren lassen.

Für alle *in vitro* getesteten Oligonukleotide ergaben sich, unabhängig von der Sequenz, stets Affinitäten an YbiB im niedrigen nanomolaren Bereich (**Tabelle 4.2**). Die Interaktion wird dabei durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen von

konservierten Argininen und Lysinen mit dem Phosphatrückgrat erreicht und wird dementsprechend von der Zusammensetzung und Ionenstärke des verwendeten Puffers beeinflusst (**Abbildung 4.12**). Solche sequenzunspezifischen Interaktionen wurden häufig bei DNA-bindenden Enzymen, beispielsweise den DNA-Glycosylasen, gefunden (Fedorova et al., 2002; Kalodimos et al., 2004; Zharkov and Grollman, 2005). Diese Proteine werden so in der Nähe der Nukleinsäuren gehalten und können mittels eindimensionaler Diffusion deutlich schneller ihr spezifisches Ziel (z.B. einen DNA-Schaden) identifizieren als durch die Brown'sche Molekularbewegung allein (Halford and Marko, 2004). Bei YbiB verläuft die Substraterkennung wohl ebenfalls über unspezifisches Entlanggleiten an den Nukleinsäuren mit Ausbildung eines festeren Komplexes am spezifischen Ziel.

Obwohl diese Experimente auf eine sequenzunspezifische Interaktion von YbiB mit Nukleinsäuren hindeuteten, konnte aufgrund der geringen Anzahl von getesteten Oligonukleotiden das Vorkommen von Sequenzen mit höherer Affinität für das Protein nicht ausgeschlossen werden. Um die Bindung einer möglichst großen Zahl von verschiedenen Oligonukleotidsequenzen an YbiB zu untersuchen, wurden SELEX-Experimente durchgeführt. Dabei konnten zwei Sequenzmotive mit höherer Affinität für YbiB identifiziert werden (4.2.3). Ihre weitere Charakterisierung (Masterarbeit A. Holinski) soll nun klären, ob diese Sequenzen von funktioneller Bedeutung für YbiB sind oder ob lediglich spezifische Aptamere gegen das Protein selektiert wurden.

Im Weiteren wurde durch Fluoreszenztitration die, für die Bindung an YbiB, minimal erforderliche Länge eines Oligonukleotids auf 12 Basen bestimmt, wobei hierbei ein YbiB-Dimer an ein ssDNA-Fragment bindet. Die Verlängerung des Oligonukleotids führte ab 14 bzw. 28 Nukleotiden zu einer schrittweisen Veränderung der Bindungsstöchiometrie, bei der zunächst zwei und anschließend drei YbiB-Dimere mit einem Oligonukleotid interagierten (4.2.1).

5.2 Struktur und Evolution der TrpD2-Enzyme

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte in Kooperation mit Olga Mayans die Röntgenstruktur von YbiB gelöst werden. Dabei zeigte sich eine Oberflächenfalte entlang des Proteindimers, in der interessanterweise der Einzelstrang einer DNA-Doppelhelix sehr gut zu liegen kommt (**Abbildung 4.9**). Zusammen mit der Ladungsverteilung innerhalb dieser Falte war daraus zum ersten Mal geschlossen worden, dass es sich bei den TrpD2-Proteinen um eine nukleinsäurebindende Proteinfamilie handeln könnte, was anschließend durch zahlreiche *in vitro*-Experimente bestätigt wurde.

Weitere Analysen der Struktur zeigten jedoch, dass für die Interaktion von Nukleinsäuren mit YbiB zwei unterschiedliche Bindungskonformationen denkbar sind.

So könnte ein einzelner Nukleinsäurestrang, wie zunächst vermutet, entlang der Oberflächenfalte mit beiden Monomeren des Proteins interagieren. Alternativ ist es möglich, dass jede Untereinheit, in etwa parallel zur Dimerisierungsfläche, je einen Einzelstrang bindet (**Abbildung 5.1**).

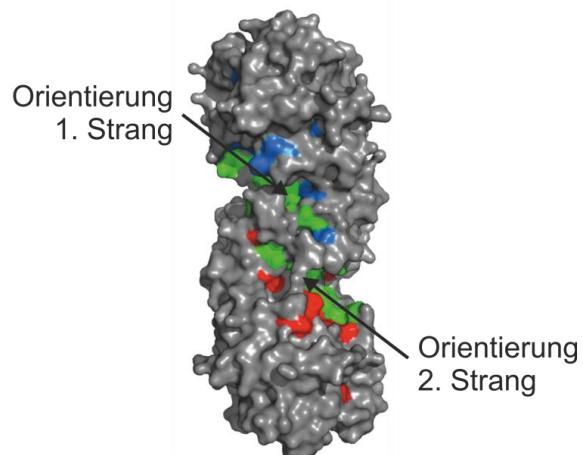


Abbildung 5.1: Mögliche Bindungskonformation von zwei Einzelsträngen simultan an das YbiB-Dimer. Raumstruktur von YbiB. Die konservierten Lysine und Arginine beider Untereinheiten sind grün dargestellt. Die anderen konservierten Residuen sind blau bzw. rot gezeigt. Die beiden Pfeile markieren die Orientierung, in der zwei ssDNA-Einzelstränge parallel an das Protein binden können.

Dass die Nukleinsäuren dabei analog zum *single strand binding protein* (SSB) um das Protein gewunden werden (Raghunathan et al., 2000; Kozlov et al., 2002), kann allerdings aufgrund der dafür zu kurzen Bindungslänge von etwa 7 Nukleotiden je YbiB-Monomer ausgeschlossen werden (4.2.1). Zur Aufklärung der tatsächlichen Konformation des YbiB-Oligonukleotid-Komplexes ist die Strukturbestimmung dieses Komplexes von enormem Interesse. Nachdem alle herkömmlichen Ansätze zur Cokristallisation ohne Erfolg blieben, wurde in dieser Arbeit ein Protokoll zur kovalenten Verknüpfung des Proteins mit seinem Liganden über den Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure entwickelt. Dieser Komplex wurde gereinigt und soll in naher Zukunft für Kristallisationsscreens in Kooperation mit Prof. Christine Ziegler (Universität Regensburg) verwendet werden. Ausgehend davon könnte zusätzlich das putative aktive Zentrum von YbiB besser definiert werden und somit bioinformatische Funktionsanalysen mit *molecular docking* ermöglichen.

Die neben den für die Nukleinsäurebindung wichtigen konservierten Lysinen und Argininen weiteren vollständig konservierten Aminosäuren der TrpD2-Familie treten bei YbiB in einer Vertiefung nahe der vermuteten Nukleinsäurebindestelle auf. Hier handelt es sich wohl um das aktive Zentrum, in dem Nukleinsäuren vom Enzym prozessiert werden können. Dieses liegt in derselben Region wie bei den Anthranilate-Phosphoribosyltransferasen und den NP-II Enzymen, wobei das aktive Zentrum von YbiB wesentlich größer ist und sich bis zur Kontaktfläche der beiden Protomere

ausdehnt. Dabei sind Reste aus der einen Untereinheit an der Ausbildung des aktiven Zentrums im anderen Protomer beteiligt (**Abbildung 4.8 B**). Im Gegensatz zu den TrpD-Enzymen, bei denen angenommen wird, dass die Dimerisierung lediglich zur Stabilisierung der Protomere dient (Schwab et al., 2008), liegt bei den TrpD2-Proteinen also wahrscheinlich eine funktionelle Kopplung der Untereinheiten vor. Die beiden *shared active sites* werden erst durch die Oligomerisierung des Proteins vervollständigt. Weitere Untersuchungen mit der monomeren YbiB-Variante L40E legen ebenfalls eine funktionelle Kopplung der beiden Protomere nahe (A. Holinski, persönliche Mitteilung). Dabei zeigte das monomere Protein eine deutlich herabgesetzte Affinität für ssDNA, was durch die Beteiligung von Lysinen und Argininen einer Untereinheit an der Nukleinsäurebindestelle in der anderen Untereinheit erklärt werden kann.

Sowohl die TrpD-Enzyme wie auch die TrpD2-Proteinfamilie gehen auf einen gemeinsamen Vorläufer zurück, haben aber im Laufe ihrer divergenten Evolution drastisch verschiedene Substratspezifitäten entwickelt. Die Interaktion von ssDNA mit YbiB wird dabei mit relativ geringen Veränderungen der Gesamtstruktur im Vergleich zu TrpD-Proteinen erreicht. Die funktionelle Charakterisierung der TrpD2-Proteinfamilie zeigt somit eindrucksvoll, welche Diversität während der Evolution zweier Proteine nach einer Genduplikation erreicht werden kann.

5.3 Putative Funktion der TrpD2-Proteine

Allein aus seiner Interaktion mit einzelsträngiger DNA und seiner Struktur konnte für YbiB keine unmittelbare Funktion abgeleitet werden. Im Genom von *E. coli* bildet *ybiB* zusammen mit der DNA-Helikase *dinG* ein LexA-kontrolliertes Operon (**Abbildung 4.3**), was auf eine Beteiligung an der Reparatur von beschädigten Nukleinsäuren hindeutet. Dabei könnte die Helikase den DNA-Doppelstrang aufwinden und so ssDNA als Substrat für YbiB bereitstellen. Im weiteren Verlauf könnte YbiB dann eine beschädigte Base phosphorolytisch, nach einem Mechanismus analog zu den NP-II-Enzymen, entfernen oder wegen der Umkehrbarkeit der Reaktion (1.2; **Abbildung 1.4**) sogar durch eine intakte Base ersetzen (**Abbildung 5.2**).

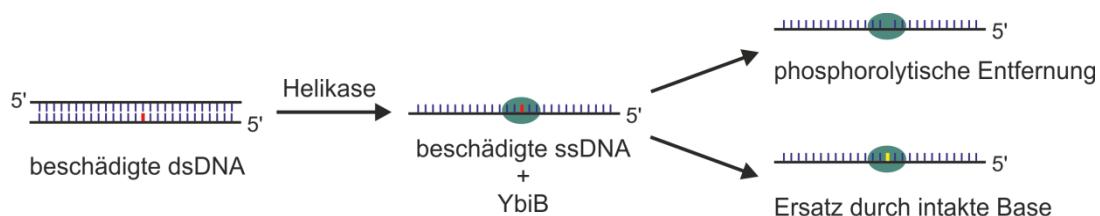


Abbildung 5.2: Schematischer Ablauf der möglichen Reparatur beschädigter dsDNA durch YbiB. Intakte DNA-Basen sind blau gezeigt, die beschädigte DNA Base ist rot markiert. Die, durch YbiB, neu eingeführte, intakte Base ist gelb gezeigt.

Zusätzlich zeigten Experimente mit dem reparaturdefizienten *E. coli*-Stamm DM49, dass dort die gezielte Expression von *ybiB* zu einer deutlich erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Mitomycin C führt (Abbildung 4.40). Bei den weiteren getesteten Mutagenen Wasserstoffperoxid und MMS ergab sich hingegen kein Phänotyp, obwohl es sich dabei wie bei MMC auch um alkylierende Agentien handelt. Das Protein ist somit vermutlich selektiv für die Reparatur von DNA-Schäden der Art verantwortlich, wie sie MMC induziert.

Bei Mitomycin C handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Mutagen, das zuerst aus *Streptomyces caespitosus* isoliert werden konnte. Aufgrund seiner Fähigkeit, die DNA durch Alkylierung mehrfach zu modifizieren, kann es eine Vielzahl verschiedener Schädigungen des Erbmaterials hervorrufen. Dabei werden vor allem Guanosine an der N²-Position alkyliert. Seltener treten Alkylierungen an der N⁶-Position von Adenosin und der O⁶-Position von Guanosin auf (Hashimoto et al., 1985). Bemerkenswerterweise zeigen Proteomanalysen, dass die Abwesenheit von YbiB mit einer Erniedrigung der Menge der beiden Enzyme einhergeht, welche die jeweils letzten Reaktionen in der Biosynthese von GMP bzw. AMP katalysieren (Tabelle 4.1). Zusätzlich können zwei in räumlicher Nähe befindliche Guanosine durch zweimalige N²-Alkylierung durch MMC verbrückt werden (Abbildung 5.3). Dabei werden zum einen Intrastrang-Vernetzungen erzeugt, extrem zytotoxisch ist vor allem aber die kovalente Verknüpfung der beiden DNA-Einzelstränge, da bei der Reparatur dieser Schäden durch das *nucleotide excision repair*-System Doppelstrangbrüche im Genom entstehen (Weng et al., 2010).

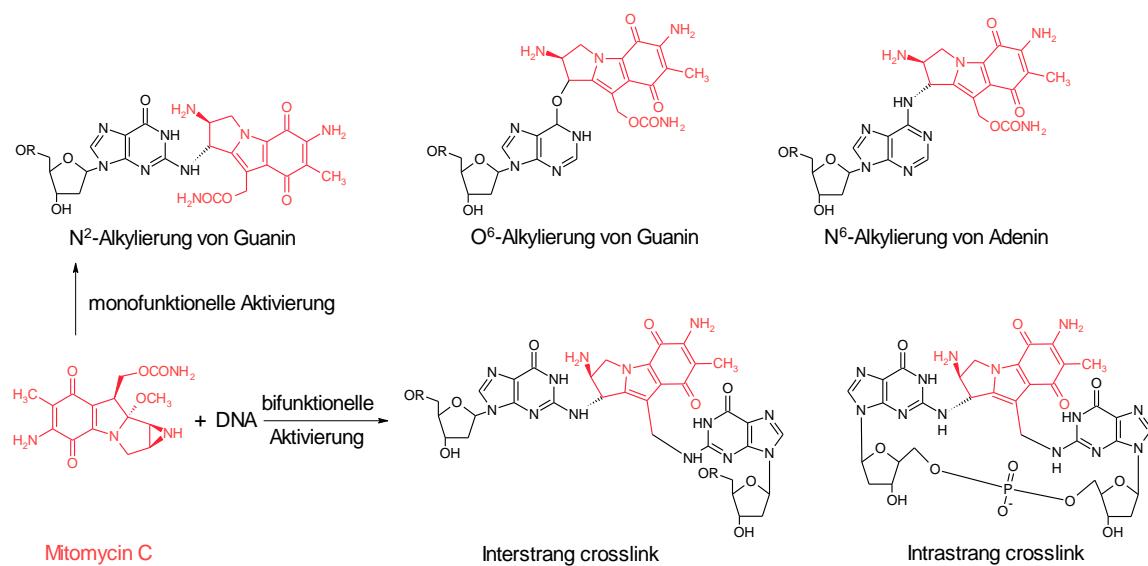


Abbildung 5.3: Mögliche Schädigung von DNA durch Alkylierung mit Mitomycin C.

Diese bifunktionelle Modifikation der DNA unter Quervernetzung des Erbmaterials setzt sich ab von den möglichen Schädigungen durch MMS, welches Nukleinsäuren nur einmal alkylieren kann. Es erscheint somit plausibel, dass YbiB an der Reparatur dieser

Schädigungen beteiligt ist. Das Protein könnte durch seine beiden aktiven Zentren die Reparatur eines solchen *crosslinks* simultan, ohne das Auftreten von Strangbrüchen, katalysieren. Werden die bis zur Beschädigung partiell aufgewundenen Einzelstränge des Genoms vom Protein in der in **Abbildung 5.1** angedeuteten Orientierung gebunden, würden die kovalent verknüpften Basen in unmittelbarer Nähe der beiden aktiven Zentren von YbiB zu liegen kommen. In der Apostruktur von YbiB ist allerdings der Abstand der katalytischen Zentren zu groß, um simultan die beiden modifizierten Nukleotide zu binden. Man könnte sich jedoch vorstellen, dass das Enzym zunächst den Schaden im einen Strang entfernt und dann ein kleines Stück weiterrückt, um den Gegenstrang zu reparieren. Kommt es bei der Substratbindung an die TrpD2-Proteine zu einer *hinge*-Bewegung wie bei den TrpD- und NP-II Enzymen (Pugmire et al., 1998; Pugmire et al., 1998; Norman et al., 2004; Marino et al., 2006), könnte auch dies allein schon die Katalyse ermöglichen. Dabei nähern sich in jeder Untereinheit des Proteins die N- und C-terminale Domäne durch ein scharnierartiges Zusammenklappen an, wodurch gleichzeitig auch die Distanz zwischen den beiden aktiven Zentren verringert wird. Mit der *hinge* Bewegung könnten zudem ein vollständig konserviertes Histidin (Position 204) und ein konservierter Aromat (bei YbiB Tyrosin 207), die am Rand des putativen aktiven Zentrums liegen (**Abbildung 4.22**) in unmittelbare Nähe der Nukleinsäuren gebracht werden. Der konservierte Aromat könnte mit dem DNA-Einzelstrang durch *stacking*-Interaktionen wechselwirken und so die korrekte Positionierung der beschädigten Base im aktiven Zentrum von YbiB erleichtern. Das Histidin wäre dann in der Lage, katalytisch zu wirken und die beschädigte Base aus der DNA zu entfernen. Es erscheint also durchaus denkbar, dass es sich bei YbiB und der gesamten TrpD2-Proteinfamilie um eine bisher unbekannte Klasse von Reparaturenzymen handelt, die spezifisch Strang-Quervernetzungen erkennen und aus dem Genom entfernen. Eine derartige Reparaturfunktion ist in Bakterien bisher nicht beschrieben. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind mehrere Experimente denkbar, die nun durchgeführt werden sollen.

Zunächst soll die DNA aus reparaturdefizienten *E. coli* DM49-Zellen, die mit MMC inkubiert wurden, auf das Auftreten von beschädigten Basen hin untersucht und mit einer DNA-Präparation aus DM49 pTNA_ybiB Zellen (gezielte Expression von *ybiB*) verglichen werden. Bei ersten Versuchen konnten dabei allerdings keine Substanzen außer den vier natürlich vorkommenden Desoxyribonukleosiden gefunden werden. Die Menge der modifizierten Basen liegt wahrscheinlich unterhalb der Detektionsgrenze des Absorptionsdetektors. Eine Möglichkeit, die Sensitivität der Messung deutlich zu steigern, ergäbe sich aus der Verwendung von radioaktiv markiertem MMC. Zusätzlich könnte nach Extraktion von genetischer DNA allein durch Messung der enthaltenen Radioaktivität die Anzahl der mit MMC verknüpften Basen bestimmt werden. So wäre einfach zu überprüfen, ob die gezielte Expression von *ybiB* in den DM49-Zellen zu weniger Beschädigungen im Genom von *E. coli* führt. Zu klären ist die Erzeugung des radioaktiv markierten MMCs, nachdem es mit ¹⁴C-Markierung nicht käuflich zu

erwerben ist. Dabei sind seine chemische Darstellung (Fukuyama and Yang, 1989) ausgehend von radioaktiv markierten Edukten oder die Kultivierung von *Streptomyces caespitosus* in ¹⁴C-markiertem Medium mit anschließender Reinigung von MMC aus den Zellen denkbar.

Auch könnten *in vivo*-Quervernetzungsexperimente mit der *ybiB* H204pBPA-Variante zur Identifikation der spezifischen Substrate des Proteins führen. Ihre Expression in DM49-Zellen in Anwesenheit von MMC sollte es erlauben, die Substrate von YbiB am Enzym kovalent zu fixieren, aus den Zellen zu reinigen und stark genug anzureichern, um die Analyse mittels HPLC zu ermöglichen.

Neben diesen *in vivo*-Ansätzen soll außerdem der Umsatz von beschädigten Basen durch YbiB *in vitro* gemessen und so seine molekulare Funktion gezeigt werden. Dazu sollen Oligonukleotide durch MMC modifiziert werden. Dabei ist eine reduktive Aktivierung von MMC durch cis-Platin, Natriumdithionit oder Natriumborhydrid notwendig (Ueda and Komano, 1984; Tomasz et al., 1987), ein kompletter Sauerstoffausschluss während der gesamten Reaktion muss gewährleistet sein (Li and Kohn, 1991). Erste Tests zeigten, dass dies nicht trivial ist; gegebenenfalls sollte deshalb eine Kooperation mit einer Arbeitsgruppe, die bereits Erfahrung mit der Herstellung von MMC induzierten DNA Schädigungen hat, in Betracht gezogen werden.

Parallel sollten nochmals Versuche mit radioaktivem Phosphat und *in vivo* geschädigter DNA als Substrate für YbiB unternommen werden (4.4.2). Ein reproduzierbarer Einbau von Radioaktivität in Nukleinsäuren durch das Protein würde den phosphorolytischen Mechanismus der Reaktion von YbiB zeigen und gleichzeitig bestätigen, dass beschädigte DNA ein weiteres Substrat des Proteins ist.

5.4 Evolutionäre Implikationen

Die Experimente dieser Arbeit legen eine physiologische Funktion von YbiB als Teil der SOS-Antwort von *E. coli* bei der zellulären Reaktion auf DNA-Quervernetzungsschäden nahe. Die weitere funktionelle Analyse der TrpD2-Familie ist somit von großem Interesse, da es sich bei ihnen vermutlich um eine neuartige Gruppe von DNA-Reparaturenzymen handelt. Zusätzlich konnte aufgrund der evolutionären Beziehung zwischen der TrpD- und TrpD2-Familie ein außerordentliches Beispiel für die funktionelle Flexibilität der divergenten Proteinevolution gefunden werden. Die bereits durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich, wie weit sich die molekularen Funktionen dieser beiden Enzymklassen im Laufe ihrer Entwicklung, unter Beibehaltung einer nahezu identischen Gesamtstruktur, voneinander entfernt haben. Trotz intensiver Suche konnte kein nukleinsäurebindendes Protein mit einer

vergleichbar hohen Ähnlichkeit zu einem metabolischen Enzym wie im vorliegenden Fall gefunden werden. Die Funktionsaufklärung und weitere mechanistische Analyse der TrpD2-Proteine wird deshalb zu einem besseren Verständnis führen, wie Proteine ihre Funktion ausführen und welche funktionelle Diversität auf einem Faltungstyp durch Evolution zugänglich ist.

6 Literatur

- Arifuzzaman, M., M. Maeda, A. Itoh, K. Nishikata, C. Takita, R. Saito, T. Ara, K. Nakahigashi, H. C. Huang, A. Hirai, K. Tsuzuki, S. Nakamura, M. Altaf-Ul-Amin, T. Oshima, T. Baba, N. Yamamoto, T. Kawamura, T. Ioka-Nakamichi, M. Kitagawa, M. Tomita, S. Kanaya, C. Wada and H. Mori** (2006). Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res* 16: 686-691.
- Auffray, Y. and P. Boutibonnes** (1987). Presence of inducible DNA repair in *Bacillus thuringiensis*. *Mutat Res* 183: 225-229.
- Bachmann, B. J.** (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* 54: 130-197.
- Ballschmiter, M., O. Futterer and W. Liebl** (2006). Identification and characterization of a novel intracellular alkaline alpha-amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol* 72: 2206-2211.
- Beckonert, O., H. C. Keun, T. M. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson** (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2: 2692-2703.
- Begley, T. J. and L. D. Samson** (2003). Molecular biology: A fix for RNA. *Nature* 421: 795-796.
- Behr, A.** (2010). In vivo-Interaktionsstudien zum *E. coli*-Protein YbiB. Diplomarbeit Universität Regensburg.
- Black, C. G., J. A. Fyfe and J. K. Davies** (1998). Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* 208: 61-66.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Cao, H., B. L. Pietrak and C. Grubmeyer** (2002). Quinolinate phosphoribosyltransferase: kinetic mechanism for a type II PRTase. *Biochemistry* 41: 3520-3528.
- Carey, J.** (1991). Gel retardation. *Methods Enzymol* 208: 103-117.
- Chiang, R. A., A. Sali and P. C. Babbitt** (2008). Evolutionarily conserved substrate substructures for automated annotation of enzyme superfamilies. *PLoS Comput Biol* 4: e1000142.
- Chin, J. W., A. B. Martin, D. S. King, L. Wang and P. G. Schultz** (2002). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11020-11024.
- Chin, J. W., S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang and P. G. Schultz** (2002). Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* 124: 9026-9027.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown and P. C. Hanawalt** (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158: 41-64.
- Crain, P. F.** (1990). Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry. *Methods Enzymol* 193: 782-790.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
- de Carvalho, L. P., H. Zhao, C. E. Dickinson, N. M. Arango, C. D. Lima, S. M. Fischer, O. Ouerfelli, C. Nathan and K. Y. Rhee** (2010). Activity-based metabolomic profiling of enzymatic function: identification of Rv1248c as a mycobacterial 2-hydroxy-3-oxoadipate synthase. *Chem Biol* 17: 323-332.
- Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olsen and R. V. Swanson** (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358.

- Dorman, G. and G. D. Prestwich** (1994). Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 33: 5661-5673.
- Eads, J. C., D. Ozturk, T. B. Wexler, C. Grubmeyer and J. C. Sacchettini** (1997). A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure* 5: 47-58.
- Ellington, A. D. and J. W. Szostak** (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822.
- Fedorova, O. S., G. A. Nevinsky, V. V. Koval, A. A. Ishchenko, N. L. Vasilenko and K. T. Douglas** (2002). Stopped-flow kinetic studies of the interaction between *Escherichia coli* Fpg protein and DNA substrates. *Biochemistry* 41: 1520-1528.
- Fernandez de Henestrosa, A. R., S. Calero and J. Barbe** (1991). Expression of the recA gene of *Escherichia coli* in several species of gram-negative bacteria. *Mol Gen Genet* 226: 503-506.
- Fernandez de Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori and R. Woodgate** (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35: 1560-1572.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, w. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz and T. Ellenberger**, Eds. (2006). DNA Repair and Mutagenesis, (ASM Press) 2nd edition: 463-497.
- Friedberg, I., M. Jambon and A. Godzik** (2006). New avenues in protein function prediction. *Protein Sci* 15: 1527-1529.
- Fukuyama, T. and L. Yang** (1989). Practical total synthesis of (.-.-)-mitomycin C. *J Am Chem Soc* 111: 8303-8304.
- Garcia-Jimenez, B., D. Juan, I. Ezkurdia, E. Andres-Leon and A. Valencia** (2010). Inference of functional relations in predicted protein networks with a machine learning approach. *PLoS One* 5: e9969.
- Gerlt, J. A. and P. C. Babbitt** (2000). Can sequence determine function? *Genome Biol* 1: REVIEWS0005.
- Guex, N. and M. C. Peitsch** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

- Guldan, H., F. M. Matysik, M. Bocola, R. Sterner and P. Babinger** (2011). Functional Assignment of an Enzyme that Catalyzes the Synthesis of an Archaea-Type Ether Lipid in Bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 8188-8191.
- Guyer, M. S., R. R. Reed, J. A. Steitz and K. B. Low** (1981). Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45 Pt 1: 135-140.
- Halford, S. E. and J. F. Marko** (2004). How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res* 32: 3040-3052.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hashimoto, Y. and K. Shudo** (1985). Chemical modification of DNA with muta-carcinogens. III. Reductive alkylation of DNA with mitomycin C. *Environ Health Perspect* 62: 219-222.
- Hermann, J. C., R. Marti-Arbona, A. A. Fedorov, E. Fedorov, S. C. Almo, B. K. Shoichet and F. M. Raushel** (2007). Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature* 448: 775-779.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick** (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32.
- Huson, D. H. and D. Bryant** (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23: 254-267.
- Imlay, J. A., S. M. Chin and S. Linn** (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240: 640-642.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jaruga, P. and M. Dizdaroglu** (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 24: 1389-1394.
- Kalodimos, C. G., N. Biris, A. M. Bonvin, M. M. Levandoski, M. Guennuegues, R. Boelens and R. Kaptein** (2004). Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes. *Science* 305: 386-389.

- Kauer, J. C., S. Erickson-Viitanen, H. R. Wolfe, Jr. and W. F. DeGrado** (1986). p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* 261: 10695-10700.
- Kim, C., N. H. Xuong, S. Edwards, Madhusudan, M. C. Yee, G. Spraggon and S. E. Mills** (2002). The crystal structure of anthranilate phosphoribosyltransferase from the enterobacterium *Pectobacterium carotovorum*. *FEBS Lett* 523: 239-246.
- Kozlov, A. G. and T. M. Lohman** (2002). Stopped-flow studies of the kinetics of single-stranded DNA binding and wrapping around the *Escherichia coli* SSB tetramer. *Biochemistry* 41: 6032-6044.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley and K. Tamura** (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9: 299-306.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, H. S., D. D. Romerson and P. G. Schultz** (2009). Protein-DNA photo-crosslinking with a genetically encoded benzophenone-containing amino acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter* 19: 5222-5224.
- Li, V. S. and H. Kohn** (1991). Studies on the bonding specificity for mitomycin C-DNA monoalkylation processes. *J Am Chem Soc* 113: 275-283.
- Little, J. W.** (1984). Autodigestion of lexA and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1375-1379.
- Love, P. E. and R. E. Yasbin** (1984). Genetic characterization of the inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 160: 910-920.
- Lundin, C., M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A. S. Goldman and T. Helleday** (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 33: 3799-3811.

- Marchler-Bauer, A., S. Lu, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, M. V. Omelchenko, C. L. Robertson, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, C. Zheng and S. H. Bryant** (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39: D225-229.
- Marino, M., M. Deuss, D. I. Svergun, P. V. Konarev, R. Sterner and O. Mayans** (2006). Structural and mutational analysis of substrate complexation by anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 281: 21410-21421.
- Mayans, O., A. Ivens, L. J. Nissen, K. Kirschner and M. Wilmanns** (2002). Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry. *Embo J* 21: 3245-3254.
- Mayer, G. and T. Höver** (2009). In vitro selection of ssDNA aptamers using biotinylated target proteins. *Methods Mol Biol* 535: 19-32.
- Morse, M. L., E. M. Lederberg and J. Lederberg** (1956). Transduction in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 41: 142-156.
- Mount, D. W., K. B. Low and S. J. Edmiston** (1972). Dominant mutations (lex) in *Escherichia coli* K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet light-induced mutations. *J Bacteriol* 112: 886-893.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Mushegian, A. R. and E. V. Koonin** (1994). Unexpected sequence similarity between nucleosidases and phosphoribosyltransferases of different specificity. *Protein Sci* 3: 1081-1088.
- Norman, R. A., S. T. Barry, M. Bate, J. Breed, J. G. Colls, R. J. Ernill, R. W. Luke, C. A. Minshull, M. S. McAlister, E. J. McCall, H. H. McMiken, D. S. Paterson, D. Timms, J. A. Tucker and R. A. Paupit** (2004). Crystal structure of human thymidine phosphorylase in complex with a small molecule inhibitor. *Structure* 12: 75-84.
- Notredame, C., D. G. Higgins and J. Heringa** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217.

- Novick, R. P., R. C. Clowes, S. N. Cohen, R. Curtiss, 3rd, N. Datta and S. Falkow** (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* 40: 168-189.
- O'Sullivan, O., K. Suhre, C. Abergel, D. G. Higgins and C. Notredame** (2004). 3DCoffee: combining protein sequences and structures within multiple sequence alignments. *J Mol Biol* 340: 385-395.
- Ohmori, H., E. C. Friedberg, R. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. A. Kunkel, C. W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G. C. Walker, Z. Wang and R. Woodgate** (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* 8: 7-8.
- Ozturk, D. H., R. H. Dorfman, G. Scapin, J. C. Sacchettini and C. Grubmeyer** (1995). Structure and function of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase: protein complementation reveals shared active sites. *Biochemistry* 34: 10764-10770.
- Peterhoff, D.** (2009). Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren zur Untersuchung der Dimerisierung von PcrB. Diplomarbeit Universität Regensburg.
- Pomerantz, S. and J. McCloskey** (1990). Analysis of RNA hydrolyzates by liquid chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 193: 796-824.
- Pugmire, M. J., W. J. Cook, A. Jasanoff, M. R. Walter and S. E. Ealick** (1998). Structural and theoretical studies suggest domain movement produces an active conformation of thymidine phosphorylase. *J Mol Biol* 281: 285-299.
- Pugmire, M. J. and S. E. Ealick** (1998). The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation. *Structure* 6: 1467-1479.
- Pugmire, M. J. and S. E. Ealick** (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J* 361: 1-25.
- Radman, M.** (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci* 5A: 355-367.
- Raghunathan, S., A. G. Kozlov, T. M. Lohman and G. Waksman** (2000). Structure of the DNA binding domain of *E. coli* SSB bound to ssDNA. *Nat Struct Biol* 7: 648-652.

- Reinstein, J., I. R. Vetter, I. Schlichting, P. Rosch, A. Wittinghofer and R. S. Goody** (1990). Fluorescence and NMR investigations on the ligand binding properties of adenylate kinases. *Biochemistry* 29: 7440-7450.
- Roderer, D.** (2009). Die Suche nach Interaktionspartnern des uncharakterisierten *E. coli*-Proteins YbiB. Diplomarbeit Universität Regensburg.
- Roland, K. L., M. H. Smith, J. A. Rupley and J. W. Little** (1992). In vitro analysis of mutant LexA proteins with an increased rate of specific cleavage. *J Mol Biol* 228: 395-408.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Saloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saito, N., M. Robert, H. Kochi, G. Matsuo, Y. Kakazu, T. Soga and M. Tomita** (2009). Metabolite profiling reveals YihU as a novel hydroxybutyrate dehydrogenase for alternative succinic semialdehyde metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 284: 16442-16451.
- Sambrook, J., E. E. Frisch and T. Maniatis**, Eds. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbour, New York*.
- Sawitzke, J. A., L. C. Thomason, N. Costantino, M. Bubunenko, S. Datta and D. L. Court** (2007). Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol* 421: 171-199.
- Scapin, G., D. H. Ozturk, C. Grubmeyer and J. C. Sacchettini** (1995). The crystal structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and alpha-D-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemistry* 34: 10744-10754.
- Schlee, S., M. Deuss, M. Bruning, A. Ivens, T. Schwab, N. Hellmann, O. Mayans and R. Sterner** (2009). Activation of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* by removal of magnesium inhibition and acceleration of product release. *Biochemistry* 48: 5199-5209.
- Schmid, F.**, Ed. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Proofs of Protein structure: A practical approach*, *T. E. Creighton, (Oxford: IRL Press)*: 259-295.

- Schneider, D.** (2007). Charakterisierung von YbiB einer putativen Phosphoribosyltransferase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit Universität Regensburg.
- Schumacher, M. A., C. J. Bashor, M. H. Song, K. Otsu, S. Zhu, R. J. Parry, B. Ullman and R. G. Brennan** (2002). The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 78-83.
- Schwab, T.** (2010). Zusammenhang zwischen Quartärstruktur, Stabilität und katalytische Aktivität am Beispiel der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase. Dissertation Universität Regensburg.
- Schwab, T., D. Skegro, O. Mayans and R. Sterner** (2008). A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable. *J Mol Biol* 376: 506-516.
- Sharp, P. A., B. Sugden and J. Sambrook** (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
- Silhavy, T. J. and J. R. Beckwith** (1985). Uses of lac fusions for the study of biological problems. *Microbiol Rev* 49: 398-418.
- Song, L., C. Kalyanaraman, A. A. Fedorov, E. V. Fedorov, M. E. Glasner, S. Brown, H. J. Imker, P. C. Babbitt, S. C. Almo, M. P. Jacobson and J. A. Gerlt** (2007). Prediction and assignment of function for a divergent N-succinyl amino acid racemase. *Nat Chem Biol* 3: 486-491.
- Stutz, C.** (2007). The crystal structure of ecYbiB - Insights into the evolution of novel protein functions. Masterarbeit Biozentrum Basel.
- Sutton, M. D., B. T. Smith, V. G. Godoy and G. C. Walker** (2000). The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet* 34: 479-497.
- Tang, M., P. Pham, X. Shen, J. S. Taylor, M. O'Donnell, R. Woodgate and M. F. Goodman** (2000). Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature* 404: 1014-1018.

- Tomasz, M., R. Lipman, D. Chowdary, J. Pawlak, G. L. Verdine and K. Nakanishi** (1987). Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* 235: 1204-1208.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
- Tuerk, C. and L. Gold** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510.
- Ueda, K. and T. Komano** (1984). Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl)mitomycin C. *Nucleic Acids Res* 12: 6673-6683.
- Van Dyk, T. K., E. J. DeRose and G. E. Gonye** (2001). LuxArray, a high-density, genomewide transcription analysis of *Escherichia coli* using bioluminescent reporter strains. *J Bacteriol* 183: 5496-5505.
- Voloshin, O. N., F. Vanevski, P. P. Khil and R. D. Camerini-Otero** (2003). Characterization of the DNA damage-inducible helicase DinG from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278: 28284-28293.
- Wade, J. T. and K. Struhl** (2004). Association of RNA polymerase with transcribed regions in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17777-17782.
- Walter, M. R., W. J. Cook, L. B. Cole, S. A. Short, G. W. Koszalka, T. A. Krenitsky and S. E. Ealick** (1990). Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem* 265: 14016-14022.
- Wang, L. and P. G. Schultz** (2001). A general approach for the generation of orthogonal tRNAs. *Chem Biol* 8: 883-890.
- Weng, M. W., Y. Zheng, V. P. Jasti, E. Champeil, M. Tomasz, Y. Wang, A. K. Basu and M. S. Tang** (2010). Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. *Nucleic Acids Res* 38: 6976-6984.
- Yanofsky, C., Ed.** (1999). The Trp Operon *Encyclopedia of Molecular Biology*, Creighton, New York 4: 2676-2689.

- Young, T. S., I. Ahmad, J. A. Yin and P. G. Schultz** (2010). An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. *J Mol Biol* 395: 361-374.
- Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and D. L. Court** (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5978-5983.
- Zellner, H.** (2011). PresCont: Vorhersage von Protein-Protein Interaktionsflächen unter Verwendung struktureller und evolutionärer Eigenschaften. Dissertation Universität Regensburg.
- Zharkov, D. O. and A. P. Grollman** (2005). The DNA trackwalkers: principles of lesion search and recognition by DNA glycosylases. *Mutat Res* 577: 24-54.

7 Anhang

7.1 Bindungsstudien von YbiB-Varianten mit einem 12b dT-Oligonukleotid durch SPR

Zur Untersuchung der Affinität von verschiedenen YbiB-Alaninvarianten wurde neben der Fluoreszenzspektroskopie auch die Oberflächenplasmonresonanz verwendet. Die gemessenen Sensogramme für den YbiB-Wildtyp und der Variante Y207A finden sich im Ergebnisteil (Abbildung 4.16). Die Daten für die anderen Proteine sind in Abbildung 7.1 gezeigt.

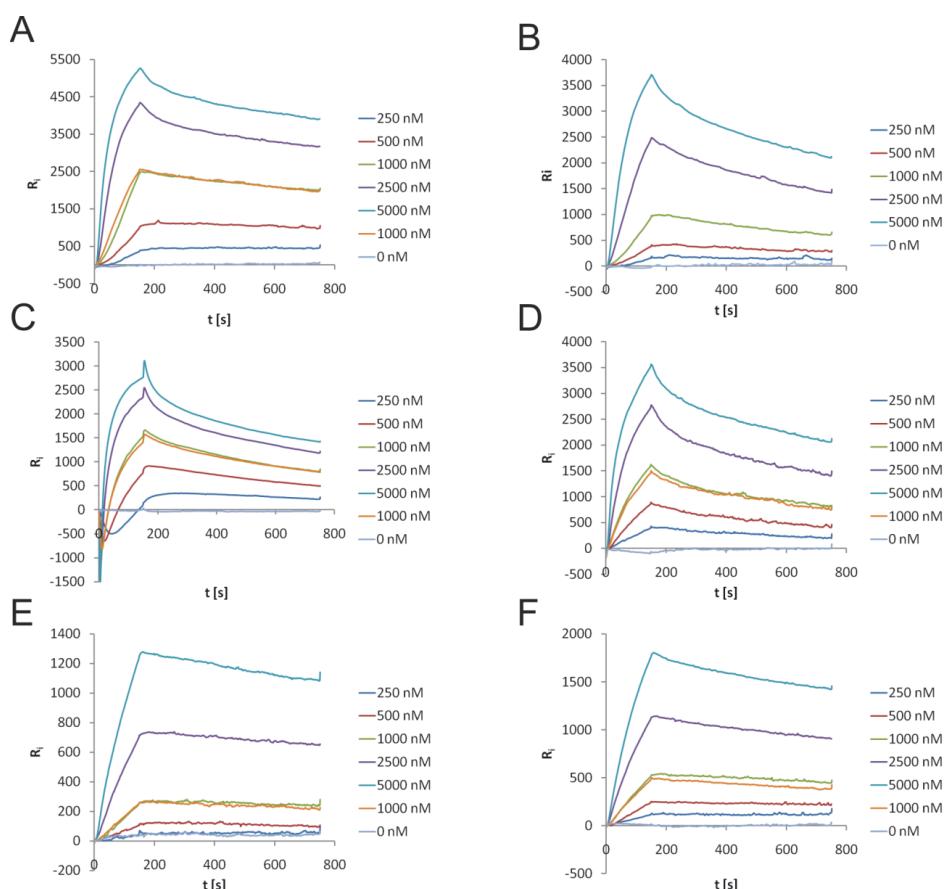


Abbildung 7.1: Analyse der Bindungseigenschaften von YbiB E54A (A), E58A (B), H204A (C), L224A (D), E229A (E) und E231A (F) an ein 12 b dT-Oligonukleotid mit SPR. Die gemessene Signaländerung (ΔR_i) ist gegen die Zeit aufgetragen. Bei allen Proteinen wurde die Bindung an das immobilisierte Oligonukleotid jeweils mit den angegebenen Konzentrationen getestet. Die Assoziationsphase wurde jeweils 180 s verfolgt. Die, durch Zugabe von Puffer induzierte, Dissoziation wurde anschließend 600 s gemessen. Für alle Proteine, bis auf YbiB E229A und E231A wurde anhand der Sensogramme die Geschwindigkeitskonstante k_d der Dissoziation ermittelt (Tabelle 4.4).

7.2 HPLC-Analyse von Standardnukleosiden

Um die mittels *in vivo* Formaldehyd *crosslink* an YbiB und DeoA gebundenen Nukleinsäuren (4.4.3) nach Verdau in Nukleoside anhand ihrer Retentionszeiten identifizieren zu können, wurden als Referenzläufe mit den verwendeten HPLC-Säulen Standardnukleoside getrennt.

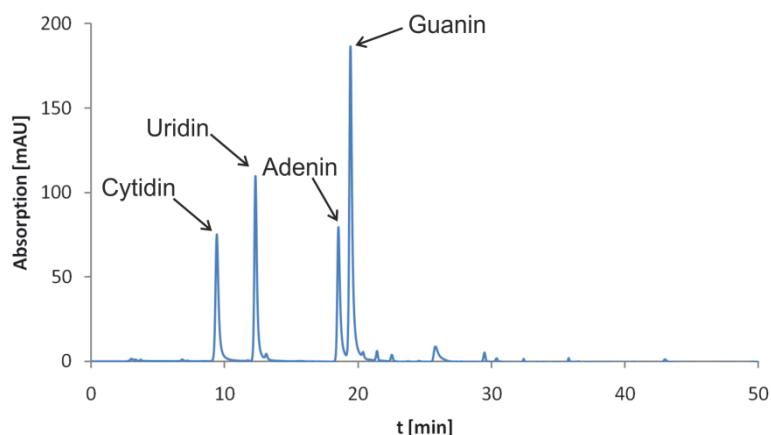


Abbildung 7.2: HPLC-Analyse der vier natürlich vorkommenden Ribonukleoside auf einer BISCHOFF Kromasil100 C18 5 µm, 250 x 4 mm Säule. Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm verfolgt.

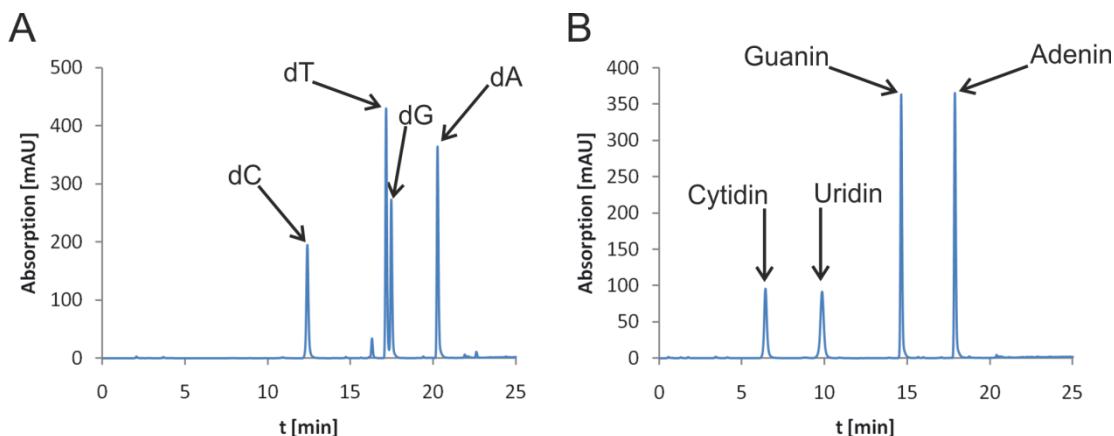


Abbildung 7.3: HPLC-Analyse der vier natürlich vorkommenden Desoxyribonukleoside (A) und Ribonukleoside (B) auf einer PHENOMENEX LunaPFP 3 µm, 150 x 3 mm Säule. Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm verfolgt.

7.3 Wachstumsanalyse verschiedener *E. coli* DM49-Varianten

Nachdem durch die Expression von *ybiB* in DM49-Zellen eine verbesserte Resistenz gegenüber MMC gefunden werden konnte (4.4.4), sollte der Einfluss des Austauschs verschiedener konservierter Resten der TrpD2-Gruppe zu Alaninen auf diesen Effekt

untersucht werden. Dazu wurden die entsprechenden Varianten auf dem pTNA-Plasmid in die DM49-Zellen gebracht, diese Stämme mit MMC inkubiert und Wachstumskurven gemessen. Zur Abschätzung ihrer relativen Fitness wurde ihr Wachstum mit den DM49 pTNA_ybiB- und den DM49 pTNA_deoA-Zellen verglichen (Tabelle 4.5).

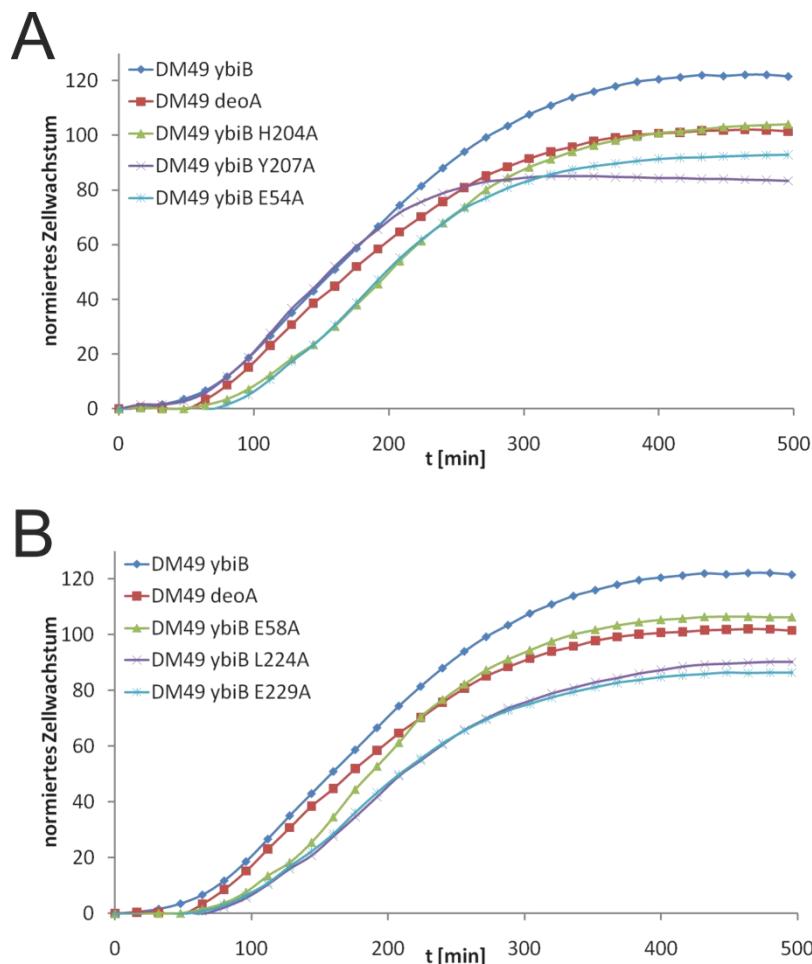


Abbildung 7.4: Wachstumsanalyse von *E. coli* DM49-Zellen mit verschiedenen *ybiB*-Varianten und Kontrollen unter Zusatz von Mitomycin C. Das Wachstum der Stämme wurde über 500 min unter Zusatz von 0,2 µg/ml MMC durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt und anschließend die finale Zahl der DM49 pTNA_deoA-Zellen normiert. Das so ermittelte relative Zellwachstum jeder Variante ist gegen die Zeit aufgetragen. Zur besseren Übersichtlichkeit werden hier jeweils in (A) und (B) drei verschiedene YbiB-Varianten zusammen mit den beiden Kontrollen, YbiB und DeoA, gezeigt. Die Daten für jeden Stamm sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für das interessante Thema und das in mich gesetzte Vertrauen, dieses selbstständig zu bearbeiten. Weiterhin bedanke ich mich für seine Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Tagungen und Seminaren.

Bei meinem direkten Betreuer, Dr. Patrick Babinger, möchte ich mich für die Möglichkeit ein Projekt von Beginn an entwickeln zu können und die äußerst interessante Arbeit bei der Etablierung eines neuen Forschungsgebietes an unserem Lehrstuhl bedanken. Ich danke ihm auch für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion, seine ausgezeichnete fachliche Unterstützung und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Die gemeinsamen Ausflüge in die Berge zum Klettern, Wandern oder Skitouren Gehen werden mit stets in guter Erinnerung bleiben.

Bei PD Dr. Winfried Hausner möchte ich mich für die hilfreichen Gespräche über Nukleinsäuren-bindende Proteine, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Dr. Herbert Tschochner danke ich für die Übernahme des Amtes als Drittprüfer.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Kooperationspartnern, die durch ihre Begeisterung für mein Projekt und ihre Expertise einen großen Beitrag für meine Arbeit geleistet haben. Prof. Dr. Olga Mayans möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Röntgenstrukturanalyse von YbiB danken und die enormen, leider erfolglosen, Anstrengungen, die sie und ihre Arbeitsgruppe bei der Co-Kristallisation von YbiB mit gebundener DNA unternommen haben, würdigen. Bei Prof. Claus Urbanke bedanke ich mich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationsläufe. Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Dr. Astrid Bruckmann und Eduard Hochmuth danke ich für die Durchführung und Auswertung der vergleichenden Proteomanalysen und zahlreicher weiterer massenspektrometrischer Untersuchungen. Außerdem möchte ich mich für die netten und unterhaltsamen Gespräche, auch abseits der Wissenschaft, bedanken. Ein besonders großer Dank gilt Prof. Dr. Günter Mayer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die gezeigten SELEX-Experimente durchführen zu können. Dieser Forschungsaufenthalt in Bonn wird mir immer in sehr guter Erinnerung bleiben. Des Weiteren möchte ich mich bei seiner gesamten Arbeitsgruppe, dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Famulok und vor allem bei meinen beiden Laborkollegen Benjamin Weiche und Dr. Björn Niebl für die tolle Zeit bedanken. Bernhard Wulffen danke ich

weiterhin für seine ausgezeichnete und geduldige Einführung in das praktische Vorgehen bei der Selektion von Aptameren.

Besonders möchte ich mich bei Sonja Fuchs für ihre ständige Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz bedanken, was mir den Laboralltag enorm erleichtert hat. Bei Christiane Endres, Barbara Kellerer, Hermine Reisner und Jeannette Ueckert möchte ich mich auch sehr herzlich für die vielen kleinen und großen Hilfestellungen im Labor bedanken.

Bei meinen ehemaligen Praktikanten und Bachelorstudenten Barbara Beer, Anke Behr, Andreas Geißner, Martin Ostermaier, Alina Röhl und Josef Sperl, sowie meinen Diplomanden und Masterstudenten Anke Behr, Alexandra Holinski und Daniel Roderer möchte ich mich an dieser Stelle für ihren großen Einsatz und die geleistete Arbeit danken.

Bei meinen ehemaligen Schrebraumkollegen Dr. Alexander Ehrmann und Dr. Harald Guldan möchte ich mich für das freundschaftliche und sehr produktive Arbeitsklima bedanken. Neben vielen sehr unterhaltsamen fachfremden Diskussionen war ihr wissenschaftlicher Rat oft von sehr großem Wert. Ihr beide habt deutlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Dr. Felix List, Dr. Tobias Seitz, David Peterhoff, Bernd Reisinger und Josef Sperl danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die intensiven Gespräche über experimentelle Probleme, die daraus resultierenden Lösungsvorschläge und das freundschaftliche Verhältnis inner- und außerhalb des Labors.

Für eine hilfsbereite und stets angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei Barbara Beer, Dietmar Birzer, Florian Busch, Linn Carstensen, Dr. Jörg Claren, Dr. Susanne Dietrich, Dr. Helmut Durchschlag, Alexandra Holinski, Oliver Janda, Monika Meier, PD Dr. Rainer Merkl, Claudia Pauer, Dr. Bettina Rohweder, Dr. Sandra Schlee, Dr. Heike Stüer, Dr. Thomas Schwab, Klaus Tiefenbach, Dr. Hermann Zellner und allen Ehemaligen, die hier nicht genannt sind, bedanken.

Allen Mitgliedern der AG Sterner Kickerrunde nochmals einen extra-Dank für das spannende und lustige Freizeitprogramm nach dem Mittagessen.

Bei Claudia, Florian, Matthias, Sabine und Tom möchte mich noch für die langjährige Freundschaft, ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums, der Promotion und in allen Lebenslagen und schließlich dafür, dass sie mir das alles erst ermöglicht haben.

Ganz besonders danke ich Lena für ihre Unterstützung, ihre Geduld und die liebevolle Aufmunterung während der letzten vier Jahre.

Eidestattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen –, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen und Tagungsbeiträgen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden.

Regensburg, den 09.09.2011

Daniel Schneider

Tagungsbeiträge

Vorträge

*Structure seeks function: the case of *E. coli* YbiB, a member of the TrpD2 family.*

3rd Symposium of RZBB, Kostenz 10/2007

*YbiB from *Escherichia coli*, a nucleic acid binding protein of unknown function.*

5th Symposium of RZBB, Kostenz, 09/2009

The TrpD2 protein family, a novel class of DNA repair enzymes?

7th Symposium of RZBB, Kostenz, 09/2011

Poster

Schneider D., Stutz C., Mayans O. & Babinger P.

*Functional characterization of *E. coli* YbiB: a potential nucleic acids repair protein under stress conditions.*

First International Symposium on Structural Systems Biology, Hamburg, 09/2009