

BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES YBIB-PROTEINS
AUS *ESCHERICHIA COLI* UND DESSEN IDENTIFIZIERUNG ALS
NUKLEOTIDPYROPHOSPHATASE



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Wolfgang Kaiser

aus Deggendorf

Regensburg, 2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 05. April 2017

Diese Arbeit wurde eingeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner

.....
(Wolfgang Kaiser)

*ES IST BESSER, EIN EINZIGES KLEINES LICHT ANZUZÜNDEN, ALS DIE DUNKELHEIT
ZU VERFLUCHEN.*

Konfuzius, 551 - 479 v. Chr.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2013 bis April 2017 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLEN	VI
FORMELN	VII
ABKÜRZUNGEN.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT.....	3
1. EINLEITUNG.....	5
1.1 ENTSTEHUNG NEUER PROTEINFUNKTIONEN	5
1.2 DIE VERWANDTSCHAFT DER TRPD-, NP-II- UND TRPD2-PROTEINFAMILIEN	7
1.3 DNA-REPARATUR-MECHANISMEN IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
2. MATERIAL.....	18
2.1 CHEMIKALIEN	18
2.2 KITS	18
2.3 ENZYME	19
2.4 KRISTALLISATION.....	19
2.5 BAKTERIENSTÄMME.....	20
2.6 PLASMIDE.....	21
2.7 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.....	23
2.7.1 Oligodesoxyribonukleotide für molekularbiologische Arbeiten.....	23
2.7.2 Oligodesoxyribonukleotide für analytische Zwecke	25
2.8 MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	27
2.8.1 Molekularbiologisches Arbeiten	27
2.8.2 Mikrobiologische Arbeiten mit <i>E. coli</i>	28
2.8.3 Arbeiten mit Proteinen	29
2.8.4 Native und denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese	30
2.8.5 Lösungen für Silberfärbung	32
2.9 SOFTWARE.....	32

3. METHODEN	33
3.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.1.1 <i>Vorbereitung von Geräten und Lösungen</i>	33
3.1.2 <i>Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>-Stämmen.....</i>	33
3.1.3 <i>Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen</i>	33
3.1.4 <i>Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i>-Zellen</i>	34
3.1.5 <i>In vivo Bestimmung der Mutationsrate eines <i>E. coli</i>-Stammes.....</i>	34
3.1.6 <i>Entsorgung von Mikroorganismen.....</i>	36
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36
3.2.1 <i>Bestimmung der DNA-Konzentration.....</i>	36
3.2.2 <i>Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR</i>	36
3.2.3 <i>Kolonie-PCR im Fall von Deletionsstämmen.....</i>	37
3.2.4 <i>Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>.....</i>	37
3.2.5 <i>Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	38
3.2.6 <i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	38
3.2.7 <i>Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen</i>	38
3.2.8 <i>Ligation von DNA-Fragmenten.....</i>	39
3.2.9 <i>Extraktion von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen</i>	39
3.2.10 <i>Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....</i>	39
3.2.11 <i>DNA-Sequenzierung</i>	40
3.2.12 <i>Zielgerichtete Mutagenese mittels QuikChange</i>	40
3.2.13 <i>Modifizierung des <i>E. coli</i>-Genoms durch homologe Rekombination</i>	42
3.2.14 <i>Modifizierung plasmidischer DNA mittels homologer Rekombination</i>	44
3.2.15 <i>Gentransfer mittels P1-Transduktion.....</i>	46
3.2.16 <i>Hybridisierung von Oligonukleotiden.....</i>	48
3.2.17 <i>³²P-Markierung kurzer Nukleinsäuren.....</i>	49
3.2.18 <i>Herstellung und Reinigung oxidiertener Nukleoside und Nukleotiden</i>	51
3.2.19 <i>Herstellung von N7-Formyl-N7-Methyl-dGTP</i>	52
3.3 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	53
3.3.1 <i>Expression von Proteinen im analytischen Maßstab</i>	53
3.3.2 <i>Präparative Expression von <i>ybiB</i>, seinen Varianten, <i>alkA</i>, <i>mug</i>, <i>mutT</i> und <i>deoA</i>..</i>	53
3.3.3 <i>Präparative Expression einer <i>YbiB</i>-Variante unter Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure para-Benzoyl-L-phenylalanin (<i>pBPA</i>)</i>	56

3.3.4	<i>Photoinduzierte Quervernetzung einiger YbiB-Varianten mit Nukleinsäuren über pBPA</i>	59
3.3.5	<i>Metallchelataffinitätschromatographie</i>	60
3.3.6	<i>Ionenaustauschchromatographie</i>	61
3.3.7	<i>Größenausschlusschromatographie</i>	62
3.3.8	<i>Kristallisationsansätze</i>	63
3.3.9	<i>Maleimid vermittelte Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine</i>	65
3.3.10	<i>Dialyse von Proteinlösungen</i>	65
3.3.11	<i>Einkonzentrieren von Proteinlösungen</i>	66
3.3.12	<i>Lagerung gereinigter Proteine</i>	66
3.4	ANALYTISCHE METHODEN	66
3.4.1	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie</i>	66
3.4.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	67
3.4.3	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	68
3.4.4	<i>Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue G250</i>	68
3.4.5	<i>Silberfärbung von SDS-Gelen</i>	68
3.4.6	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	69
3.4.7	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	70
3.4.8	<i>Förster Resonanzenergietransfer (FRET)</i>	72
3.4.9	<i>Fluoreszenzpolarisation</i>	75
3.4.10	<i>High performance liquid chromatography (HPLC)</i>	77
3.4.11	<i>In vitro-Aufklärung einer potentiellen DNA-Glykosylaseaktivität</i>	79
3.4.12	<i>In vitro Aufklärung und Charakterisierung einer potentiellen Nukleosidphosphorylase- beziehungsweise Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität</i>	81
3.4.13	<i>Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)</i>	83
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	85
4.1	UNTERSUCHUNG DER NUKLEINSÄUREBINDUNG UND DEREN AUSWIRKUNG AUF DIE YBI_B-STRUKTUR	85
4.1.1	<i>Bindung von YbiB-Wildtyp und einiger YbiB-Varianten an verschiedene Nukleinsäuren</i>	85
4.1.2	<i>Bindung von YbiB-Wildtyp an modifizierte Nukleinsäuren</i>	94
4.1.3	<i>Untersuchung der strukturellen Dynamik im Zuge der Nukleinsäurebindung</i>	102
4.1.4	<i>Weiterführende Strukturaufklärung des YbiB-DNA-Komplexes unter Verwendung der nichtnatürlichen Aminosäure para-Benzoyl-L-phenylalanin</i>	106
4.2	AUFKLÄRUNG EINER POTENTIELLEN DNA-GLYKOSYLASEAKTIVITÄT	114
4.2.1	<i>Untersuchung der Aktivität gegenüber methylierten Nukleobasen</i>	115

4.2.2 Untersuchung der Aktivität gegenüber oxidierten und mittels Methoxsalen quervernetzten Nukleobasen	118
4.3 IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER NUKLEOTID-PYROPHOSPHATASE-AKTIVITÄT.....	123
4.3.1 Aktivität gegenüber oxidierten Nukleotiden und Nukleosiden	123
4.3.2 Charakterisierung der Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Wildtyps .	128
4.3.3 Untersuchung der Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Wildtyps <i>in vivo</i> ..	135
.....	
4.3.4 Bindung verschiedener Nukleotide an YbiB.....	139
5. ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK.....	144
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	154
7. ANHANG	166
7.1 Einfluss der Ionenstärke auf die Nukleinsäurebindung des YbiB-Wildtyps	166
7.2 Kristallisations-Screens: optimierte Bedingungen.....	166
7.3 Schematischer Input-Befehl für Dynafit.....	169
7.4 Kristall-Daten der neuen YbiB-Apostruktur	170
7.5 Quantifizierung von 8-Oxo-dGTP mittels HPLC-Analytik	171
7.6 Bindung von YbiB an kurze Nukleinsäuren in Anwesenheit von DNTPs.....	172
8. DANKSAGUNG	173
9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	175
10. TAGUNGSBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN	176

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Mechanismus zur Entstehung neuer Gene.	7
Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau der TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteine.....	8
Abbildung 1.3: Bänderdarstellung von TrpD2 aus <i>E. coli</i>	8
Abbildung 1.4: Reaktionen der Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) und der Nukleosid-phosphorylasen der Klasse II (NP-II).	10
Abbildung 1.5: Arbeitshypothesen für die vom <i>E. coli</i> TrpD2-Protein YbiB katalysierte Reaktion.	11
Abbildung 1.6: Grundkonzept von DNA-Reparaturstrategien.....	13
Abbildung 1.7: Regulation der SOS-Antwort in <i>E. coli</i> durch die beiden Proteine LexA und RecA.	16
.....	
Abbildung 3.1: Schematischer Verlauf der zielgerichteten QuikChange Mutagenese.....	41
Abbildung 3.2: Erzeugung eines <i>E. coli</i> -Deletionsstammes mittels λ-Red-Rekombinasesystem. .	42
Abbildung 3.3: Modifizierung plasmidischer DNA mittels homologer Rekombination.....	44
Abbildung 3.4: Übertragung genomischer Modifikationen mittels P1-Transduktion.	47

Abbildung 3.5: Prinzip des Einbaus einer nichtnatürlichen Aminosäure <i>in vivo</i>	57
Abbildung 3.6: Reaktionsmechanismus der photoinduzierten Quervernetzung durch <i>pBPA</i>	59
Abbildung 4.1: Oberflächenladungsverteilung und Beitrag beider Protomere zur Bindetasche. .	86
Abbildung 4.2: Einfluss der YbiB-Dimerisierung auf die Affinität und Stöchiometrie der Nukleinsäurebindung.	89
Abbildung 4.3: Bindung einzel- und doppelsträngiger DNA an den YbiB-Wildtyp.....	90
Abbildung 4.4: Mittels EMSA beobachtete Bindung von YbiB-Wildtyp an verschiedene einzel- und doppelsträngige DNA-Sonden.....	91
Abbildung 4.5: Vergleich zwischen abasischer Position und dSpacer-Analogon.	95
Abbildung 4.6: Bindung verschiedener YbiB-Varianten an DNA-Sonden unter Anwesenheit einer AP-site oder Fehlpaarung.	96
Abbildung 4.7: YbiB-Wildtyp Affinität gegenüber einer DNA mit AP-site.	98
Abbildung 4.8: YbiB-Wildtyp Bindung an verschiedene 22bp dsDNA-Sonden.	99
Abbildung 4.9: Grafische Darstellung der K_{D1} - und K_{D2} -Werte der Bindung von YbiB-Wildtyp an 22bp dsDNA-Sonden mit und ohne AP-site.	101
Abbildung 4.10: Lokalisation der potentiellen Nukleinsäurebindetasche, der flexiblen Schlaufen und Position aller Donor- und Akzeptor-Moleküle des FRET-Systems.	104
Abbildung 4.11: Erzeugung und Reinigung eines kovalenten YbiB <i>pBPA</i> -DNA-Komplexes.	108
Abbildung 4.12: Einfluss der <i>pBPA</i> -Position auf die Kopplungseffizienz.....	109
Abbildung 4.13: Isolierung des kovalenten YbiB H2O4 <i>pBPA</i> x 20b poly(dT)-Komplexes.	110
Abbildung 4.14: Optimierung der Kristallisationsbedingungen basierend auf dem Morpheus MD1-46 Kristallisations- <i>Screen</i> von Molekular Dimensions.	111
Abbildung 4.15: Neue YbiB-Apostruktur.	112
Abbildung 4.16: Eingrenzung der Nukleinsäurebindetasche mittels <i>pBPA</i> -vermittelter kovalenter Komplexbildung.....	113
Abbildung 4.17: Prinzip der Identifizierung einer DNA-Glykosylaseaktivität im Kontext methylierter DNA-Schäden.	116
Abbildung 4.18: Elutionsprofile aller DNA-Glykosylase-Reaktionsansätze.	117
Abbildung 4.19: Prinzip des <i>Nicking Assays</i>	120
Abbildung 4.20: Zusammenfassung aller mittels <i>Nicking Assay</i> untersuchten DNA-Schäden. ...	121
Abbildung 4.21: HPLC-Analytik der phosphorolytischen Spaltung von Thymidin durch DeoA....	124
Abbildung 4.22: Ausgewählte HPLC-Elutionsprofile der mit YbiB-Wildtyp inkubierten Nukleoside und Nukleotide.....	125
Abbildung 4.23: Graphische Zusammenfassung aller mittels HPLC-Analytik untersuchter Reaktions-ansätze der verschiedenen Nukleoside/Nukleotide nach Inkubation mit YbiB-Wildtyp.	126
Abbildung 4.24: HPLC-Elutionsprofile von oxidativ geschädigtem dGTP nach Inkubation mit YbiB, DeoA und MutT.	127
Abbildung 4.25: Inkubation von oxidiertem dGDP und dGTP mit YbiB-Wildtyp.....	128
Abbildung 4.26: Promiskuität des <i>E. coli</i> MutT-Proteins gegenüber Nukleosidtriphosphaten. ..	129
Abbildung 4.27: Getestete potentielle Substrate von YbiB.....	130
Abbildung 4.28: Umsatz der Reinsubstanzen 8-Oxo-GTP und 8-Oxo-dGTP durch YbiB.	131
Abbildung 4.29: Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins bei Anwesenheit verschiedener divalerter Kationen.	132
Abbildung 4.30: Die pH-Abhängigkeit der YbiB-Wildtyp Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität. .	133

Abbildung 4.31: Michaelis-Menten-Kurve von YbiB-Wildtyp bezüglich des Substrates 8-Oxo-dGTP.....	134
Abbildung 4.32: Schematisches Vorgehen zur Bestimmung der Mutationsfrequenz.....	136
Abbildung 4.33: Mittlere Mutationsfrequenzen der <i>in vivo</i> -Experimente.....	138
Abbildung 4.34: Thermogramme der Bindung von dGTP und dCTP an den YbiB-Wildtyp.....	139
Abbildung 4.35: Kompetitive Bindungsexperimente mit dNTPs und dNMPs.....	141
Abbildung 5.1: Verschiedene Modelle der Bindung von YbiB-Wildtyp an eine abasische Position.	145
Abbildung 5.2: Mutagene Wirkung der oxidierten Guanin-Variante 8-Oxo-Guanin.....	148
Abbildung 5.3: RppH induzierte mRNA-Degradation in <i>Escherichia coli</i>	152
Abbildung 7.1: Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung des YbiB-Proteins an einzelsträngige DNA.	166
Abbildung 7.2: 8-Oxo-dGTP Eichgerade und eine exemplarische Umsatzkurve.	171
Abbildung 7.3: Einfluss der dNTPs auf die Bindung von YbiB an kurze Nukleinsäuren.	172

TABELLEN

Tabelle 2.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.	20
Tabelle 2.2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	21
Tabelle 2.3: Oligodesoxyribonukleotide für molekularbiologische Arbeiten	23
Tabelle 2.4: Für die Herstellung der EMSA-Sonden verwendete Primer und Oligonukleotide....	25
Tabelle 2.5: In Co-Kristallisationsexperimenten verwendete Oligonukleotide.	25
Tabelle 2.6: Anisotropie Sonden mit Dansyl-Fluorophor.....	25
Tabelle 2.7: Anisotropie Sonden mit Chromis 500N-Fluorophor.	26
Tabelle 2.8: Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA-Substraten für <i>Nicking Assays</i>	26
Tabelle 2.9: Oligonukleotide für dsDNA-Sonden.	26
Tabelle 3.1: Reinigungs- und Elutionsprofil zur Isolierung oxidierter Nukleotide mittels Ionenaustausch-chromatographie im <i>gravity flow</i> Verfahren.	52
Tabelle 3.2: Übersicht der Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit gereinigten Proteine...	54
Tabelle 3.3: Bedingungen zur Ionenaustauschchromatographie.....	62
Tabelle 3.4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Analytik Methoden.....	79
Tabelle 3.5: Übersicht der eingestellten Messbereiche des Szintillationszählers.	80
Tabelle 3.6: Reaktionsbedingungen zur Charakterisierung der 8-Oxo-dGTP Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität von YbiB-Wildtyp.....	82
Tabelle 4.1: Mittels Fluoreszenztitration bestimmte K_D -Werte verschiedener YbiB-Varianten und Nukleinsäuren.	87
Tabelle 4.2: Mittels Fluoreszenztitration bestimmte Stöchiometrie der YbiB-Nukleinsäure-Komplexe.	88
Tabelle 4.3: Vergleich der K_D -Werte und Stöchiometrien zwischen ssDNA und dsDNA.	90
Tabelle 4.4: Durch EMSA ermittelte Parameter der Bindung von YbiB-Wildtyp an ssDNA- und dsDNA-Sonden.	92

Tabelle 4.5: Liste der aus den Fluoreszenzpolarisationskurven bestimmten K_{D1} - und K_{D2} -Werte.	101
Tabelle 4.6: FRET-Effizienzen, Quantenausbeuten, Försterradien und relativer Distanzen aller mittels FRET untersuchten YbiB-Varianten in Ab- und Anwesenheit von 12bp dsDNA-Fragmenten.	105
Tabelle 4.7: Bestimmung der Mutationsfrequenz (f) in An- und Abwesenheit von YbiB.	137
Tabelle 4.8: Mittels ITC bestimmten Stöchiometrien (N), K_D -Werte und ΔH_s .	139
Tabelle 4.9: Apparente K_D -Werte der Bindung von YbiB-Wildtyp an ein 12bp dsDNA-Fragment in Ab- und Anwesenheit eines der vier kanonischen dNTPs.	140
Tabelle 4.10: Mittels kompetitiver Bindungsexperimente bestimmte K_D -Werte	142
Tabelle 7.1: Optimierung MIDAS TM Bedingung D5	166
Tabelle 7.2: Optimierung Morpheus Bedingung G4(1)	167
Tabelle 7.3: Optimierung Morpheus Bedingung G4(2)	167
Tabelle 7.4: Optimierung MIDAS TM Bedingung C2	168
Tabelle 7.5: Optimierung MIDAS TM Bedingung D8	168

FORMELN

Gleichung 3.1: Definition der Mutationsfrequenz f	36
Gleichung 3.2: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280}	66
Gleichung 3.3: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0.1\%} A_{280}$	66
Gleichung 3.4: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0.1\%} A_{280}$	67
Gleichung 3.5: Berechnung der Proteinkonzentration c [mg/ml] nach Bradford.	68
Gleichung 3.6: Hill-Gleichung zur Bestimmung der Affinität zweier Interaktionspartner zueinander.	70
Gleichung 3.7: Gleichung zur Bestimmung des Hill-Koeffizienten im Übergangsbereich.	70
Gleichung 3.8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der Konzentration beider Interaktionspartner.	71
Gleichung 3.9: Berechnung der Effizienz (E) des Energietransfers.	72
Gleichung 3.10: Abhängigkeit der Effizienz (E) vom Abstand (r) zwischen Donor und Akzeptor.	72
Gleichung 3.11: Gleichung zur Berechnung von R_0 .	72
Gleichung 3.12: Bestimmung der Quantenausbeute eines Fluorophors (D) mittels Referenzsubstanzen (st).	73
Gleichung 3.13: Vereinfachung von Gleichung 3.12 unter der Annahme, dass beide Fluorophore in identischen Puffer-Systemen vorliegen.	73
Gleichung 3.14: Formelle Bestimmung des Überlappungsintegrals $J(\lambda)$.	74
Gleichung 3.15: Vereinfachte Riemann-Summe des Überlappungsintegrals $J(\lambda)$.	74
Gleichung 3.16: Formale Definition der Fluoreszenzpolarisation (P).	75
Gleichung 3.17: Mathematische Beschreibung der kompetitiven Bindung zweier Liganden an eine Bindestelle.	77
Gleichung 3.18: Definition der Konstanten θ , a , b und c aus Gleichung 3.17.	77

Gleichung 3.19: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzym- und Substratkonzentration nach Michealis und Menten.	83
Gleichung 3.20: Thermodynamischer Zusammenhang zwischen ΔG , ΔH , ΔS und K_D	84

ABKÜRZUNGEN

Å	Angström 10^{-10} m
A	Adenin, Absorption oder Ampere
AA	Anthranilat
AlkA	3-Methyl-Adenin-DNA-Glykosylase von <i>Escherichia coli</i>
Amp	Ampecillin
AP-site	abasische Position
APS	Ammoniumperoxodisulfat
b	Base
BER	Basenexzisionsreparatur, <i>base excision repair</i>
Bla	Resistenz gegen β -Laktamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
c	Konzentration
C	Cytosin
Cam	Resistenz gegen Chloramphenicol
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute, <i>counts per minute</i>
CV	Säulenvolumen, <i>column volume</i>
d	Schichtdicke der Küvette
Da	Dalton [g/mol]
DACM	N-7-Dimethylamino-4-Methylcoumarin-3-yl-Maleimid
dfU	5 Formyl-Uridin
dGMP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dN	2'Desoxy-Nukleosid, mit der Base G, A, C und T
dNDP	2'Desoxy-Nukleosiddiphosphat, mit der Base G, A, C und T
dNMP	2'Desoxy-Nukleosidmonophosphat, mit der Base G, A, C und T
dNTP	2'Desoxy-Nukleosidtriphosphat, mit der Base G, A, C und T

dRP-Lyase	5'Desoxyribosephosphat-Lyase
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTg	Thymidylglykol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase von <i>Escherichia coli</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HmU	5 Hydroxymethyl-Uracil
IEC	Ionenaustauschchromatographie, <i>ion exchange chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
Kan	Resistenz gegen Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KP	Kaliumphosphat Puffer
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Mb	Megabasenpaare
MMR	Basenfehlpaarungsreparatur, <i>mismatch repair</i>
MUG	<i>Mismatch/Uracil-DNA-Glykosylase von Escherichia coli</i>
MW	Molekulare Masse
MWCO	molekulare Ausschlussgröße, <i>molecular weight cut-off</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur, <i>nucleotide excision repair</i>
NMU	N-Methyl-N-Nitrosourea
NP-II	Nukleosidphosphorylase der Klasse II
OD _x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
pBPA	<i>para</i> -Benzoyl-L-phenylalanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P _i	Orthophosphat
PP _i	Pyrophosphat
PRA	N-5'-Phosphoribosylanthranilat

PRPP	5'-Phosphoribosyl- α 1-pyrophosphat
Rif	Resistenz gegen Rifampicin
ROI	<i>reactive oxygen intermediates</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie, <i>size exclusion chromatography</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
T_A	<i>annealing</i> -Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	<i>Terrific broth</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TrpD	Antrhanilat-Phosphoribosyltransferase
U	Unit, 1 U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
YbiB	TrpD2-Protein von <i>Escherichia coli</i>
YbiBwt	YbiB-Wildtyp
λ	Wellenlänge

Aminosäuren sind generell im ein-Buchstaben-Format angegeben.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Zuge der Evolution sind viele neue Proteinfunktionen durch Genduplikation und Diversifikation aus gemeinsamen Vorläufern entstanden. Ein gutes Beispiel hierfür ist die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte TrpD2-Proteinfamilie, die homolog zu den Anthranilate-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) und Nukleosidphosphorylasen der Klasse II (NP-II) ist. Neben einer gewissen Übereinstimmung auf Sequenzebene wird die evolutionäre Beziehung der TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteine vor allem anhand ihres gemeinsamen Faltungstyps erkenntlich. Trotz dieser Gemeinsamkeiten katalysieren die Vertreter der drei Proteinfamilien unterschiedliche Reaktionen. So sind die TrpD-Enzyme an der Tryptophan-Biosynthese beteiligt, wohingegen die NP-II-Enzyme eine wichtige Rolle im *pyrimidine salvage pathway* spielen. Die biologische Funktion der TrpD2-Proteine hingegen war zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt. Jedoch deuteten die bereits vorhandenen Daten darauf hin, dass TrpD2 eine Rolle im Kontext der Behebung von DNA-Schäden spielen könnte. Basierend auf dieser Annahme wurden weiterführende Hypothesen bezüglich der Funktion der TrpD2-Proteine aufgestellt, die im Verlauf dieser Arbeit am Beispiel des TrpD2-Vertreters aus *Escherichia coli*, YbiB, überprüft wurden.

Im Hinblick auf eine mögliche Rolle als DNA-Reparaturenzym wurde die bereits beschriebene Interaktion von YbiB mit Nukleinsäuren detaillierter charakterisiert, wobei sowohl strukturell intakte, als auch modifizierte Nukleinsäuren in den Bindungsexperimenten eingesetzt wurden. Die Ergebnisse von *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) und von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass YbiB mit einer hohen Affinität (20 – 100 nM) sowohl einzelsträngige, als auch doppelsträngige Nukleinsäuren vergleichbar gut und ohne Sequenzspezifität bindet. Die Interaktion wird dabei vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäureseitenketten des Proteins und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäure vermittelt. Dies führt im Fall intakter Nukleinsäuren zur Ausbildung eines transienten Komplexes, wobei die Bindung mehrerer YbiB-Proteine an ein und dieselbe Nukleinsäure kooperativ erfolgt (Hill-Koeffizient $n > 1.5$). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Anwesenheit einer abasischen Position in einem doppelsträngigen DNA-Fragment das Bindeverhalten des YbiB-Proteins derart beeinflusst, dass dieses nicht mehr durch einen hyperbolischen Kurvenverlauf beschrieben werden konnte. Die bisher gewonnenen experimentellen Daten können jedoch diesen Befund nicht vollständig erklären, sie deuten weder auf eine signifikant höhere Affinität noch auf eine andere Konformation der YbiB-Tertiärstruktur bei Bindung an DNA mit abasischer Position hin. Es konnte jedoch mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Experimenten beobachtet werden, dass sich generell im Zuge einer Nukleinsäurebindung die Proteinkonformation im Bereich der vorhergesagten

Nukleinsäurebindetasche signifikant verändert. Um die Struktur eines YbiB-DNA-Komplexes mittels Röntgenkristallographie aufzuklären, wurden aufgrund des transienten Bindungsverhaltens das YbiB-Protein und die Nukleinsäure nach erfolgter Komplexbildung miteinander kovalent verknüpft. Dies wurde durch die nichtnatürliche Aminosäure *para*-Benzoyl-L-phenylalanin ermöglicht, welche in die YbiB-Struktur an einer geeigneten Position eingefügt wurde. Zwar konnten ausreichende Mengen des kovalent verknüpften Komplexes hergestellt werden, es gelang jedoch nicht, Kristalle des Komplexes zu züchten. Zumindest konnte jedoch eine gut aufgelöste (1.9 Å) und vor allem vollständige YbiB-Apostruktur einschließlich einer bisher nicht aufgelösten flexiblen Schlaufe gelöst werden.

Unter der Annahme, dass es sich bei YbiB um ein neuartiges DNA-Reparaturenzym handeln könnte, wurde untersucht, ob YbiB eine DNA-Glykosylaseaktivität besitzt. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlich geschädigte Nukleinsäuren *in vitro* hergestellt, diese zusammen mit YbiB bzw. Positivkontrollen inkubiert und anschließend die entstandenen Reaktionsprodukte analysiert. Eine DNA-Glykosylaseaktivität von YbiB gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten DNA-Schäden konnte dabei nicht festgestellt werden, was jedoch eine DNA-Glykosylaseaktivität gegenüber noch nicht getesteten Schäden nicht gänzlich ausschließt.

Alternativ zur DNA-Glykosylase-Hypothese wurde zudem überprüft, ob YbiB gegenüber geschädigten Nukleosiden und Nukleotiden eine Nukleosidphosphorylaseaktivität aufweist. So wurden zunächst verschiedene Nukleoside und Nukleotide oxidativ geschädigt, anschließend mit YbiB inkubiert und die Reaktionsprodukte analysiert. Diese *in vitro*-Experimente zeigten zwar keine Nukleosidphosphorylaseaktivität von YbiB, stattdessen konnte aber eine Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität gegenüber 8-Oxo-dGTP als Substrat identifiziert werden. 8-Oxo-dGTP kann im Verlauf der DNA-Replikation ins Genom integriert werden und dort zu Punktmutationen führen. Zwar besitzt *E. coli* mit der Nudix-Hydrolase MutT bereits ein Enzym, das 8-Oxo-dGTP eliminiert, jedoch kann die Expression von MutT im Gegensatz zu YbiB nicht im Rahmen der SOS-Antwort auf massive DNA-Schäden angehoben werden. Weiterhin ergab die Charakterisierung der Magnesium-abhängigen Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität von YbiB eine wesentlich striktere Substratspezifität als bei MutT. So wurde außer 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP keines der anderen getesteten Nukleosidtriphosphate, insbesondere keines der intakten Nukleosidtriphosphate wie bei MutT, dephosphoryliert. Für das Substrat 8-Oxo-dGTP konnte ein K_M -Wert von 2.9 µM, ein k_{cat} -Wert von $3.7 \cdot 10^3$ min⁻¹ und eine katalytische Effizienz von 21.7 M⁻¹ s⁻¹ bestimmt werden. Trotz der niedrigen katalytischen Effizienz konnte *in vivo* gezeigt werden, dass sich durch die Expression eines plasmidkodierten YbiB-Proteins die Spontanmutationsfrequenz in einem *E. coli* ΔmutT-Stamm signifikant verringert. Es konnte jedoch bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob es sich bei 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP um die einzigen beiden Substrate von YbiB handelt, weshalb weitere geschädigte Nukleosidtriphosphate als eventuell besser umsetzbare Substrate getestet werden müssen.

ABSTRACT

In the course of evolution, gene duplication and diversification led to the emergence of various novel protein functions from common predecessors. This is also true for the TrpD2 protein family, which is homologous to the anthranilate phosphoribosyltransferases (TrpD) and the class II nucleoside phosphorylases (NP-II). In addition to certain sequence similarities the relation of the TrpD, TrpD2 and NP-II proteins is particularly reflected by their common protein fold. Despite their similarities, the members of these three protein families catalyze different reactions. Thus, the TrpD enzymes are part of the tryptophan biosynthesis pathway, whereas the NP-II enzymes are involved in the pyrimidine salvage pathway. In contrast, the biological function of the TrpD2 proteins was not known at the beginning of this work. However, the already available data indicated that TrpD2 presumably plays a role in the context of DNA repair. Based on this assumption, several hypotheses concerning the function of the TrpD2 proteins were put forward and subsequently tested in the course of this work by the examination of the TrpD2 protein form *Escherichia coli* YbiB.

Regarding its putative function as a DNA repair enzyme, the previously described interaction with nucleic acids was further characterized in detail and to this end, the binding of YbiB to unimpaired and modified nucleic acids was analyzed. The results of electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and fluorescence spectroscopic measurements showed, that YbiB binds with high affinity (20 – 100 nM) to single and double stranded nucleic acids in a sequence independent manner. The binding is presumably mediated by electrostatic interactions between positively charged amino acid sidechains and the negatively charged backbone of the nucleic acid. Although this binding behavior leads to the formation of transient YbiB-DNA complexes, the binding of multiple YbiB proteins to the same nucleic acid takes place in a cooperative manner (Hill coefficient $n > 1.5$). In addition, the presence of an abasic site within double stranded DNA influences the binding behavior of the YbiB protein in a way that the binding data could no longer be described by a hyperbolic function. Based on the current data, this observation can neither be explained by a significant increase in affinity nor by conformational changes of the YbiB tertiary structure induced by the binding of a DNA containing an abasic site. However, the results of some Förster resonance energy transfer (FRET) experiments showed that the binding of nucleic acids generally changes the conformation of the putative nucleic acid binding site. In addition, the structure of a YbiB-DNA complex should be solved by X-ray crystallography and therefore, in consideration of the transient binding behavior, the YbiB protein was covalently linked to the nucleic acid after the complex had been formed. The link was established by the unnatural amino acid *para*-benzoyl-L-phenylalanine (*p*BPA), which was incorporated at a suitable position within the YbiB structure. The covalently linked complex could be prepared in sufficient amounts, but in the end it was not possible to obtain a crystal of

the complex. At least a highly resolved (1.9 Å) and, more importantly, a complete YbiB apo structure, which even includes a previously unresolved flexible loop, was solved.

Based on the assumption, that YbiB could be a novel DNA repair enzyme, it was examined, whether YbiB possesses a DNA glycosylase activity. Therefore, *in vitro* damaged nucleic acids were incubated together with YbiB or a positive control and the reaction products were analyzed. A DNA glycosylase activity against any of the damaged nucleic acids used in this work was not observed. However, many DNA damages remain that need to be tested and therefore, the hypothesis of YbiB being a DNA glycosylase cannot be completely excluded.

In addition, it was also examined, whether YbiB possesses a nucleoside phosphorylase activity against damaged nucleosides and nucleotides. Therefore, various nucleosides and nucleotides were damaged by oxidation and incubated with YbiB and the resulting reaction products were analyzed. Although no nucleoside phosphorylase activity was observed in these *in vitro* experiments, a nucleotide pyrophosphatase activity against the substrate 8-Oxo-dGTP could be identified. In the course of DNA replication, 8-Oxo-dGTP can be incorporated into the genome and give rise to point mutations. Although *E. coli* already possesses the Nudix hydrolase MutT to eliminate 8-Oxo-dGTP, the expression of MutT, cannot be induced by the SOS response system on severe DNA damage like YbiB. Furthermore, the characterization of the magnesium dependent nucleotide pyrophosphatase activity revealed, that YbiB has a quite narrow substrate range compared to the MutT protein. Besides 8-Oxo-dGTP and 8-Oxo-GTP, none of the other tested nucleoside triphosphates was dephosphorylated, most notably none of the unimpaired nucleoside triphosphates as in the case for MutT. For the substrate 8-Oxo-dGTP a K_M value of 2.9 μM, a k_{cat} value of $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and a catalytic efficiency of $21.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was determined. Despite the low catalytic efficiency, it was shown *in vivo* that the expression of a plasmid encoded YbiB protein significantly decreases the spontaneous mutation frequency of an *E. coli* ΔmutT strain. Nevertheless, it was not possible to determine whether 8-Oxo-dGTP and 8-Oxo-GTP are indeed the only substrates of the YbiB protein. Therefore, further nucleoside triphosphates need to be tested in the future to define the substrate range of the YbiB protein

1. EINLEITUNG

1.1 ENTSTEHUNG NEUER PROTEINFUNKTIONEN

Im Post-Genom-Zeitalter sind in den größeren Datenbanken wie am NCBI oder EMBL zahlreiche genomische Datensätze hinterlegt. Diese Datensätze sind für gewöhnlich sehr umfangreich, daher ist es notwendig, die Daten weiter aufzubereiten, um ihre spätere Analyse zu erleichtern. So wurden mitunter einige bioinformatische Verfahren entwickelt, die automatisch bestimmte Sequenzmotive erkennen und letztlich entsprechend annotieren. Dabei stellt im Besonderen die Identifizierung offener Leserahmen (ORFs, *Open Reading Frames*) einen Grundbaustein der Sequenzanalyse dar, da es sich hierbei um die Protein-kodierenden Sequenzabschnitte des Genoms handelt. Die Gesamtheit aller ORFs definiert somit das Proteom eines Organismus und demzufolge führt die Identifizierung und Charakterisierung der einzelnen ORFs zu einem besseren Verständnis über die verschiedenen intra- und extrazellulären Vorgänge einer lebenden Zelle. Neu sequenzierte Genome werden daher auf mögliche ORFs abgesucht. Im Anschluss werden identifizierte ORFs für gewöhnlich in die Proteinsequenz übersetzt und anhand ihrer Sequenzähnlichkeit zu anderen bereits bekannten Proteinen annotiert und somit die Genprodukte in eine Proteinfamilie oder Enzymfamilie (EC-Nummer, *Enzyme Commission Number*) eingeordnet (Altschul et al. 1997, Teichmann 2002, Kankainen et al. 2012). Die in der Uniprot-Datenbank vorhandenen Enzyme sind in etwa 3950 verschiedene EC-Nummern unterteilt (Sorokina et al. 2014). Demzufolge existieren nachweislich etwa 3950 verschiedene Enzymfamilien, die sich hinsichtlich Substrat oder Reaktionsmechanismus deutlich voneinander unterscheiden. Angesichts dieser großen Anzahl stellt sich die Frage, wie sich all diese verschiedenen Enzyme im Verlauf der Evolution entwickelt haben.

In der Literatur findet man im Wesentlichen zwei verschiedene Modelle, welche die Entstehung neuer Gene und damit das Auftreten neuer enzymatischer Funktionen beschreiben (Abbildung 1.1). Zum einen kann sich ein nicht kodierender Genomabschnitt durch das Akkumulieren verschiedener spontaner Mutationen über mehrere Generation hinweg zu einem stabilen Gen entwickeln (*de novo*-Entstehung von Genen). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass aus einem bereits etablierten Gen durch Genduplikation und anschließende Diversifizierung des duplizierten Gens ein neuartiges Gen mit anderen Eigenschaften hervorgeht. Die Entstehung neuer Gene aus nicht kodierenden Bereichen wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert, allerdings zeigen neuere Untersuchungen, dass dieser Mechanismus durchaus plausibel ist (Schmitz und Bornberg-Bauer 2017). Als erstes entsteht durch spontane Mutation in einem nicht kodierenden Genomabschnitt sowohl eine ORF-Struktur, als auch ein Transkriptionsstartpunkt,

wobei die Reihenfolge dieser Ereignisse irrelevant ist. Sobald beide Ereignisse eingetreten sind, ist ein stabiles Protogen entstanden. Obwohl es sich bei den Genprodukten dieser Protogene nur um kurze und relativ unstrukturierte Proteine handelt, können diese durchaus für einen Organismus einen gewissen Vorteil bieten. Im Zuge der Evolution kommt es je nach Situation entweder zum Verlust des Protogens oder zur *de novo*-Entstehung eines neuartigen Gens. Die Bildung von Protoprotogenen und deren finale Entwicklung hin zu neuartigen Gensequenzen sind äußerst dynamische Prozesse, weshalb es schwierig ist diese lückenlos und damit einwandfrei nachzuweisen. Es wird jedoch angenommen, dass Gene vermehrt nach diesem Schema entstehen, wenn sich die Lebensbedingungen eines Organismus plötzlich ändern und es notwendig ist, sich an neuartige Umweltbedingungen anzupassen. Diese Annahme wird unter anderem durch die Beobachtung gestützt, dass gerade Gene, die keinerlei Homologie zu anderen Genen aufweisen (*orphan genes*), oft an Prozessen wie der Stressantwort oder der Adaption auf diverse Umwelteinflüsse beteiligt sind (Khalturin et al. 2009, Carvunis et al. 2012).

Neben der *de novo*-Entstehung neuer Gene existiert die Möglichkeit bereits vorhandene Gene so zu verändern, dass diese neuen Eigenschaften erhalten. Die meisten Gene können allerdings nicht ohne Weiteres verändert werden, da sie einem gewissen Selektionsdruck unterliegen und somit ihre eigentliche biologische Funktion nicht verlieren dürfen. Aus diesem Grund muss der Diversifizierung ein Genduplikationereignis vorausgehen, was es zumindest einem der beiden duplizierten Gene gestattet sich zu verändern (Ohno 1970). Letztlich kann dies dazu führen, dass ein vollständig neues Enzym entsteht, welches sich hinsichtlich Substratspektrum und katalytischem Mechanismus deutlich von seinem „evolutionären Geschwister“ unterscheidet. Interessanterweise beobachtet man aber auch, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur verwandter homologer Proteine lange erhalten bleibt und sich deren Strukturen erst bei niedriger Sequenzidentität (< 20%) voneinander signifikant unterscheiden (Chothia und Lesk 1986). Es ist somit möglich, verschiedene enzymatische Funktionen auf ein und demselben Proteingrundgerüst zu etablieren. Demzufolge sind relativ alte Faltungstypen wie das TIM oder $(\beta\alpha)_8$ -Fass (Ma et al. 2008) in sehr vielen unterschiedlichen Enzymklassen vorzufinden. In der Tat stellt der $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Faltungstyp den häufigsten und vielseitigsten Faltungstyp in der Natur dar, weshalb dieser auch in fünf der insgesamt sechs verschiedenen EC-Klassen zu finden ist (Sterner und Höcker 2005). So werden beispielsweise einige Schritte der Glykolyse durch $(\beta\alpha)_8$ -Fass Enzyme katalysiert, die sich hinsichtlich Substrat und Reaktionsmechanismus deutlich voneinander unterscheiden (Farber und Petsko 1990, Nagano et al. 2002). Die $(\beta\alpha)_8$ -Fass Enzyme sind somit ein gutes Beispiel dafür, wie sich aus einer gemeinsamen Vorläufersequenz unterschiedliche enzymatische Aktivitäten entwickeln können.

Im Verlauf der Evolution dürften beide Mechanismen ihren Beitrag zur Entwicklung der heute bekannten Enzymfunktionen geleistet haben, wobei sich vermutlich die meisten Proteinfunktionen aus bereits vorhandenen Genen entwickelt haben dürften. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass es für einen Organismus wesentlich einfacher sein sollte, auf einem bereits bestehenden stabilen Proteingrundgerüst eine neue enzymatische Funktion zu

etablieren. So existieren neben den TIM ($\beta\alpha$)₈-Fass Enzymen zahlreiche andere Beispiele, in denen Proteine zwar einen gemeinsamen Faltungstyp besitzen, aber unterschiedliche biologische Funktionen wahrnehmen.

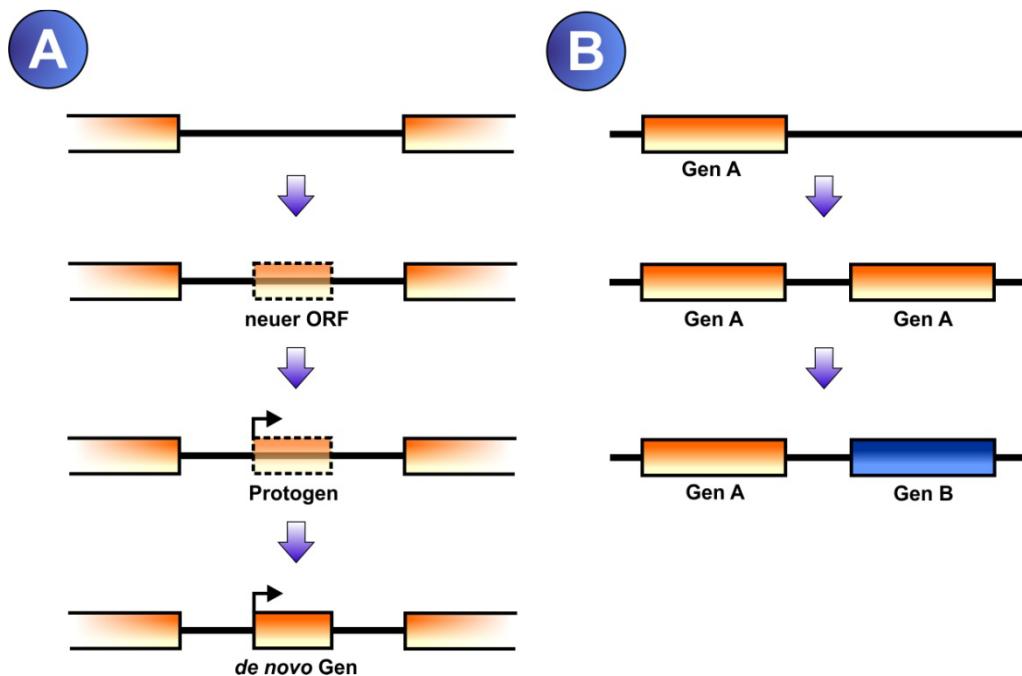


Abbildung 1.1: Mechanismus zur Entstehung neuer Gene. Neue Gene können entweder aus einem nicht kodierenden Genomabschnitt evolviert werden (A) oder durch die entsprechende Diversifizierung und Adaptation bereits bestehender Gene entstehen (B). Die *de novo*-Entstehung neuer Gene umfasst mehrere Schritte. Hierzu muss sich zunächst in einem nicht kodierenden Bereich sowohl ein neuer ORF, als auch eine neue Transkriptionseinheit durch spontane Mutation ausbilden. Sobald beide Ereignisse eingetreten sind, entsteht auf diese Weise ein vorläufiges Protogen. Je nach evolutionärem Kontext kann sich dieses Protogen durch weitere Mutationen im Rahmen der natürlichen Selektion weiterentwickeln und sich letztlich als neues Gen im Genom etablieren. Im Gegensatz dazu gestaltet sich die Diversifizierung bereits bestehender Gene (Gen A) weniger komplex. Nach einem Genduplikationsereignis lastet zumindest auf einem der beiden Gene kein Selektionsdruck, was es diesem Gen ermöglicht weitere Mutationen anzusammeln und sich letztlich zu einem neuen Gen (Gen B) weiterzuentwickeln. Abbildung teilweise adaptiert nach Schmitz und Bornberg-Bauer 2017.

1.2 DIE VERWANDTSCHAFT DER TRPD-, NP-II- UND TRPD2-PROTEINFAMILIEN

Die in dieser Arbeit näher untersuchten TrpD2-Proteine sind zusammen mit den Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) und den Nukleosidphosphorylasen der Klasse II (NP-II) vermutlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden, was unter anderem durch deren strukturelle Ähnlichkeit wiedergespiegelt wird (Abbildung 1.2).

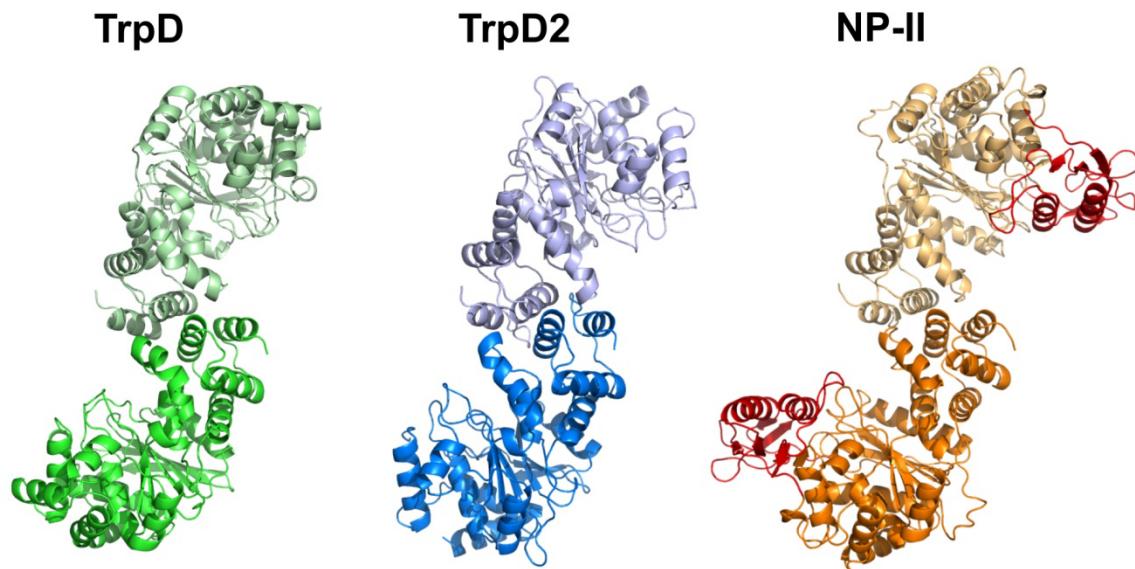


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau der TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteine. Gegenübergestellt sind einige Kristallstrukturen typischer Vertreter der TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteinfamilien. Die homodimeren Proteinstrukturen von *Sulfolobus solfataricus* TrpD (PDB: 1ZYK), *Escherichia coli* TrpD2 (PDB: 4MUO) und *Escherichia coli* NP-II (2TPT) sind im Bändermodell dargestellt und zusätzlich unterschiedlich eingefärbt, wobei der Farbton für jede der beiden Untereinheiten im Dimer leicht variiert wurde. Die Struktur des NP-II-Enzyms weist eine Insertion in der C-terminalen Domäne auf (rot eingefärbter Bereich).

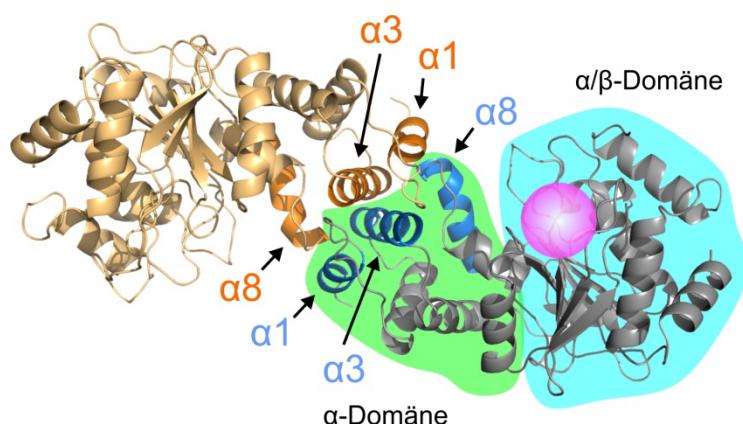


Abbildung 1.3: Bänderdarstellung von TrpD2 aus *E. coli*. Die Untereinheiten des homodimeren TrpD2 (PDB: 4MUO) sind in Orange und Dunkelgrau dargestellt. Die Kontaktfläche beider Untereinheiten wird im Wesentlichen durch die α -Helices α_1 , α_3 und α_8 ausgebildet. Jede Untereinheit kann im Weiteren in eine α -helikale Domäne (hellgrün hinterlegt) und eine α/β Domäne (cyan hinterlegt) unterteilt werden. Die ungefähre Lage der aktiven Zentren der verwandten TrpD- und NP-II-Enzyme ist in Form eines magentafarbenen Punktes angedeutet.

Alle bisher untersuchten TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteine liegen mit nur wenigen Ausnahmen im Fall der TrpD-Enzyme in einer homodimeren Quartärstruktur vor (Mayans et al. 2002, Pugmire und Ealick 2002, Schneider et al. 2015). Jede Untereinheit der Dimere lässt sich des Weiteren in eine N-terminale α -helikale Domäne (α_1 - α_4 , α_8 und α_9) und eine C-terminale α / β Domäne mit einem zentralen β -Faltblatt unterteilen (Abbildung 1.3). Die C-terminale Domäne der NP-II-Enzyme besitzt eine Insertion unbekannter Funktion und ist daher etwas größer als die der TrpD- und TrpD2-Proteine. In allen TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteinen wird die Kontaktfläche der beiden Untereinheiten jeweils durch die α -Helices α_1 , α_3 und α_8 der α -helikalen Domäne gebildet. Interessanterweise führt die Dimerisierung im Fall der TrpD-Enzyme zu einer erhöhten Thermostabilität (Schwab et al. 2008), wohingegen sie sich bei den NP-II-Enzymen vermutlich auf die Katalyse auswirkt (Holinski 2011). Die aktiven Zentren der TrpD- und NP-II-Enzyme befinden sich in einer Scharnierregion zwischen der N- und C-terminalen Domäne. Im Verlauf der Katalyse bewegen sich die beiden Domänen in Form einer Scharnierbewegung aufeinander zu (Pugmire et al. 1998, Marino et al. 2006), wodurch sich vermutlich die Konformation des aktiven Zentrums ändert und sich so letztlich auch die Substrate räumlich annähern. Obwohl sich das Verwandtschaftsverhältnis der TrpD-, TrpD2- und NP-II-Proteinfamilien am offensichtlichsten durch deren strukturelle Übereinstimmungen offenbart, wurde bereits im Vorfeld durch vergleichende Sequenzanalysen eine entsprechende Verwandtschaft festgestellt (Mushegian und Koonin 1994). Die TrpD2-Proteinfamilie stellt, was ihre Entdeckung betrifft, die jüngste der drei Proteinfamilien dar. Das erste *trpD2*-Gen wurde im Rahmen der Genomsequenzierung von *Aquifex aeolicus* identifiziert und aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu *trpD* als *trpD2* annotiert (Deckert et al. 1998). Im Gegensatz zur Struktur unterscheiden sich die Proteinfamilien deutlich in ihrer Sequenz, wobei die TrpD2-Proteine die geringste durchschnittliche Sequenzidentität zu den beiden anderen Proteinfamilien mit nur 17% für die TrpD und 10% für die NP-II-Enzyme aufweist (Schneider et al. 2015). Dies deutet bereits darauf hin, dass die drei homologen Proteinfamilien unterschiedliche biologische Funktionen wahrnehmen. Die Anthranilate-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) sind im Tryptophanstoffwechsel involviert und katalysieren dort die irreversible Kondensation von Anthranilat (AA) und 5'-Phosphoribosyl- α 1-pyrophosphat (PRPP) zu N-5'-Phosphoribosylanthranilat (PRA) und Pyrophosphat (PP_i) (Abbildung 1.4, A). Die TrpD-Enzyme benötigen für diese Reaktion Magnesium als Kofaktor (Schlee et al. 2009). Die Nukleosidphosphorylasen der Klasse II (NP-II) hingegen sind im *pyrimidine salvage pathway* anzutreffen und setzen dort pyrimidinhaltige Nukleoside um, wobei die Pyrimidinbase phosphorolytisch abgespalten wird (Abbildung 1.4, B).

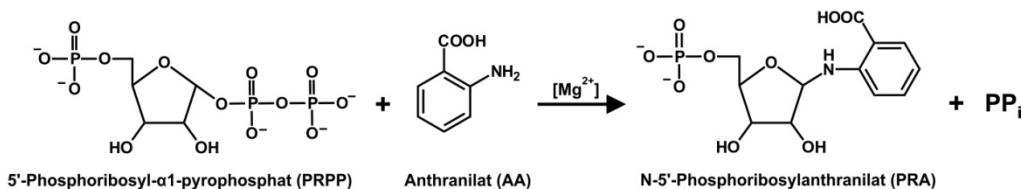
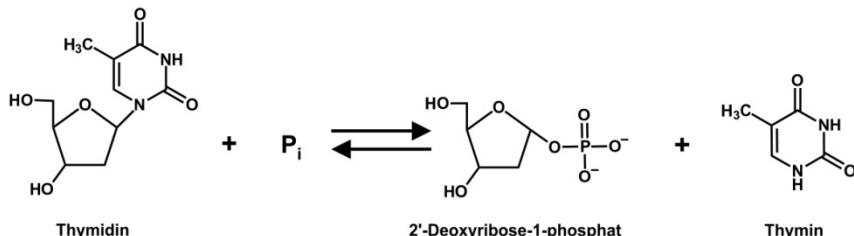
ATrpD-Reaktion**B**NPII-Reaktion

Abbildung 1.4: Reaktionen der Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (TrpD) und der Nukleosidphosphorylasen der Klasse II (NP-II).

Die beiden Enzymfamilien sind somit nachweislich an deutlich unterschiedlichen metabolischen Stoffwechselwegen beteiligt. Allerdings kann bei näherer Betrachtung der TrpD- und NP-II-Reaktionen zumindest festgestellt werden, dass beide Enzyme N-glykosidische Bindungen entweder neu knüpfen (TrpD) oder bereits bestehende spalten (NP-II). Zudem ist in beiden Reaktionen aktiv eine Phosphatgruppe in Form von Pyro- (TrpD) oder Orthophosphat (NP-II) beteiligt. Im Fall der TrpD2-Proteine ist lediglich bekannt, dass diese weder die TrpD- noch die NP-II-Reaktion katalysieren können, weshalb man davon ausgehen kann, dass die TrpD2-Proteine eine andere Aufgabe in der Zelle wahrnehmen. Aus anderen Arbeiten, die sich näher mit dem TrpD2-Protein aus *E. coli*, YbiB, beschäftigten, war allerdings bekannt, dass dieses TrpD2-Protein in der Lage ist Nukleinsäuren zu binden (Schneider 2011). Die Nukleinsäurebindung findet vermutlich in einer stark positiv geladenen Furche statt, die sich im Bereich der Kontaktfläche beider Untereinheiten befindet. Interessanterweise sind sehr viele der dort befindlichen Lysine und Arginine innerhalb der TrpD2-Proteinfamilie konserviert und es wurde bereits beobachtet, dass nicht nur das TrpD2-Protein YbiB, sondern auch das *Aquifex aeolicus* TrpD2 Nukleinsäuren mit hoher Affinität bindet (Schneider et al. 2015). Die Wechselwirkung mit den Nukleinsäuren scheint zudem sequenzspezifisch zu erfolgen, da selbst nach mehreren Runden SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) kein spezifisches Sequenzmotiv identifiziert werden konnte (Holinski 2011, Schneider 2011). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass sich einige *trpD2*-Gene wie das *ybiB*-Gen in einem LexA-regulierten Operon befinden. Diese spezielle Operonstruktur deutet darauf hin, dass zumindest im Fall von Proteobakterien wie *Escherichia coli*, die *trpD2*-Gene Teil der sogenannten SOS-Antwort (vgl. 1.3) dieser Mikroorganismen sind. Es wurde bereits gezeigt,

dass sich nach Induktion der SOS-Antwort sowohl die Transkription, als auch die Translation des *ybiB*-Gens signifikant erhöht (Quillardet et al. 2003, Schneider et al. 2015). Auf Basis dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei den TrpD2-Proteinen und im speziellen bei dem *E. coli* TrpD2-Protein YbiB um ein neuartiges Reparaturprotein der SOS-Antwort handeln könnte. Unter Berücksichtigung der von TrpD- und NP-II-Enzymen katalysierten Reaktionen wäre es denkbar, dass es sich bei YbiB um eine DNA-Glykosylase handelt (Abbildung 1.5, A).

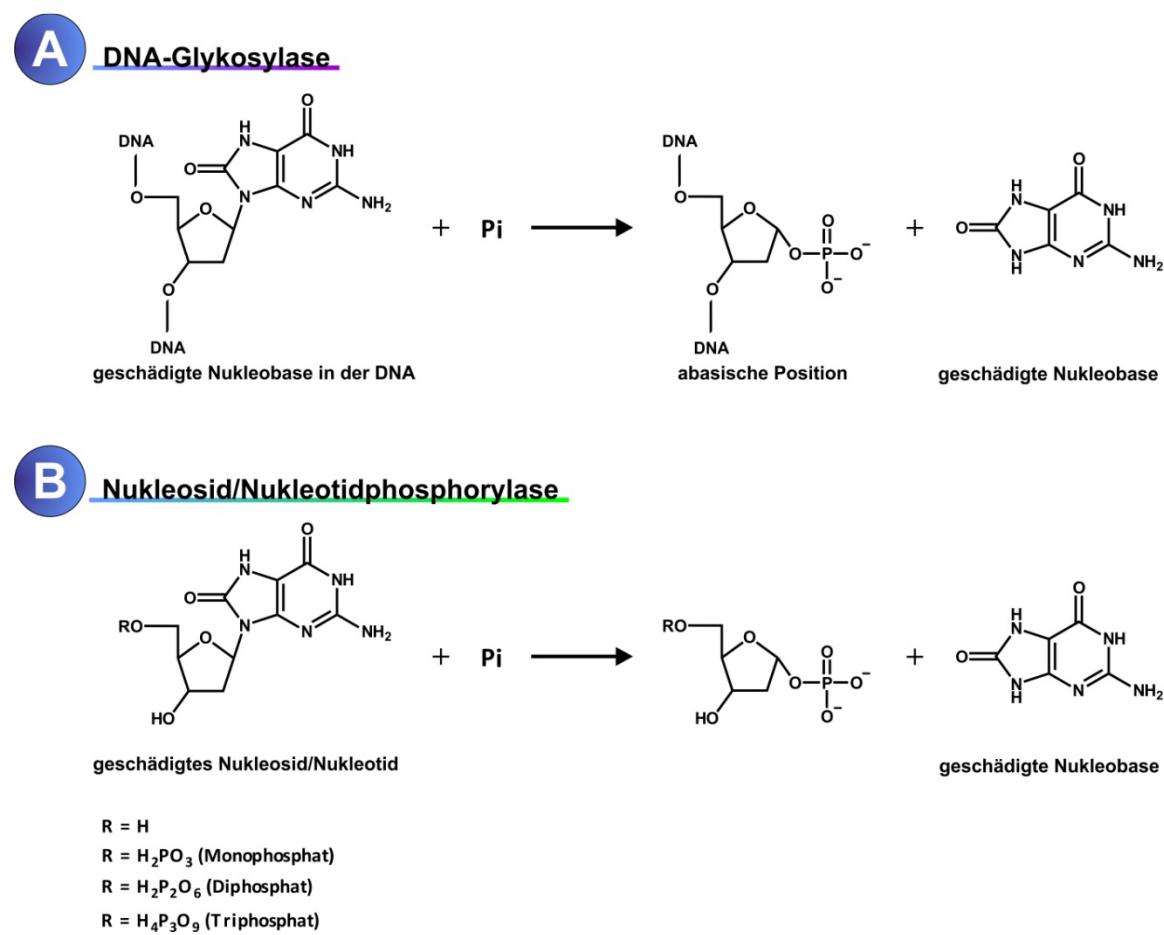


Abbildung 1.5: Arbeitshypothesen für die vom *E. coli* TrpD2-Protein YbiB katalysierte Reaktion.

So könnte YbiB unter Umständen geschädigte Nukleobasen aus dem DNA-Strang entfernen, indem die N-glykosidische Bindung zwischen der 2'-Desoxyribose und der Nukleobase durch den nukleophilen Angriff eines Orthophosphats gespalten wird. Der Vorteil hierbei wäre, dass im Gegensatz zu gewöhnlichen DNA-Glykosylasen keine leicht hydrolysierbare abasische Position (AP-site) als Reparaturintermediat entsteht, sondern die Hydroxylgruppe in einem stabilen Ester gebunden vorliegt. Alternativ könnte YbiB auch in Analogie zu den NP-II-Enzymen geschädigte Nukleoside oder Nukleotide umsetzen (Abbildung 1.5, B), wodurch diese aus dem Nukleotid-Reservoir entfernt werden könnten. Da sich jedoch der Umsatz kleiner organischer Moleküle

vorerst nicht mit der beobachteten Nukleinsäurebindung in Einklang bringen ließ, wurde zunächst primär die Annahme verfolgt, dass es sich bei YbiB vermutlich um eine neuartige DNA-Glykosylase der SOS-Antwort handelt.

1.3 DNA-REPARATUR-MECHANISMEN IN *ESCHERICHIA COLI*

In der Natur sind alle lebenden Organismen mitunter oft wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt, wodurch sich ein ständig wechselnder Selektionsdruck ergibt. Folglich müssen Organismen in der Lage sein sich an neue Lebensbedingungen anzupassen. Gerade bei einzelligen Mikroorganismen stellt man fest, dass diese Adaption mit einem vermehrten Auftreten neuer zellulärer Funktionen einhergeht. Die neuen Funktionen leiten sich oft von anderen Proteinen ab, die unter Umständen vollkommen andere biologische Funktionen wahrnahmen und im Verlauf der natürlichen Selektion immer weiter angepasst wurden (vgl. 1.1). Im Wesentlichen erfolgt diese Anpassung durch die schrittweise Akkumulation positiver Mutationen in der Gensequenz des jeweiligen Vorläuferproteins. Obwohl die Veränderung kleinerer Bereiche des Genoms einem Organismus also durchaus Vorteile bietet, muss dennoch sichergestellt werden, dass für die Aufrechterhaltung aller anderen zellulären Prozesse der Großteil des Genoms unverändert bleibt. Für diesen Zweck haben lebende Organismen zahlreiche Strategien entwickelt, um die Integrität ihrer Erbinformation zu bewahren. Im Folgenden werden am Beispiel des Mikroorganismus *E. coli* verschiedene Strategien bezüglich der Vermeidung und Behebung einiger DNA-Schäden vorgestellt.

Sofern man von der Reparatur sehr schwerer DNA-Schäden wie beispielsweise Doppelstrangbrüchen absieht, können die DNA-Reparaturstrategien in drei Kategorien eingeteilt werden: (i) Bereinigung des Nukleotid-Reservoirs, (ii) direkte Umkehr des DNA-Schadens und (iii) die Entfernung und Reparatur des geschädigten DNA-Bereiches (Abbildung 1.6).

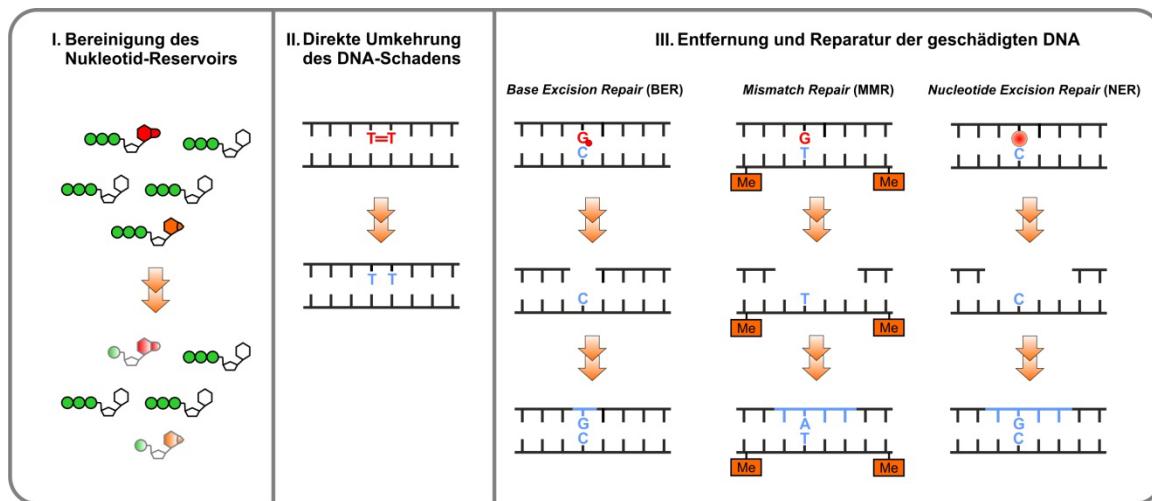


Abbildung 1.6: Grundkonzept von DNA-Reparaturstrategien. Die einzelnen Reparaturmechanismen sind im Haupttext genauer beschrieben.

Die Bereinigung des Nukleotid-Reservoirs (i) ist notwendig, da die funktionellen Gruppen der Nukleosidtriphosphate für chemische Modifikationen sehr leicht zugänglich sind und sich somit über kurz oder lang sehr viele geschädigte Nukleotide anhäufen würden. So liegt beispielsweise ein nicht unerheblicher Anteil des in der Zelle vorhandenen dGTPs in seiner oxidierten Form als 8-Oxo-dGTP vor (Tassotto und Mathews 2002, Pursell et al. 2008). Die modifizierten Nukleosidtriphosphate können im Zuge der DNA-Replikation von diversen DNA-Polymerasen als Substrat genutzt werden. Viele modifizierte Nukleobasen können zusätzlich zur klassischen Watson-Crick-Basenpaarung ebenfalls untypische Basenpaarungen eingehen, die nicht zwangsläufig von der *proof-reading*-Funktion der meisten DNA-Polymerasen erkannt werden (Pursell et al. 2008). Auf diese Weise kommt es zu Transversionen und Transitionen, was letztlich zur Veränderung der DNA-Sequenz führen kann. Das Nukleotid-Reservoir besitzt somit ein großes mutagenes Potential, weshalb Organismen verschiedene Enzyme besitzen, die dieses Risiko weitestgehend minimieren sollen. Zu diesem Zweck existieren in *E. coli* unter anderem einige Nudix-Hydrolasen, die bevorzugt geschädigte Nukleosidtriphosphate aus dem Nukleotid-Reservoir entfernen (Nagy et al. 2014). Ein Vertreter dieser Nudix-Hydrolasen ist das MutT-Protein aus *E. coli*, welches bevorzugt 8-Oxo-dGTP aus dem Nukleotid-Reservoir entfernt, indem es die Säureanhydridbindung zwischen dem α- und β-Phosphat spaltet. Das Reaktionsprodukt 8-Oxo-dGMP kann im weiteren Verlauf nicht mehr von einer DNA-Polymerase als Substrat genutzt werden, was die ansonsten mutagene Wirkung des 8-Oxo-dGTPs unschädlich macht. Die Entfernung entsprechend geschädigter Nukleotide verhindert somit präventiv die Entstehung von DNA-Schäden.

Sobald allerdings ein DNA-Schaden im Genom auftritt, werden je nach Schwere des Schadens unterschiedliche Reparaturmechanismen aktiviert. Die relativ einfachste und schonendste Methode ist die direkte Umkehr des Schadens (ii). Besonders einzellige Mikroorganismen

können sich in der Regel nur schlecht vor der schädlichen Wirkung kurzwelliger UV-Strahlung schützen, was unter anderem zu einem vermehrten Vorkommen von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPDs) führt. Diese photochemische [2+2]-Cycloadditionsreaktion kann durch DNA-Photolyasen rückgängig gemacht werden (Mahaputra Wijaya et al. 2015). Hierzu nutzten diese Enzyme ebenfalls UV-Licht, welches über eine Kaskade mehrerer Chromophore bis zum CPD geleitet wird und letztlich die beiden Pyrimidine in ihren Ausgangszustand zurücksetzt. Neben Photoaddukten ist es ebenso möglich bestimmte Methylierungen, wie die des 6-O-Methyl-Guanins durch entsprechende Proteine rückgängig zu machen. Hierzu wird die Methyl-Gruppe auf einen enzymeigenen Cystein-Rest übertragen, wodurch die Methyltransferase irreversibel deaktiviert wird (Lindahl et al. 1982). Diese Proteine sind allerdings nur in der Lage gewisse O-Methylierungen aufzuheben, wohingegen N-Methylierungen wie 7-Methyl-Guanin über andere Mechanismen repariert werden.

Die meisten DNA-Schäden werden jedoch durch „Ausschneiden“ aus dem DNA-Doppelstrang entfernt und der partiell einzelsträngige Bereich anschließend wieder mit Hilfe einer DNA-Polymerase aufgefüllt (iii). Der einfachste Mechanismus in dieser Kategorie der DNA-Reparaturmechanismen ist die Basenexzisionsreparatur (BER, *Base Excision Repair*; Zharkov 2008). Dieser Reparaturmechanismus ist für die Entfernung geschädigter Nukleobasen wie 7-Methyl-Guanin oder 8-Oxo-Guanin aus der DNA-Helix zuständig. Obwohl es sich bei den meisten geschädigten Nukleobasen zunächst nur um eine moderate Schädigung der DNA handelt, sind an deren Beseitigung viele verschiedene Enzyme beteiligt (Zharkov 2008). Im ersten Schritt entfernt eine DNA-Glykosylase die geschädigte Nukleobase aus der DNA-Helix, indem diese die N-glykosidische Bindung zwischen der Nukleobase und der 2'-Desoxyribose hydrolytisch gespaltet. Interessanterweise überlappen die Substratspektren einiger DNA-Glykosylasen, wodurch durchaus ein und dieselbe geschädigte Nukleobase von mehreren verschiedenen Enzymen umgesetzt werden kann. Die bei dieser Reaktion entstandene abasische Position (AP-site) wird im Anschluss durch eine AP-Endonuklease und eine dRP-Lyase (dRP, 5'-Desoxyribosephosphate) weiter prozessiert, wodurch nun ebenso das Phosphatrückgrat der zuvor entfernten Nukleobase aus der DNA-Helix herausgeschnitten wird. Anschließend wird die Lücke durch eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase wieder aufgefüllt und somit der geschädigte Bereich vollständig wiederhergestellt. Ein weiterer Reparaturmechanismus, der ebenfalls in diese Kategorie fällt, ist die Reparatur fehlgepaarter Basen (MMR, *Mismatch Repair*) (Fukui 2010). Diese Art des DNA-Schadens wird durch eine falsche Basenpaarung im Zuge der DNA-Replikation hervorgerufen. Eine Herausforderung, die im Verlauf der Reparatur dieses DNA-Schadens auftritt, ist die Notwendigkeit festzustellen, welche der beiden Nukleobasen fälschlicherweise durch die DNA-Polymerase in die DNA-Helix eingefügt wurde. Zu diesem Zweck werden bestimmte Sequenzmotive der DNA wie GATC an bestimmten Positionen methyliert. Da diese Modifikation erst relativ spät nach der DNA-Replikation stattfindet, ist es möglich, den alten vom neuen DNA-Strang zu unterscheiden. Die Reparatur fehlgepaarter Basen wird in *E. coli* durch die Ausbildung eines stabilen MutS-MutL-Komplexes initiiert, indem dieser die

Endonuklease MutH rekrutiert. Der neue DNA-Strang wird oberhalb (*upstream*) der Basenfehlpaarung in der ersten nicht-methylierten GATC-Sequenz geschnitten, wodurch der neue Strang für andere Reparaturenzyme wie die DNA-Helikase UvrD markiert wird. Es entsteht zunächst ein einzelsträngiges DNA-Intermediat, welches in Analogie zum BER mit Hilfe einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase aufgefüllt wird. Der reparierte DNA-Abschnitt sollte anschließend keine fehlgepaarten Basen mehr aufweisen. Der Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur (NER, *Nucleotide Excision Repair*) findet auf vergleichbare Weise statt (Kisker et al. 2013). In diesem Fall wird der DNA-Schaden durch das UvrA-Protein erkannt und dessen anschließende Interaktion mit UvrB führt letztlich zur Rekrutierung der Endonuklease UvrC. Das UvrC-Enzym schneidet anschließend sowohl oberhalb (*upstream*), als auch unterhalb (*downstream*) des geschädigten Bereichs. Im Folgenden wird der geschädigte Sequenzabschnitt durch die DNA-Helikase UvrD entfernt und der Reparaturvorgang erneut durch das auffüllen des einzelsträngigen DNA-Intermediats durch eine DNA-Polymerase und DNA-Ligase abgeschlossen.

Diese verschiedenen Reparaturenzyme und Reparatursysteme tragen in ihrer Gesamtheit dazu bei, dass sich die Erbinformation von *E. coli* kaum verändert und somit dessen Überlebensfähigkeit gewährleistet ist. Damit die zuvor vorgestellten DNA-Reparatursysteme wirklich effizient funktionieren, ist es mitunter nötig, die Expression der DNA-Reparaturproteine zu regulieren. Dies sorgt zum einen dafür, dass die DNA-Reparaturproteine eines Reparaturwegs im richtigen stöchiometrischen Verhältnis vorliegen, und zum andern kann dadurch adäquater auf extrinsische DNA-schädigende Substanzen reagiert werden. Bei metabolischen Enzymen findet man häufig, dass diese im Sinne der besseren Regulierbarkeit in Operonstrukturen zusammengefasst sind. Mit Ausnahme des Operons der Adaptiven Antwort (*Adaptive Response*), zu der die vier Proteine Ada, AlkA, AlkB und AidB gehören (Mielecki und Grzesiuk 2014), sind jedoch die Gene der meisten DNA-Reparaturenzyme über das gesamte Genom verteilt. Nichtsdestotrotz sind einige dieser Gene über den LexA-Repressor (Fernandez De Henestrosa et al. 2000) in der sogenannten SOS-Antwort (*SOS Response*) als sogenanntes Regulon zusammengefasst (Radman 1975, Kreuzer 2013). Der LexA-Repressor bindet an seine spezifische Erkennungssequenz (LexA-Box), wodurch die Transkription des LexA-Repressors und die der anderen SOS-Gene inhibiert wird. Ausgehend von diesem reprimierten Zustand, wird das System durch die Coprotease RecA aktiviert (Horii et al. 1981, Little 1982, Markham et al. 1984), sobald RecA mit einzelsträngigen DNA-Bereichen interagiert, wie sie im Falle massiver DNA-Schädigung vermehrt auftreten (Abbildung 1.7).

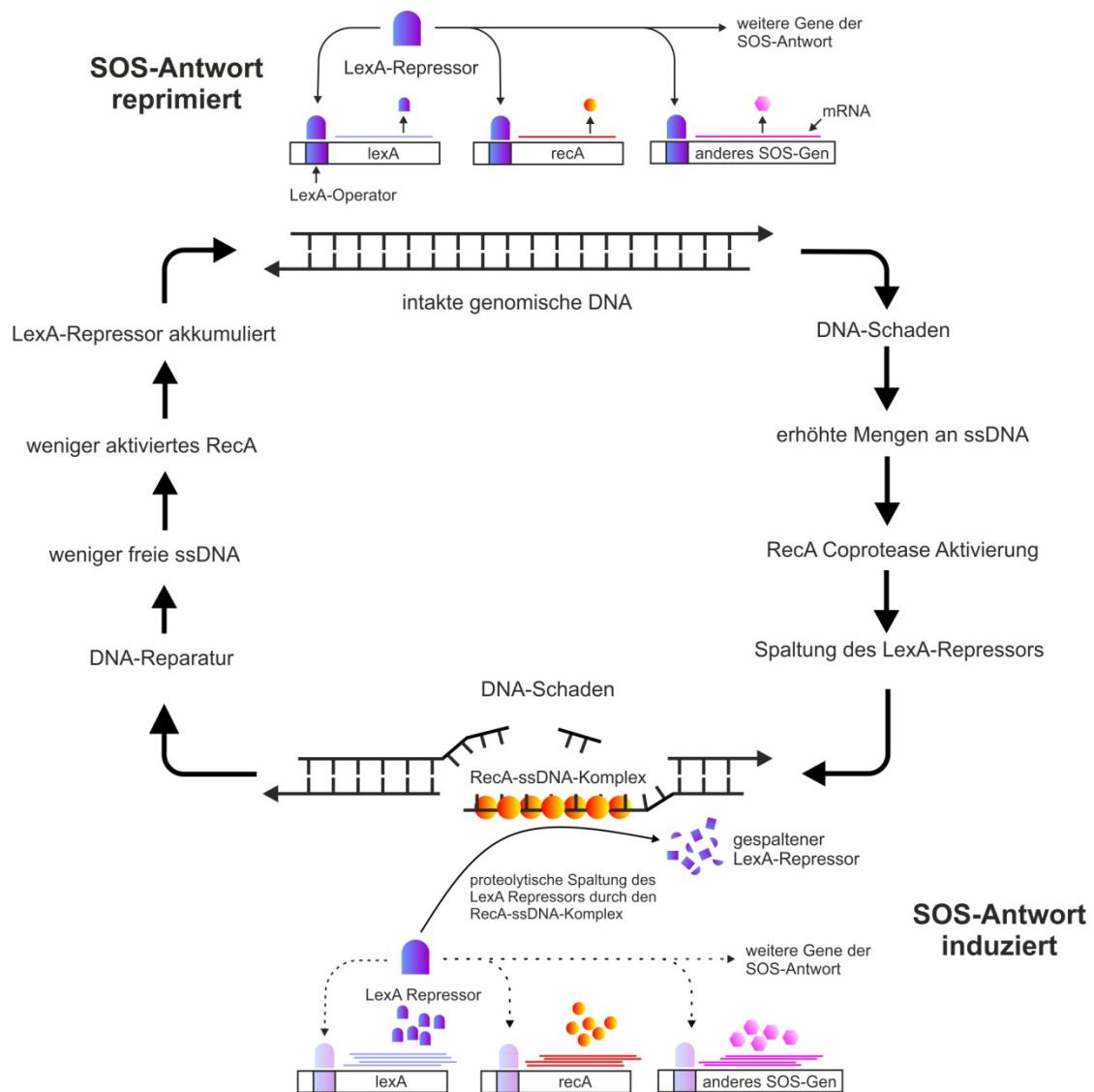


Abbildung 1.7: Regulation der SOS-Antwort in *E. coli* durch die beiden Proteine LexA und RecA.
Adaptiert nach Friedberg et al. 2006

Der daraus resultierende Komplex aus RecA-Proteinen, einzelsträngiger DNA und ATP fördert im weiteren Verlauf der SOS-Antwort die autokatalytische Spaltung des LexA-Repressors. Folglich wird durch die Aktivierung der LexA-intrinsischen Proteaseaktivität die Menge des Repressors verringert, was zu einer erhöhten Transkription der SOS-Gene führt. Neben DNA-Reparaturenzymen wie der Photolyase Phr und dem UvrABC-Komplex werden zudem auch spezielle schadenstolerante DNA-Polymerasen wie DinB, die selbst geschädigte DNA-Stränge als Matrize nutzen können (Tang et al. 2000, Ohmori et al. 2001) nun vermehrt exprimiert, sowie der Zellzyklus angehalten (Huisman et al. 1984), damit sich Mutationen nicht durch die DNA-Replikation manifestieren können. Nachdem die jeweiligen DNA-Schäden behoben wurden, reduziert sich die Anzahl an freier einzelsträngiger DNA in der Zelle und damit auch die Menge an aktiven RecA-ssDNA-Komplexen. Dies führt folglich zu einer verringerten proteolytischen Spaltung des LexA-Repressors, wodurch sich dieser in der Zelle wieder anhäuft und nun die

Transkription der SOS-Gene effizient inhibiert. Dieser systemeigene negative Rückkopplungsmechanismus führt somit erneut zur Unterdrückung der SOS-Antwort. In diesem reprimierten Zustand werden die Proteine der SOS-Antwort jedoch immer noch zu einem gewissen Grad exprimiert. So verringert sich beispielsweise die Expression des *recA*-Gens im nicht-induzierten Zustand auf etwa 10%, wodurch nur noch etwa 7200 RecA-Moleküle pro Zelle vorliegen (Sassanfar und Roberts 1990). Zusammenfassend kann man sagen, dass *Escherichia coli* mit der SOS-Antwort ein effizientes System besitzt, um adäquat auf verschiedene DNA-Schäden reagieren zu können.

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Aufklärung der biologischen Funktion der TrpD2-Proteinfamilie am Beispiel des *E. coli* TrpD2-Proteins YbiB weitergeführt werden. Dazu sollten die Charakteristika der schon bekannten Bindung von YbiB an Nukleinsäuren im Detail untersucht werden, wobei sowohl strukturell intakte, als auch modifizierte Nukleinsäuren verwendet werden sollten. Vor allem sollte die Auswirkung der Nukleinsäurebindung auf die YbiB-Struktur untersucht werden. Unter anderem sollte YbiB im Komplex mit einer Nukleinsäure kristallisiert und anschließend dessen Struktur mittels Röntgenkristallographie gelöst werden. Die Auswertung der Komplexstruktur sollte weitere Hinweise auf die mögliche biologische Funktion des YbiB-Proteins liefern.

Da das *ybiB*-Gen Teil eines LexA-regulierten Operons ist und somit zur SOS-Antwort gehört, wurde für das YbiB-Protein eine mögliche enzymatische Aktivität im Rahmen der DNA-Reparatur postuliert. Die dabei entstandenen Hypothesen sollten im Verlauf dieser Arbeit durch *in vitro* und *in vivo*-Experimente weiter überprüft werden, wobei die Identifizierung möglicher Substrate im Vordergrund stand. Die dabei erlangten Erkenntnisse sollten letztlich zur Aufklärung der tatsächlichen biologischen Funktion des YbiB-Proteins beitragen.

2. MATERIAL

2.1 CHEMIKALIEN

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

APPLICHEM GMBH, Darmstadt	MERCK, Darmstadt
BIO101 Inc., Carlsbad, CA,	USAMP BIOMEDICALS, Berlin
BIORAD LABORATORIES, München	NATIONAL DIAGNOSTICS, Simerville, USA
BIOZYM, Hessisch Oldendorf	OXOID, Wesel
BODE CHEMIE, Hamburg	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
HARTMANN ANALYTIC, Braunschweig	TRILINK BIOTECHNOLOGIES, Kalifornien
THERMO FISHER SCIENTIFIC, St.-Leon-Rot	BACHEM HOLDING AG, Bubendorf (CH)
JENA BIOSCIENCE GMBH, Jena	

2.2 KITS

Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, St.-Leon-Rot
Gene JET™ Gel Extraktion Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC, St.-Leon-Rot

2.3 ENZYME

DNA-Polymerasen

GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Pwo DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Pfu DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Fpg DNA-Glycosylase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
Klenow Fragment (3'→ 5' exo-)	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
Restriktionsendonukleasen	THERMO FISHER SCIENTIFIC, St.-Leon-Rot NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main

2.4 KRISTALLISATION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende kommerzielle Kristallisierungs-Screens zur Kristallisation eines kovalenten YbiB-DNA-Komplexes verwendet.

Kerafast EE0001	Kerafast, Inc.; Boston
MIDAS™ MD1-59	MOLECULAR DIMENSIONS LIMITED, Suffolk GB
Morpheus® MD1-46	MOLECULAR DIMENSIONS LIMITED, Suffolk GB
Natrix HAT HR2-131	Hampton Research, Kalifornien

Die Ansätze wurden mit dem Pipettierroboter Mosquito® von TTP LABTECH LIMITED, Melbourne, pipettiert.

Kristallisierungsansätze mit optimierten Bedingungen wurden in 15-well-EasyXtal Platten von QIAGEN, Hilden angesetzt.

2.5 BAKTERIENSTÄMME

Tabelle 2.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften ¹	Referenz	Anmerkung
<i>E. coli</i> NEB Turbo	F' proA ⁺ B ⁺ lac ^f Δ(lacZ)M15/fhuA2 Δ(lac- proAB) glnV gal R(zgb- 210::Tn10) Tet ^S endA1 thi-1 Δ(hsdS- mcrB)	New England Biolabs	Klonierungsstamm, Resistenz gegen den Bakteriophagen T1
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen	Expressionsstamm; dichtet Expressionssystem durch trans- Kodierung des lac-Repressors; trägt das pREP4 Plasmid
<i>E. coli</i> BW25113	F ⁻ Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) lambda ⁻ rph-1 Δ(rhaD- rhaB)568 hsdR514	Datsenko und Wanner (2000)	Wildtyp-Stamm (<i>E. coli</i> K-12 Derivat)
<i>E. coli</i> DY329	F ⁻ lambda ⁻ IN(rrnD- rrnE)1 rph-1 ΔlacU169 nadA::Tn10 gal490 [λcl857Δ(cro-bioA)]	Yu et al. (2000)	Trägt λ-Prophagen im Genom; erleichtert homologe Rekombination (W3110 Derivat)
<i>E. coli</i> DY329 ΔybiB::cat	F ⁻ lambda ⁻ IN(rrnD- rrnE)1 rph-1 ΔlacU169 nadA::Tn10 gal490 [λcl857Δ(cro-bioA)] ΔybiB::cat	Kaiser (2012)	Übertragung einer ybiB- Deletion auf andere Zielstämme mittels P1- Transduktion
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam ^r)	Novagen	Expressionsstamm; pLysS trägt das T7-Lysozym Gen als Regulierungselement der T7- Polymerase, sehr striktes Expressionssystem auf IPTG- Basis
M15 ΔybiB::cat [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ , ΔybiB::cat	Diese Arbeit	Expression von YbiB-Varianten in einem YbiB-Wildtyp freien Hintergrund, Cam als Selektionsmarker
M15 ΔybiB [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ , ΔybiB	Diese Arbeit	Expression von YbiB-Varianten mit amber-Stopcodon in einem YbiB-Wildtyp freien Hintergrund, Cam- Selektionsmarker wurde basierend auf dem Flp/FRT- System entfernt
M15 ΔmutT::cat [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ , ΔmutT::cat	Diese Arbeit	Expression von YbiB-Varianten in einem MutT freien Hintergrund, Cam als Selektionsmarker

<i>E. coli</i> DY329 $\Delta\text{mutT}::\text{cat}$	F ⁻ lambda ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 rph-1 $\Delta\text{lacU169 nadA::Tn10 gal490} [\lambda\text{cl857}\Delta(\text{cro-bioA})] \Delta\text{mutT}::\text{cat}$	Diese Arbeit	Übertragung einer <i>mutT</i> -Deletion auf andere Zielstämme mittels P1-Transduktion
<i>E. coli</i> DY329 $\Delta\text{mutT}::\text{kan}$	F ⁻ lambda ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 rph-1 $\Delta\text{lacU169 nadA::Tn10 gal490} [\lambda\text{cl857}\Delta(\text{cro-bioA})] \Delta\text{mutT}::\text{kan}$	Diese Arbeit	Übertragung einer <i>mutT</i> -Deletion auf andere Zielstämme mittels P1-Transduktion
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta\text{mutT}::\text{cat}$	F ⁻ $\Delta(\text{araD-araB})567$ $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$ lambda ⁻ rph-1 $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$ <i>hsdR514</i> $\Delta\text{mutT}::\text{cat}$	Diese Arbeit	Verwendet für <i>in vivo</i> -Expression von YbiB in einem <i>ΔmutT</i> -Hintergrund
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta\text{mutT}::\text{cat } \Delta\text{ybiB::kan}$	F ⁻ $\Delta(\text{araD-araB})567$ $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$ lambda ⁻ rph-1 $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$ <i>hsdR514</i> $\Delta\text{mutT}::\text{cat } \Delta\text{ybiB::kan}$	Diese Arbeit	Verwendet für <i>in vivo</i> -Expression von YbiB in einem <i>ΔmutT ΔybiB</i> -Hintergrund

¹Genetische Nomenklatur nach Bachmann (1990) beziehungsweise Novick et al. (1976) für Resistzenzen und Vektoren.

2.6 PLASMIDE

Tabelle 2.2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Konstrukt	Vektor	Marker ¹	Herkunft/Referenz	Anmerkung
pKD3 (leer)	pKD3	Cat	Datsenko und Wanner 2000	pANTS γ -Derivat; Templat für homologe Rekombination
pKD4 (leer)	pKD4	Kan	Datsenko und Wanner 2000	pANTS γ -Derivat; Templat für homologe Rekombination
pEVOL (leer)	pEVOL	Cat	Young et al. 2010	Arabinose-induzierbare Suppression des <i>amber</i> -Stoppcodons unter Einbau von <i>pBPA</i>
pQE60 (leer)	pQE60	Bla	Qiagen	Expressionsvektor, IPTG-induzierbar, T5-Promotor, 3'-terminaler <i>His₆tag</i>
pET21a (leer)	pET21a	Bla	Novagen	Expressionsvektor, IPTG-induzierbar, T7-Promotor, <i>lacI</i> auf Plasmid vorhanden, 3'-terminaler <i>His₆tag</i>
pREP4 (leer)	pREP4	Kan	Qiagen	Wird in Zusammenhang mit dem Expressionsstamm M15 verwendet; besitzt <i>lacI</i> -Gen
<i>ybiB R12A K14A R18A</i>	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Entfernung aller Lysine/Arginine aus der tunnelbildenden Schlaufe
<i>ybiB H204TAG</i>	pQE60	Bla	Schneider (2011)	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 204
<i>ybiB K8A R12A K14A R18A</i>	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Entfernung aller Lysine/Arginine aus der tunnelbildenden Schlaufe und

				der angrenzenden α -Helix
<i>ybiB</i> K5A K8A R12A K14A R18A	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Entfernung aller Lysine/Arginine aus der tunnelbildenden Schlaufe und der angrenzenden α -Helix
<i>ybiB</i> R4A K5A K8A R12A K14A R18A	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Entfernung aller Lysine/Arginine aus der tunnelbildenden Schlaufe und der angrenzenden α -Helix
<i>alkA</i>	pET21a	Bla	Diese Arbeit	<i>E. coli</i> AlkA als Kontrollenzym zur Untersuchung einer möglichen DNA-Glykosylase Aktivität
<i>pLysS</i> (leer)	<i>pLysS</i>	Cam	Novagen	Trägt das T7-Lysozym Gen; dient als Regulierungselement der T7-Polymerase, sehr striktes Expressionssystem auf IPTG-Basis
<i>ybiB</i> W173TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 173
<i>ybiB</i> R178TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 178
<i>mug</i>	pET21a	Bla	Diese Arbeit	<i>E. coli</i> MUG als Kontrollenzym zur Untersuchung einer möglichen DNA-Glykosylase Aktivität
<i>ybiB</i> W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Vorarbeit
<i>ybiB</i> E9C W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>ybiB</i> W173F W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Vorarbeit
<i>ybiB</i> E9C W173F W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Vorarbeit
<i>ybiB</i> E9C K93W W173F W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>ybiB</i> E9C W173F E206W W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>ybiB</i> E9C W173F E263W W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>ybiB</i> E9C W173F H204W W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>ybiB</i> K93C W173F W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Vorarbeit
<i>ybiB</i> H16W K93C W173F W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>ybiB</i> R18W K93C W173F W277F	pQE60	Bla	Diese Arbeit	FRET Variante
<i>mutT</i>	pET21a	Bla	Diese Arbeit	<i>E. coli</i> MutT als Kontrollenzym zur Untersuchung einer möglichen Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität
<i>deoA</i>	pQE70	Bla	Schneider (2011)	Expression von DeoA-Wildtyp
<i>ybiB</i> H16TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 16

<i>ybiB</i> D21TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 21
<i>ybiB</i> E248TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 248
<i>ybiB</i> E263TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 263
<i>ybiB</i> E290TAG	pQE60	Bla	Diese Arbeit	Expression von YbiB mit einem <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 290
<i>ybiB</i> L40E I51E	pQE60	Bla	Holinski (2011)	Monomere YbiB-Variante
pBAD/His (leer)	pBAD/His	Bla	Thermo Fisher Scientific	Expressionsvektor; <i>araBAD</i> -Promotor; Induktion mittels L-Arabinose
<i>ybiB</i>	pBAD/His	Bla	Diese Arbeit	Strenge Regulation der Expression von YbiB-Wildtyp in allen <i>E. coli</i> -Stämmen möglich
<i>ybiB</i>	pQE60	Bla	Dr. Patrick Babinger	Expression von YbiB-Wildtyp
<i>fip</i>	pCP20	Bla, Cam	Datsenko und Wanner 2000	Expression der Rekombinase Flp

¹Resistenzgene benannt nach Novick et al. (1976)

2.7 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE

Alle im Anschluss aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma BIOMERS, Ulm bezogen.

2.7.1 Oligodesoxyribonukleotide für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 2.3: Oligodesoxyribonukleotide für molekularbiologische Arbeiten

Name	Sequenz (5' → 3') ¹	Anmerkung
5_ybiB_kana_loop	CCATGGACTATCGCAAAATCATTAAAGAGATCGGGGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC	Entfernung aller K/R aus der tunnelbildenden Schlaufe mittels homologer Rekombination
3_ybiB_kana_loop	GCATACAGACC CGCGCAGTATCCGGTCTAAATCCA TATGAATATCCTCCTTAG	Mutagenese Oligo zur Umwandlung von R12A, K14A und R18A (Alanine codiert mit GCG) [Die Kana-Kassette enthält eine PstI-Schnittstelle]
ybiB_loop_ala	CCATGGACTATCGCAAAATCATTAAAGAGATCGGGGC GGGGGCGAACCACGCGCGGAGTTAGACCGGGATAC TGC CGCGGTCTGTATGC	QCM-Primer zur Umwandlung von K8A
fwd K8	TATCGCAAATCATTGCGGAGATCGGGCGGGG	QCM-Primer zur Umwandlung von K5A
rev K8	CCCCGCCCGATCTCCGCAATGATTTGCGATA	QCM-Primer zur Umwandlung von R4A
fwd K5	ACCATGGACTATCGC GCGATCATTGCGGAGATC	
rev K5	GATCTCGCAATGATCGCGCATAGTCCATGGT	
fwd R4	TTAACCATGGACTATGCGGCGATCATTGCGGAG	
rev R4	CTCCGCAATGATCGCCGCGATAGTCCATGGTAA	

AlkA 5' NdeI	ACTG CATATG TATACCCCTGAACCTGGCA	Klonierung von <i>E. coli</i> AlkA in pET21a
AlkA 3' Xhol	ACTG CTCGAG TGCTCGTCTGGTTGCCAGC	
YbiB W173TAG_f	CAACTGGCGATGCG CTAG CGGATGGGCGTGCCT	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 173
YbiB W173TAG_r	ACGCACGCCCATCCG CTA GCGCATGCCAGTT	
YbiB R178TAG_f	TGGCGGATGGGCGT TAG AACAGTGCACATACC	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 178
YbiB R178TAG_r	GGTATGTGCACTGTT CTA ACGCCCATGCCA	
MUG 5' NheI	ACTG GCTAGC GTTGAGGGATTTGGCTCC	Klonierung von <i>E. coli</i> MUG in pET21a
MUG 3' Xhol	ACTG CTCGAG TCGCCAACGCACTACCAGCG	
W277F_f	GAAACCACGGCGCAG TTC ATTGAGCGTTGCCCT	QCM-Primer zur Umwandlung von W277F
W277F_r	AAGGCAACGCTCAAT GAA CTGCGCCGTGGTTTC	
W173F_f	CAACTGGCGATGCG CTTC CGGATGGGCGTGCCT	QCM-Primer zur Umwandlung von W173F
W173F_r	ACGCACGCCCATCCG GAA GCGCATGCCAGTT	
K93W_f	TACAACGGCGCG TGG CAGGCCAACCTGACG	QCM-Primer zur Umwandlung von K93W
K93W_r	CGTCAGGTTGGCCTG CCA ACGCGCGCCGTTGTA	
E206W_f	AGCGTTTCGCATCCG TGG TACATTGGACGCGTC	QCM-Primer zur Umwandlung von E206W
E206W_r	GACGCGTCCAATGTA CCA CGGATGCGAAACGCT	
E9C_f	CGAAAATCATTAA TG CATCGGGCGCGGGAAA	QCM-Primer zur Umwandlung von E9C
E9C_r	TTTCCCGCGCCCGAT GCA TTTAATGATTTGCG	
K93C_f	TACAACGGCGCG TG CAGGCCAACCTGACG	QCM-Primer zur Umwandlung von K93C
K93C_r	CGTCAGGTTGGCCTG GCA ACGCGCGCCGTTGTA	
H204W_f	CTTCCAGCGTT TGG CCGGAATACATTGGA	QCM-Primer zur Umwandlung von H204W
H204W_r	TCCAATGTATTCCGG CCA CGAAACGCTGGAAAG	
H16W_f	GGGCGCGGGAAAAACT TG GGCGCGCGATTAGAC	QCM-Primer zur Umwandlung von H16W
H16W_r	GTCTAAATCGCGCG CCA GTTTTCCCGCGCCC	
R18W_f	GGGAAAAACACGCG TG GTGATTAGACCGGGAT	QCM-Primer zur Umwandlung von R18W
R18W_r	ATCCCAGCTAAATC CCA CGCGTGGTTTCCC	
E263W_f	GACACTGCTGGTAG TG GTACTGCCACAAGCA	QCM-Primer zur Umwandlung von E263W
E263W_r	TGCTTGCGCAGTA CCA GCTACCAGCAGTGT	
ecMutT f (NdeI)	ACTG CATATG AAAAAGCTGCAAATTGC	Klonierung von <i>E. coli</i> MutT in pET21a
ecMutT r (Xhol)	ACTG CTCGAG CAGACGTTAACGCTTCGCAA	
H16TAG_f	GGGCGCGGGAAAAACT AG CGCGCGATTAGAC	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 16
H16TAG_r	GTCTAAATCGCGCG CTA GTTTTCCCGCGCCC	
D21TAG_f	CACGCGCGGATT TA CGGGATACTCGCGCG	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 21
D21TAG_r	GCGCGCAGTATCCCG CTA AAATCGCGCGTG	
E248TAG_f	AATCTCATTGACCGT TG GGGATCGGGTGCT	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 248
E248TAG_r	CAGCACCCGATCCC CTA ACGGTCAATGAGATT	
E263TAG_f	GACACTGCTGGTAG TG TTACTGCCACAAGCA	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 263
E263TAG_r	TGCTTGCGCAGTA CTA GCTACCAGCAGTGT	
E290TAG_f	AGCGAACCGATTCCC TG TCGCTGAAAATCCAG	QCM-Primer für <i>amber</i> -Stoppcodon an Position 290
E290TAG_r	CTGGATTTCAGCG CTA GGGAATCGGTTCGCT	
MutT_KO_f	AAGCGCAGGATTCTGCGCTTTTTAGGTTAAGA CACTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Entfernen von <i>mutT</i> aus dem Genom und Austausch gegen eine Chloramphenicol oder Kanamycin -Resistenzkassette
MutT_KO_r	GTGTGCGAATGTCGGATGCGGCGAAAACGCCTTATCT GACCATATGAATATCCTCCTAG	

[†]Restriktionsschnittstellen und ausgetauschte Basentriplets sind in Rot dargestellt

2.7.2 Oligodesoxyribonukleotide für analytische Zwecke

Tabelle 2.4: Für die Herstellung der EMSA-Sonden verwendete Primer und Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3') ¹	Anmerkung
5'-Sonde Ndel	GA T CATATGTTAAAATGCCTGATTAACGC	Forward Primer (Ndel-Schnittstelle) für die Herstellung einer ssDNA 260bp oder dsDNA 260bp Sonde
3'-Sonde Ndel	GAAT CATATG GATCAATCTCATTGACCGTG	Reverse Primer mit Ndel-Schnittstelle für die Herstellung einer ssDNA 260bp Sonde
3'-dsDNA Ndel	GAAT CATATG CGCAGCGCTGCCGCAGATC	Reverse Primer mit Ndel-Schnittstelle für die Herstellung einer dsDNA 260bp Sonde
58 ssDNA	GCTTTGATGTACCAATGCATCACCATCACCATCAGGAA ATGGGTAAGATGCTTGTAG	58 ssDNA-Sonde
58 bp Sonde I	T A G CTTTGATGTACCAATGCATCACCATCACCATCAGG AAATGGGTAAGATGCTTGTAG	58 dsDNA-Sonde
58 bp Sonde II	T ACTACAAGCATCTTACCCATTCTGATGGTATGGT ATGCATTGGTACATCAAAAGC	
28 ssDNA	GCCGCTGATGTACCAAGTCATCACCATC	28 ssDNA-Sonde
28 bp Sonde I	T AGCCGCTGATGTACCAAGTCATCACCATC	28 dsDNA-Sonde
28 bp Sonde II	T AGATGGTGATGCACTGGTACATCAGCGGC	

¹Restriktionsschnittstellen und TA-Überhänge sind in Rot dargestellt

Tabelle 2.5: In Co-Kristallisationsexperimenten verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
Krist_dsDNA	ATGCCGCATATATATATGCGGC	Pallindrom, ergibt 22bp dsDNA-Fragment mit AT-Überhängen
20b dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	20b poly(dT) ssDNA für Kristallisation

Tabelle 2.6: Anisotropie Sonden mit Dansyl-Fluorophor.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
22bp Dansyl-Sonde I	D GCCCGCGATGTACCAAGTCATC	D = dT-Dansyl
22bp Sonde II	GATGCA T GGTACATCGCGCA	
[7]-AP 22bp Sonde II	GATGCA X GGTACATCGCGCA	X = dSpacer
[16]-AP 22bp Sonde II	GATGCA T GGTACATCGCGCA	X = dSpacer
[7]-GxT MM 22bp Sonde II	GATGCA T GGTACATCGCGCA	Mismatch
[7]-GxA MM 22bp Sonde II	GATGCA A GGTACATCGCGCA	Mismatch
Dansyl-[16]-AP ssDNA	D GCCCGCGATGTACCA X TCATC	D = dT-Dansyl; X = dSpacer

Tabelle 2.7: Anisotropie Sonden mit Chromis 500N-Fluorophor.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
12bp Chromis 500N dsDNA I	GGGGGAGCGGGC	5' Ende Chromis 500N-Fluorophor
12bp dsDNA II	GCCCGCTCCCCC	
[6]-AP 12bp dsDNA II	GCCCGCXCCCCC	X = dSpacer
22bp Chromis 500N dsDNA I	TGCCGCGATGTACCAAGTGCGCC	5' Ende Chromis 500N-Fluorophor
22bp dsDNA II	GGCGCACTGGTACATCGCGGC	
[3]-AP 22bp dsDNA II	GGXGCACTGGTACATCGCGGC	X = dSpacer
[5]-AP 22bp dsDNA II	GGCGXACTGGTACATCGCGGC	X = dSpacer
[7]-AP 22bp dsDNA II	GGCGCAXTGGTACATCGCGGC	X = dSpacer
[9]-AP 22bp dsDNA II	GGCGCACTXGTACATCGCGGC	X = dSpacer
[11]-AP 22bp dsDNA II	GGCGCACTGGXACATCGCGGC	X = dSpacer
[16]-AP 22bp dsDNA II	GGCGCACTGGTACATXCGGGC	X = dSpacer

Tabelle 2.8: Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA-Substraten für *Nicking Assays*.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
Pso_1	TTGGCACGGAGGTAGGACGCC	Substrat für
Pso_2	TTGGCGTCCTACCTCCGTGCC	Methoxsalen (ICL)
Pso_k1	TTGGCACGGAGGGAGGACGCC	Kontrolle für
Pso_k2	TTGGCGTCCTCCCTCCGTGCC	Methoxsalen (ICL)
Extension-Primer	GGCCGCGAGCTGGGC	Extension-Primer
5Formyl-U_template	TTCGCCGCCGCCGCCGCCAGCCCAGCTCGCGGCCG	template für Thymidin
8Oxo-G_template	TTGAGGAGGAGGAGGAGGACGCCAGCTCGCGGCCG	template für Guanosin
5Carboxy-C_template	TTCACCACCACCACCAGGCCAGCTCGCGGCCG	template für Cytidin

Tabelle 2.9: Oligonukleotide für dsDNA-Sonden.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
12bp dsDNA I	GGGGGAGCGGGC	
12bp dsDNA II	GCCCGCTCCCCC	12bp dsDNA-Sonde
14bp dsDNA I	GAC CGTACGACAGC	
14bp dsDNA II	GCTGCGTACGGTC	14bp dsDNA-Sonde
22bp Sonde I	TGCCGCGATGTACCAAGTGCATC	
22bp Sonde II	GATGCACTGGTACATCGCGGC	22bp dsDNA-Sonde
28bp Sonde I	TGCCGCGATGTACCAAGTGCATCACCATC	
28bp Sonde II	GATGGTATGCACTGGTACATCGCGGC	28bp dsDNA-Sonde

2.8 MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min 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 Ø47 mm; 0.2 µm Porengröße; SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde filtriertes (MilliQ Advantage A10 System, MILLIPORE GMBH, Schwalbach) bzw. bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.8.1 Molekulärbiologisches Arbeiten

PCR-dNTP-Stammlösung (25 mM bzw. 2 mM)

Je 25 mM bzw. 2 mM dNTP (N = A, C, G oder T) in ddH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Agarosegelektrophorese

Agarose (1%)

1% Agarose (w/v) in 0.5x TBE-Puffer aufgekocht und bei 60 °C gelagert

Sukrose Farbmarker

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.

TAE (50x)

242 g Tris-Base, 100 ml 0.5 M EDTA, 57.1 ml Eisessig

Der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.

Gentransfer mittels P1-Transduktion

CaCl₂ (1 M)

1 M CaCl₂ in Wasser gelöst, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

P1-Saline

145 mM NaCl und 50 mM Na₃Citrat in Wasser gelöst, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.8.2 Mikrobiologische Arbeiten mit *E. coli*

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

Ampicillin-Stammlösung (1000x)

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

Chloramphenicol-Stammlösung (1000x)

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

Kanamycin-Stammlösung (1000x)

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

Rifampicin-Stammlösung (500x)

50 mg/ml Rifampicin in DMSO gelöst.

L-Arabinose (20%)

20% L-Arabinose (w/v) 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.

Lysogeny broth (LB) Medium

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Für Plattenkulturen noch 15 g/l Agar zugeben.

Weichagar für P1-Transduktion

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

0.36 g/l CaCl₂·2H₂O

6.5 g/l Agar

Terrific broth (TB) Medium

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
4 ml Glycerol
Alles in 900 ml ddH₂O lösen und autoklavieren.
Zugabe von 100 ml einer sterilen 0.17 M KH₂PO₄, 0.72 M K₂HPO₄

2.8.3 Arbeiten mit Proteinen

Kaliumphosphat Puffer (KP)

1 M K₂HPO₄, 1 M KH₂PO₄; Der gewünschte pH-Wert wurde über das Mischverhältnis der beiden Komponenten eingestellt.

Tris-HCl Puffer

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

Cacodylat-Puffer

200 mM Cacodylat wurden mit 1 M NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Puffer Metallchelataffinitätschromatographie**Aufschlusspuffer I bzw. Elutionspuffer I**

50 mM KP pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 7.5

Elutionspuffer II

50 mM KP pH 7.5, 300 mM NaCl, 750 mM Imidazol pH 7.5

Dialyse- und Lagerungspuffer

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM KP pH 7.5

Puffer Ionenaustauschchromatographie**Elutionspuffer I**

100 mM KP pH 7.5

Elutionspuffer II

100 mM KP pH 7.5 , 1 M NaCl

Puffer Größenausschlusschromatographie

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM KP pH 7.5

2.8.4 Native und denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

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

Protogel™

40% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

SDS-PAGE

Trenngelpuffer

10 % (w/v) SDS, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 bei RT

Sammelgelpuffer

10 % (w/v) SDS, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 bei RT

Laufpuffer

0,1% (w/v) SDS, 0.025 M Tris-HCl, pH 8.5 bei RT, 0.2 M Glycin

Probenpuffer (6x)

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 (13.5%)

Die Angaben beziehen sich auf 13 Gele.

	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer	7.38 ml	-
Trenngelpuffer	-	19.5 ml
Protogel™ Acrylamid/Bisacrylamid	5.9 ml	26.2 ml
ddH 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

Native PAGE (1x TAE)**Laufpuffer**

1x TAE pH 7.0

Natives PAGE Gel

Die Angaben beziehen sich auf ein 6- oder 10%-iges Gel.

Native PAGE	6%-ige Gele	10%-ige Gele
50x TAE pH 7.0	0.6 ml	0.6 ml
Protogel™ Acrylamid/Bisacrylamid	4.5 ml	7.5 ml
APS-Stammlösung (10%)	10 µl	10µl
TEMED	30 µl	30 µl
ddH ₂ O	ad 30 ml	ad 30 ml

Denaturierende 7 M Urea-PAGE (20%)**Laufpuffer**

1x TBE

7 M Urea-PAGE Gel

Die Angaben beziehen sich auf ein 20%-iges Gel.

7 M Urea-PAGE (20%)	
5x TBE	1.6 ml
Protogel™ Acrylamid/Bisacrylamid	4.0 ml
APS-Stammlösung (10%)	8 µl
TEMED	8 µl
Harnstoff	3.4 g
ddH ₂ O	ad 8 ml

2x Formamid-Probenpuffer

95% (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) Xylen Cyanol FF und 0.05% (w/v)
Bromophenol

2.8.5 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

0.05 M EDTA pH 7.3

2.9 SOFTWARE

Unicorn 5.31	© GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES
Corel Draw X6	© COREL CORP
MS Office 2007	© 2007 MICROSOFT CORPORATION
Pymol 1.8.0.6	© 2017 SCHRODINGER LLC
Sigma Plot Version 12.0	© 2011 SYSTAT SOFTWARE INC
Spectra Manager	© 2009 JASCO COPERATION
Spectra Manager Version 2	© 2012 JASCO COPERATION
ProtParam tool	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
Jalview 2.10	http://www.jalview.org/
DynaFit Version 4.05.104	© 1996-2017 BioKIN LTD
CLC Main Workbench 7.5.1	© QIAGEN
MicroCal PEAQ-ITC 1.0.0.125	© MALVERN INSTRUMENTS LTD.
Endnote x7.7.1	© 2016 THOMSON REUTERS
OptiQuant Version 3.0	© 1998 PACKARD INSTRUMENT Co
ChemStation Rev.B.04.01	© 2001-2008 AGILENT TECHNOLOGIES

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} von 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 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-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 1 l LB-Medium auf eine OD_{600} von 0.1 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln erneut inkubiert. Bei einer OD_{600} zwischen 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, Rifampicin) 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.

3.1.4 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Präparation elektrokompetenter Zellen wurden 50 ml LB₀-Medium mit 100 bis 250 µl aus einer üN-Kultur angeimpft, die Zellen entweder bei 30 °C (DY329) oder 37 °C (alle anderen) unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 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 ddH₂O (4 °C) 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 wurde ein Aliquot Zellen entweder mit 1 pg DNA bei normaler Transformation, beziehungsweise 10 - 600 ng DNA im Falle der homologen Rekombination nach Yu et al. (2000) vermischt. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Schichtdicke) gegeben und diese einem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) ausgesetzt. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls wurden die Transformationsansätze mit 1 ml LB₀ Medium gemischt und anschließend für 1 h bei 37 °C beziehungsweise im Falle der homologen Rekombination über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln regeneriert. Nach der Inkubation wurden die Transformationsansätze in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000) auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C (DY329) oder 37 °C (alle andern) angezogen.

3.1.5 In vivo Bestimmung der Mutationsrate eines *E. coli*-Stammes

Neben *in vitro* Untersuchungen können auch zellbasierte Experimente eingesetzt werden, um ein besseres Verständnis über molekulare Vorgänge zu erlangen. Das in dieser Arbeit verwendete *in vivo*-Experiment zielte darauf ab, die bereits *in vitro* beobachtete Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Wildtyps gegenüber geschädigten Nukleosidtriphosphaten in einem zellulären Kontext zu verifizieren. Derartige Experimente wurden bereits zuvor mit ähnlichen Enzymen wie beispielsweise MutT durchgeführt (Tajiri et al. 1995, Fowler et al. 2003), wobei die Expression von MutT mit einer signifikanten Erniedrigung

der Mutationsfrequenz einhergeht. In diesem Zusammenhang kann die Mutationsfrequenz anhand des Auftretens rifampicinresistenter Zellen bestimmt werden. Dieses spezielle Antibiotikum wirkt dabei als starker Inhibitor der RNA-Polymerase, wodurch die Transkription sämtlicher mRNAs zum erliegen kommt. Im Gegensatz zu dessen potenter Wirkweise, scheint es allerdings für Bakterien recht einfach zu sein, eine entsprechende Resistenz auszubilden. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in der β -Untereinheit der RNA-Polymerase zahlreiche Positionen gibt, an denen bereits eine einfache Punktmutation ausreicht, um eine vollständige Resistenz zu etablieren (Jin und Gross 1988). Folglich führt eine erhöhte Mutationsfrequenz zu einem vermehrten Auftreten rifampicinresistenter Zellen, wohingegen die enzymatische Aktivität von MutT (Maki und Sekiguchi 1992) und MutT-ähnlichen Proteinen diesem Effekt genau entgegenwirkt. Somit ergibt sich ein beobachtbarer, direkter Zusammenhang zwischen Rifampicinresistenz, Mutationsfrequenz und einer Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität.

Der Einfluss der Expression von YbiB-Wildtyp auf die Mutationsrate eines BW25113 $\Delta mutT$ -Stammes wurde ebenfalls unter Verwendungen von Rifampicin bestimmt. Das Experiment wurde in Abwesenheit von DNA-schädigenden Reagenzien durchgeführt, um den Einfluss anderer DNA-Reparatursysteme der SOS-Antwort möglichst gering zu halten. Des Weiteren ist es unter diesen Bedingungen notwendig, dass das Experiment in einem $\Delta mutT$ -Hintergrund durchgeführt wird, da der Einfluss der MutT-Aktivität ansonsten vermutlich alle anderen Effekte überdeckt. Die Auswirkung der Expression von YbiB-Wildtyp auf die Mutationsfrequenz eines BW25113 $\Delta mutT$ -Stammes wurde wie im Folgenden beschrieben untersucht.

Die Stämme BW25113 und BW25113 $\Delta mutT$ (2.5) wurden über Nacht bei Raumtemperatur in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker angezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4 – 0.6 wurden die Zellen zunächst für 20 - 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für eine spätere Transformation mittels Elektroporation vorbereitet (3.1.4). Im Verlauf der Transformation (3.1.4) wurden jeweils 100 µl elektrokompetente Zellen mit 200-300 pg pBAD oder pBAD *ybiB*-Wildtyp Plasmid transformiert. Die frisch transformierten Zellen wurden in 1 ml LB₀-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C gekult. Der gekurte Transformationsansatz wurde auf zwei 500 µl Fraktionen aufgeteilt und mit diesen jeweils ein 5 ml LB_{Amp}-Röhrchen angeimpft, wobei ein Röhrchen keine und das andere 0.02% (w/v) L-Arabinose enthielt. Die 5 ml-Flüssigkulturen wurden über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je Röhrchen 100 µl einer 10⁻⁶- und 10⁻⁷-Verdünnung zur Lebendzellzahlbestimmung auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Im Einklang mit den Inkubationsbedingungen der Übernachtkulturen, wurden zudem je 200 µl der unverdünnte Zellsuspension auf LB_{Amp/Rif}-Platten mit oder ohne 0.02% L-Arabinose ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden auf allen Platten sämtliche Kolonien gezählt und dadurch sowohl die Lebendzellzahl, als auch die Anzahl an rifampicinresistenter Zellen der Übernachtkulturen des Vortages bestimmt. Die Anzahl der auf jeder Platte bestimmten Kolonien wurde auf ein Ausgangsvolumen von 200 µl

Bakteriensuspension normiert. Dies erleichterte im Anschluss die Berechnung der Mutationsfrequenz (f) der einzelnen Übernachtkulturen anhand Gleichung (Gleichung 3.1), was letztlich als Kriterium zur Bestimmung des positiven Effekts von YbiB-Wildtyp auf die Integrität des Genoms diente.

$$f = \frac{\text{Anzahl resistenter Zellen}}{\text{Lebendzellzahl}}$$

Gleichung 3.1: Definition der Mutationsfrequenz f

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 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 oder einer RNA-Konzentration von 35 µg/ml. Eine reine DNA-Lösung zeigt keine Absorption oberhalb von 300 nm und weist eine $OD^{260}/_{280}$ -Quotienten von mindestens 1.8 auf. Bei reiner RNA beträgt der $OD^{260}/_{280}$ -Quotient ca. 2.0.

3.2.2 Amplifizierung 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 und Faloona 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 $3' \rightarrow 5'$ 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.	Annealing	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.

3.2.3 Kolonie-PCR im Fall von Deletionsstämmen

Um den Erfolg von genomischen Veränderungen im Zuge der Generierung von Deletionsstämmen zu überprüfen, wurden auf Selektivagar gewachsene Kolonien mittels PCR und genspezifischer Primer überprüft. Da die Ansätze der P1-Transduktion in einer relativ hohen Zelldichte ausplattiert wurden, konnten die Kolonien nicht direkt für eine Kolonie-PCR gepickt werden. Der starke Hintergrund der toten, nicht transduzierten Zellen, führt bei einer regulär durchgeführten Kolonie-PCR stets zu einer Amplifikation des deletierten Zielgens und liefert dadurch ein falsch positives Ergebnis. Aus diesem Grund wurde die Deletion des Zielgens wie folgt verifiziert. Zunächst wurden die Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und damit 5 µl LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker angeimpft. Nach Inkubation bei 30 °C (DY329) oder 37 °C (alle anderen) über Nacht, wurde ein Teil der Bakterienkultur 1:100 mit LB₀-Medium verdünnt. Im Folgenden wurde 1 µl der verdünnten Bakteriensuspension als template zu 19 µl eines PCR-Ansatzes mit GoTaq®-Polymerase gegeben und die PCR gemäß 3.2.2 durchgeführt. Die dabei eingesetzten Primer waren entweder spezifisch für das zu deletierende Zielgen oder für flankierende genomische Bereiche.

3.2.4 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, St. Leon-Rot). Dazu wurde eine 5 ml üN-Kultur in

inem 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.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau verwendet. Je nach Größe des zu analysierenden DNA-Fragments wurden entweder 0.6%, 1.0% oder 2.5% Agarose in 0.5x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlen 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 Volt. 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, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder) abgeschätzt. Die Dokumentation der Gele erfolgte über den UV-Transilluminator des *Multi-Doc-it Digital Imaging Systems* (UVP inc.).

3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurden die gewünschten Fragmentbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten und gemäß Herstellerangaben mit dem *Gene JET™ Gel Extraktion Kit* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, St.-Leon-Rot) gereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 - 50 µl ddH₂O, abhängig von der im Gel vorhandenen Menge an DNA.

3.2.7 Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen

Pro 1 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 und Reaktionspuffer.

3.2.8 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 2 U 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.

3.2.9 Extraktion von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Eine Methode um Nukleinsäuren gezielt von Proteinen oder anderen Bestandteilen aus Reaktionsansätzen abzutrennen, stellt die Phenol-Chloroform-Extraktion dar. Die meist wässrigen Lösungen werden zuerst mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt und gemischt, wodurch eine Emulsion entsteht. Nukleinsäuren und andere mögliche Bestandteile der wässrigen Lösung verteilen sich je nach ihrer Löslichkeit in den beiden Phasen. In der Regel beobachtet man, dass Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben, hydrophobe Substanzen eher in die organische Phase übergehen und Proteine an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen ausfallen. Folglich wird die wässrige Phase mit den Nukleinsäuren abgenommen und diese noch einmal mit Chloroform versetzt, um restliches Phenol zu entfernen. In der wässrigen Phase sollten sich nach der Phenol-Chloroform-Extraktion nur noch Nukleinsäuren befinden.

Für die Extraktion von Nukleinsäuren wurde der wässrige Ansatz mit 1 Volumen Phenol-Chloroform (1:1 (v/v)) versetzt, gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (5 min, 16000g bei 4 °C, Eppendorf Centrifuge 5417R). Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 Volumen Chloroform zugegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 16000g bei 4 °C, Eppendorf Centrifuge 5417R). Die in der wässrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren können mittels Ethanol-Fällung (3.2.10) weiter gereinigt werden.

3.2.10 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Um Nukleinsäuren zu reinigen, zu konzentrieren oder diese in andere Puffersysteme zu überführen, wurde die Ethanol-Fällung verwendet. Dazu wurden der Lösung 0.1 Volumen 3 M Kalium-Aacetat, 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 zweimal mit 1 Volumen eiskaltem 80%-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.

3.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nukleotidsequenzen erfolgte durch Auftragssequenzierungen bei der Firma SEQLAB, Göttingen. Ein Sequenzieransatz (Vol. = 15 µl) enthielt standardmäßig 500 – 750 ng Plasmid-DNA und 2 µM Primer.

3.2.12 Zielgerichtete Mutagenese mittels QuikChange

Die ursprünglich von Stratagene (La Jolla, USA) entwickelte und nach einem Protokoll von Wang und Malcolm (2002) optimierte QuikChange Mutagenese (QCM) ist eine Methode zur zielgerichteten Sequenzveränderung plasmidischer DNA. Die Methode beruht auf einer schrittweisen Amplifikation der gesamten plasmidischen DNA, wobei die Art und Position der Mutation durch die eingesetzten Primer definiert wird (Abbildung 3.1). Die einzuführende Mutation ist dabei mittig auf den QCM-Primern angeordnet und wird an beiden Seiten von 12 - 15 Basen langen Bereichen flankiert, die komplementär zur Zielsequenz sind. Um das Risiko von ungewollten Mutationen im Zuge der Amplifikation zu verringern, wird für gewöhnlich eine DNA-Polymerase mit *proof-reading*-Aktivität (3' → 5') verwendet. Im Verlauf der Mutagenese werden zunächst die beiden Plasmid-DNA-Stränge in zwei separaten PCR-Ansätzen (E1, E2) getrennt voneinander amplifiziert, um das Auftreten ungewollter Primer-Dimere in den ersten Zyklen zu verhindern. Nachdem die QCM-Primer in den ersten Zyklen verlängert wurden, werden diese im nächsten Schritt in einem gemeinsamen PCR-Ansatz gemischt (E1+E2), was letztlich zur Amplifikation des gesamten Plasmids führt. Allerdings ist die DNA-Polymerase nicht in der Lage das erzeugte 3'-Ende mit dem initialen 5'-Ende kovalent zu verknüpfen, weshalb das erzeugte Plasmid auf beiden DNA-Strängen jeweils einen Einzelstrangbruch aufweist. Sobald jedoch die Plasmide in *E. coli* transformiert werden, sorgen *E. coli* eigene DNA-Ligase dafür, dass die Einzelstrangbrüche behoben werden. Bevor *E. coli* mit den Plasmiden transformiert wird, wird mittels *DpnI*-Verdau die vorgelegte, methylierte *template*-DNA entfernt.

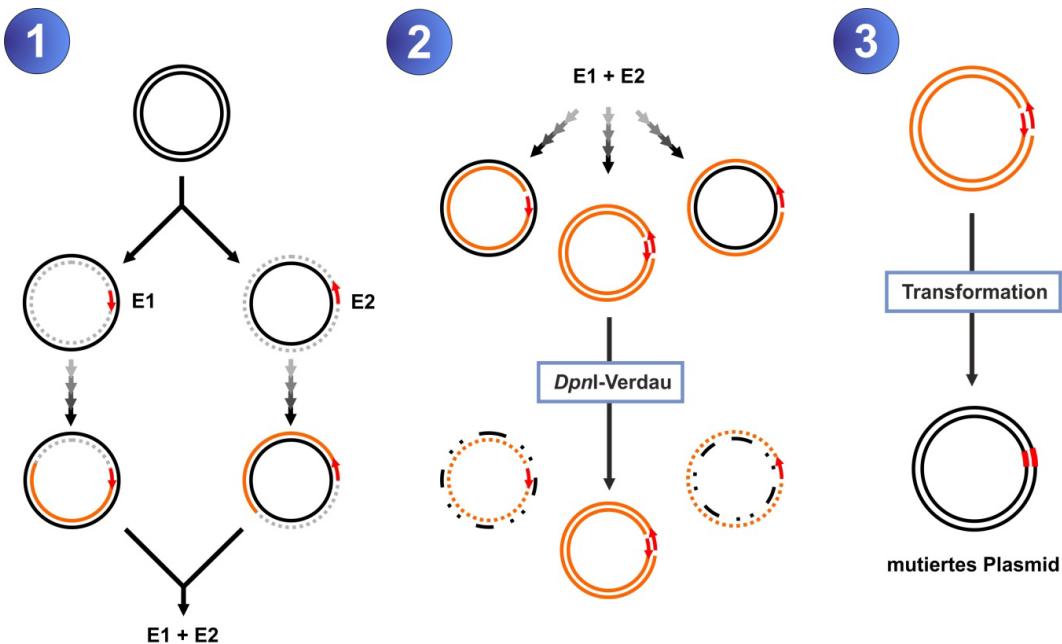


Abbildung 3.1: Schematischer Verlauf der zielgerichteten QuikChange Mutagenese. Im Fall der QuikChange Mutagenese werden Mutationen mittels Mutageneseprimern (rote Pfeile) und Amplifikation der gesamten Plasmid-DNA in diese eingefügt. Im ersten Schritt (1) werden beide Mutageneseprimers in zwei separaten PCR-Ansätzen (E1, E2) verlängert und auf diese Weise Megaprimer erzeugt. Die Reaktionsansätze werden im nächsten Schritt (2) vereinigt, die PCR-Reaktion der nun kombinierten Ansätze (E1+E2) über mehrere Zyklen fortgesetzt und auf diese Weise die lineare Amplifikation der gesamten Plasmid-DNA vervollständigt. Im Anschluss wird der Ansatz noch mit *DpnI* behandelt, um methylierte *template*-DNA aus dem Ansatz zu entfernen. Nach diesem Schritt sollte lediglich neu amplifizierte Plasmid-DNA mit der jeweils gewünschten Sequenzmodifikation im Ansatz vorliegen. Da die Plasmid-DNA im Rahmen dieser Technik lediglich mit einer DNA-Polymerase amplifiziert wurde, befinden sich auf beiden DNA-Strängen im entsprechenden Abstand zueinander zwei Einzelstrangbrüche (siehe Haupttext). Diese vermeintlichen DNA-Schäden werden später nach der Transformation in den *E. coli*-Zellen repariert und man erhält somit ein strukturell intaktes Plasmid mit veränderter DNA-Sequenz (3).

Die beiden QCM-Primer wurden zunächst separat in zwei unterschiedlichen 50 µl Ansätzen verlängert. Hierzu wurden 1.6 µM des jeweiligen QCM-Primers zusammen mit 50 ng *template*-DNA, 2.5 U Pfu DNA-Polymerase (Promega) und 0.2 mM dNTPs in dem von Promega mitgelieferten Reaktionspuffer gemischt. Die anschließende PCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm im Thermocycler (Mastercycler personal, EPPENDORF) durchgeführt, die Schritte 2 bis 4 wurden dabei viermal wiederholt.

1.	Initiale Denaturierung	95 °C, 3 min
2.	Denaturierung	95 °C, 45 s
3.	Annealing	T _A °C, 1 min
4.	Extension	72 °C, 2 min/kb
5.	Finale Extension	72 °C, 10 min
6.	Lagerung	16 °C, ∞

Im Anschluss wurden jeweils 25 µl der beiden initialen Reaktionsansätze (E1, E2) miteinander gemischt. Die lineare Amplifikation der mutierten Plasmid-DNA erfolgte nach obigem PCR-Programm, allerdings wurden die Schritte 2 bis 4 nun insgesamt 18-mal wiederholt. Am Ende der PCR-Reaktion wurden 20 U *DpnI* direkt in den finalen QCM-Ansatz (E1+E2) gegeben und dieser anschließend 1.5 h bei 37 °C inkubiert, wodurch die methylierte template-DNA verdaut wurde. Der Ansatz wurde ohne weitere Reinigungsschritte dazu verwendet chemisch kompetente *E. coli*-Zellen zu transformieren (3.1.3).

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

Eine Methode, um gezielte Veränderungen am *E. coli*-Genom vorzunehmen, ist das λ -Red-Rekombinasesystem, welches auf den drei Genen γ , β und *exo* des Phagen Lambda beruht (Datsenko und Wanner 2000, Yu et al. 2000). Bei dem als *recombineering* bezeichneten Verfahren wird dsDNA eingesetzt, um mittels homologer Rekombination eine entsprechende Modifizierung am Zielort zu erreichen. Hierbei dient das Gamma-Protein des λ -Red-Rekombinasesystems als Inhibitor der Exonuklease V des Wirtsorganismus, welches somit den Abbau der linearen dsDNA verzögert. Exo und Beta hingegen binden an das lineare dsDNA-Fragment und leiten das Rekombinationsereignis ein. Dabei agiert Exo als dsDNA-abhängige Exonuklease (5' → 3'), welche 3' ssDNA Überhänge erzeugt. An diese ssDNA Bereiche binden nun die Beta-Proteine, was die Hybridisierung von komplementären DNA-Strängen erleichtert. In Abbildung 3.2 ist schematisch dargestellt, wie man anhand dieser Methode in der Lage ist, einen bestimmten Genomabschnitt in *E. coli* gezielt zu verändern.

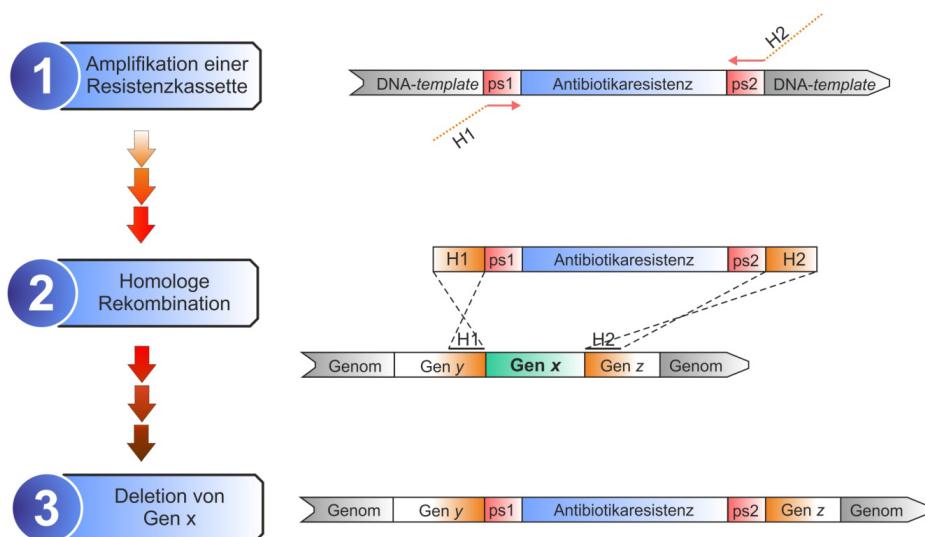


Abbildung 3.2: Erzeugung eines *E. coli*-Deletionsstammes mittels λ -Red-Rekombinasesystem. Es kennzeichnen ps1 und ps2 die *priming sites* zur Amplifikation der Antibiotikaresistenzkassette. Bei H1 und H2 handelt es sich um Abschnitte, welche homolog zu *upstream-* und *downstream-Sequenzen* des zu deletierenden Gens x sein müssen. Das genaue Vorgehen ist im Text beschrieben.

Das λ -Red-Rekombinasesystem wurde in dieser Arbeit hauptsächlich dazu verwendet, verschiedene *E. coli*-Deletionsstämme zu erzeugen. Als erster Schritt wurde hierzu zunächst eine Chloramphenicol- bzw. Kanamycin-Resistenzkassette mittels PCR über die *priming sites* ps1 und ps2 amplifiziert, wobei als *template* der Vektor pKD3 bzw. pKD4 (Datsenko und Wanner 2000) diente. Zusätzlich wurden über die Primer homologe Bereiche H1 und H2, mit einer Länge von 36 bp, am 5' und 3' Ende angefügt. Diese homologen Bereiche wurden stets so gewählt, sodass sie identisch mit den Bereichen waren, die sich unmittelbar *up- und downstream* zum jeweiligen Zielgen (Gen x) befanden.

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss durch Agarosegelektrophorese (3.2.5) getrennt und aus dem Agarosegel extrahiert (3.2.6). Um mögliche *template*-DNA-Verunreinigungen aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser noch mit *DpnI* behandelt, da dieses Restriktionsenzym lediglich methylierte *template*-DNA, aber nicht das unmethylierte PCR-Fragment verdaut.

Im nächsten Schritt wurde der *E. coli*-Stamm DY329 mit den gereinigten PCR-Produkten transformiert. Im *E. coli*-Stamm DY329 liegt das λ -Red-Rekombinasesystem nicht wie üblich plasmidkodiert vor, sondern ist direkt in das *E. coli*-Genom integriert (Sawitzke et al. 2007). Die Expression der ansonsten cytotoxischen λ -Red-Gene (*exo*, β , γ) wird durch einen temperatursensitiven Repressor reguliert, welcher bei 30 °C die Transkription der λ -Red-Gene inhibiert und erst bei Temperaturen um 42 °C deren Expression erlaubt. Um elektrokompetente DY329-Zellen zu erzeugen, wurden zunächst 50 ml LB₀-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 500 µl einer üN-Kultur inkkuliert und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 bis 0.6 angezogen. Im Anschluss wurde die 50 ml Kultur für 15 Minuten in einem Wasserbadshüttler bei 42 °C inkubiert, um die Rekombinase-Gene zu induzieren. Danach wurde der Kolben noch für etwa 3 Minuten auf Eis geschwenkt, um die *E. coli*-Zellen möglichst zügig auf 4 °C zu kühlen, wodurch die Zellen weniger sensitiv auf die folgenden Waschschritte reagieren. Die nun folgenden Waschschritte und ebenso die Elektroporation wurden wie unter 3.1.4 angegeben durchgeführt. Die transformierten DY329-Zellen wurden unmittelbar nach der Elektroporation in 1 ml LB₀-Medium aufgenommen und über Nacht bei RT unter Schütteln inkubiert. Dadurch stand der Rekombinase genügend Zeit zur Verfügung das homologe Rekombinationssereignis einzuleiten und zugleich konnte sich im Anschluss die jeweilige Antibiotikaresistenz ausbilden. Danach wurden die Zellen auf entsprechenden Selektionsagarplatten (Chloramphenicol bei Plasmid pKD3 als *template* bzw. Kanamycin bei Plasmid pKD4 als *template*) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Kolonien mit erfolgreich deletiertem Zielgen wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.3) und genspezifischen Primern verifiziert.

3.2.14 Modifizierung plasmidischer DNA mittels homologer Rekombination

Die Vorgehensweise zur Modifizierung genomicischer DNA mittels homologer Rekombination (3.2.13) kann in leicht abgewandelter Form auch auf plasmidische DNA angewandt werden (Noll et al. 2009). Die Methode wurde für *multi-copy*-Plasmide zum Zweck der gezielten Veränderung von Plasmid-DNA-Sequenzen wie folgt optimiert (Abbildung 3.3).

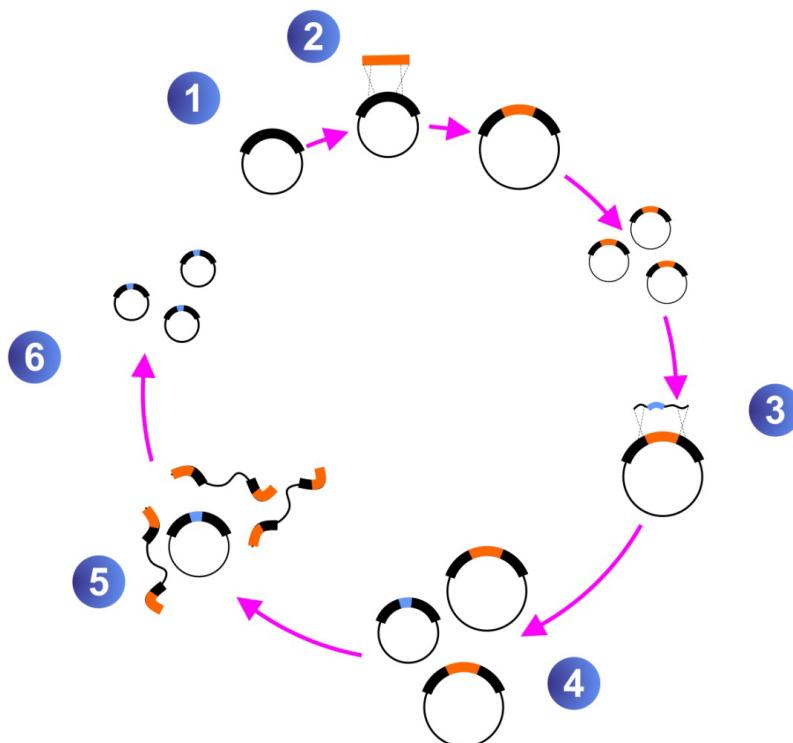


Abbildung 3.3: Modifizierung plasmidischer DNA mittels homologer Rekombination. Mit Hilfe des λ-Red-Rekombinasesystems ist es möglich die Nukleotidsequenz eines Plasmids zielgerichtet zu verändern. Innerhalb von zwei Rekombinationsereignissen wird zunächst eine Resistenzkassette (roter Balken) und anschließend die eigentliche DNA-Mutation (blaue Markierung) mittels Mutageneseoligonukleotid (gewellte Linie) eingeführt. Das genaue Vorgehen ist im Haupttext beschrieben.

Im ersten Schritt wird in Analogie zu genomicischer DNA eine Antibiotikaresistenzkassette amplifiziert, die jedoch über eine Restriktionsschnittstelle verfügt, die ansonsten nicht auf dem zu verändernden Plasmid vorhanden ist. Diese Restriktionsschnittstelle ist für die finale Anreicherung der modifizierten Plasmide essentiell und wird später genauer beschrieben. Die Resistenzkassette wird wie im Fall von genomicischer DNA so konzipiert, sodass diese mittels λ-Red-Rekombinasesystem (3.2.13) genau in dem zu verändernden Sequenzabschnitt eingefügt wird. Im Anschluss an das erste Rekombinationsereignis (Abbildung 3.3, 2) werden die Plasmide aus den Zellen extrahiert, um gegebenenfalls entstandene Artefakte durch fälschliche

Integration der Resistenzkassette ins Genom zu umgehen. Im nächsten Schritt (Abbildung 3.3, 3) wird die eigentliche Plasmid-Modifikation ebenfalls mittels λ -Red-Rekombinasesystem und einem synthetisch hergestellten Mutagenese-Oligonukleotid eingeführt. Das Mutagenese-Oligonukleotid verfügt wie die Resistenzkassette über 5'- und 3'-terminale komplementäre Bereiche, wodurch es möglich ist die Resistenzkassette mittels homologer Rekombination gegen dieses Oligonukleotid auszutauschen. Somit definiert letztlich die Sequenz des Mutagenese-Oligonukleotids die neue Basenabfolge im entsprechenden Zielbereich des Plasmids. Da im letzten Rekombinationsereignis der Selektionsmarker entfernt wird (Abbildung 3.3, 4), muss das final modifizierte Plasmid anderweitig angereichert werden. In einem letzten Schritt werden daher alle Plasmide aus den *E. coli*-Zellen isoliert und anschließend mittels Endonuklease genau an der Stelle geschnitten, die lediglich in der Resistenzkassette vorhanden ist. Folglich werden alle Plasmide die nur die Resistenzkassette, aber nicht die eigentliche Sequenzmodifikation tragen, linearisiert (Abbildung 3.3, 5). Sobald man *E. coli* mit den isolierten Plasmiden nach dem Restriktionsverdau transformiert, führt dies aufgrund der unterschiedlichen Transformationseffizienzen zur Anreicherung der immer noch zirkularen, final modifizierten Plasmide (Abbildung 3.3, 6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die homologe Rekombination auf YbiB-Wildtyp im pQE60-Vektor angewandt, um gleichzeitig mehrere räumlich benachbarte Mutation einzuführen. Zu diesem Zweck wurde wie in 3.2.13 beschrieben die Kanamycin-Resistanzkassette von pKD4 amplifiziert. Diese Resistenzkassette besitzt eine PstI-Schnittstelle, die ansonsten weder im *ybiB*-Gen noch auf pQE60 zu finden ist. Die weiteren Schritte erfolgten wie im Falle der homologen Rekombination genomicscher DNA beschrieben. Es wurden lediglich 100 – 200 ng der amplifizierten Resistenzkassette und 10 ng Plasmid zur Ko-Transformation der DY329-Zellen verwendet (3.1.4). Die aus den DY329-Zellen isolierten Plasmide wurden zwischenzeitlich ein weiteres Mal in chemisch kompetenten Zellen angezogen. Im Anschluss daran, wurde die finale Modifikation durch ein wie zuvor durchgeführtes zweites Rekombinationsereignis eingeführt. Zu diesem Zweck wurden elektrokompetente DY329-Zellen mit 5 - 50 pmol des Mutagenese-Oligonukleotids und 10 ng des zuvor mit Resistenzkassette modifizierten Plasmids transformiert. Nachdem die Zellen über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert wurden, wurde die gesamte Plasmid-DNA aus den DY329-Zellen isoliert (3.2.4). Die Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzyme PstI nach dem in Abschnitt 3.2.7 beschriebenen Vorgehensweise verdaut. Im letzten Schritt wurden 250 ng der behandelten Plasmid-Präparation dazu verwendet, chemisch kompetente Zellen zu transformieren. Nachdem der Transformationsansatz über Nacht bei 37 °C auf LB-Selektionsagarplatten inkubiert wurde, wurden positive Klone mittels Kolonie-PCR (3.2.3) identifiziert.

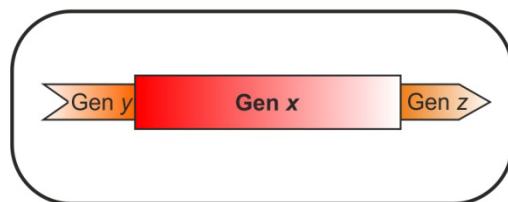
3.2.15 Gentransfer mittels P1-Transduktion

Über die Methode der P1-Transduktion ist es möglich, Genomabschnitte von bis zu 100 kb von einem Bakterienstamm auf einen anderen zu übertragen. Dieses Verfahren basiert auf dem lytischen Vermehrungszyklus des Phagen P1, welcher nach erfolgreicher Infektion die Produktion von Phagen-DNA und Phagen-Proteinen in der Wirtszelle initiiert und zudem beginnt, das Wirtsgenom zu zerschneiden. Im Verlauf der Ausbildung neuer Phagenpartikel wird mit einer Häufigkeit von etwa 0.3% fälschlicherweise ein Teil des zerschnittenen Wirtsgenoms (bis zu 100 kb) statt der Phagen-DNA in die Phagenpartikel verpackt. Diese Phagenpartikel sind nicht mehr in der Lage sich zu vermehren, können aber noch immer neue Wirtszellen befallen und so den Genomabschnitt der Vorgängerwirtszelle auf die neue Wirtszelle übertragen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die P1-Transduktion dazu verwendet, um verschiedene *E. coli*-Stämme hinsichtlich rekombinanter Expression oder für bestimmte *in vivo*-Experimente gezielt zu modifizieren. Hierzu wurden zunächst genomische Modifizierungen im *E. coli*-Stamm DY329 wie unter 3.2.13 beschrieben etabliert und dann mittels P1-Transduktion auf einen Zielstamm übertragen. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

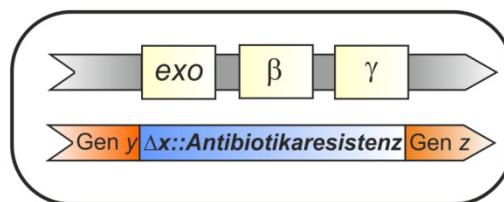
Zielstamm (variabel)

Eigenschaft: Expressionsstamm
Wildtyp-Stamm
Knockout-Stamm

...

**DY329-Spenderstamm**

Eigenschaft: λ -Red-Rekombinasesystem (exo, β , γ)
 $\Delta x::\text{Antibiotikaresistenz}$



Infektion des Zielstamms

P1 Phagen Partikel mit genomischer DNA des Spenderstamms

Infektion von *E.coli* mit P1 Phagen

ca. 0.3% Lyse der infizierten *E.coli* Zelle

P1 Phagen

Zielstamm ohne Gen x

A schematic diagram of the final transduced strain genome. It shows Gen y ($\Delta x::\text{Antibiotikaresistenz}$) followed by Gen z (orange).

Abbildung 3.4: Übertragung genomischer Modifikationen mittels P1-Transduktion. In diesem Schema wird gezeigt, wie ein Genomabschnitt, in dem das Gen x gegen eine Antibiotikaresistenz ($\Delta x::\text{Antibiotikaresistenz}$) ausgetauscht wurde, vom DY329-Spenderstamm auf einen beliebigen Zielstamm durch transduzierende P1-Phagenpartikel übertragen wird. Zuerst wird der Spenderstamm mit P1-Phagen infiziert, was letztlich zur Lyse der *E. coli*-Zellen führt. In diesem P1-Lysat befinden sich nun mit einer Häufigkeit von 0.3% P1-Phagenpartikel, welche fälschlicherweise Teile des zerschnittenen Wirtsgenoms (bis zu 100 kb) statt der Phagen-DNA tragen. Mit geringer Wahrscheinlichkeit wird auch jener Genomabschnitt mit der Modifikation $\Delta x::\text{Antibiotikaresistenz}$ in ein solches Phagenpartikel verpackt. Diese transduzierenden P1-Phagen sind nicht mehr vermehrungsfähig, jedoch noch immer infektiös. Wird nun das erzeugte P1-Lysat des DY329-Spenderstamms mit dem Zielstamm vereinigt, sind die transduzierenden Phagen in der Lage, Genomabschnitte des Spenderstamms auf den Zielstamm zu übertragen. Somit können *E. coli*-Stämme genetische auf die jeweilige experimentelle Anwendung optimiert werden.

Zuerst wurde hierfür eine üN-Kultur des DY329 Spenderstamms mit LB₀-Medium 1:5 verdünnt und CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 2.5 mM zugegeben. Im Anschluss wurden im 50 °C

warmen Wasserbad 250 µl der verdünnten Bakterienkultur, 100 µl eines P1-Lysats und 2.5 ml Weichager in ein steriles Wassermannröhren pipettiert, kurz gemischt und auf LB₀-Platten gleichmäßig ausplattiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne P1-Lysat. Danach wurden die Platten bei 30 °C für 3 - 7 Stunden inkubiert, bis die Platten aufgrund der Lyse durch P1 wieder klar wurden. Um die Phagen aus dem Agar zu lösen, wurde dieser mit je 3 ml LB₀-Medium pro Platte überschichtet und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurde das LB₀-Medium mit den gelösten Phagen von den Platten abpipettiert und zentrifugiert (10 min, 3220 g, 4 °C, EPPENDORF Centrifuge 5810R). Der Überstand wurde abgenommen und mit 0.5 ml Chloroform versetzt, um gegebenenfalls noch vorhandene *E. coli*-Zellen des Spenderstamms abzutöten Morse et al. (1956).

Das fertige P1-Spenderlysat wurde nun auf die entsprechenden Zielstämme angewandt. Hierzu wurde zunächst eine üN-Kultur eines Zielstamms (BW25113, KEIO Collection) mit CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 2.45 mM versetzt. Danach wurden 0.8 ml dieser üN-Kultur mit 0.4 ml des jeweiligen unverdünnten oder 1:10 verdünnten P1-Spenderlysats gemischt und zur Infektion für 25 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Hier diente ein Ansatz mit 0.4 ml LB₀-Medium statt P1-Spenderlysat als Negativkontrolle. Um die Infektion zu stoppen, wurde zu den Ansätzen je 5 ml P1-Saline gegeben, was aufgrund des enthaltenen Citrats dazu führt, dass die für die Absorption der Phagen essentiellen Calcium-Ionen komplexiert werden. Im Anschluss wurden die Ansätze noch für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, damit sich die im Verlauf der Transduktion übertragene Antibiotikaresistenz etablieren konnte. Nachdem die Zellen abzentrifugiert waren (8 min, 3220g, 4 °C, EPPENDORF Centrifuge 5810R), wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 100 µl P1-Saline resuspendiert und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Lediglich transduzierte Zellen, in denen das entsprechende Zielgen gegen die jeweilige Antibiotikaresistenz ausgetauscht wurde, konnten auf den Selektivagarplatten Kolonien bilden. Die entsprechenden Kolonien wurden hinsichtlich der Deletion des Zielgens mittels Kolonie-PCR (3.2.3) durch genspezifische Primer verifiziert.

3.2.16 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die einzelsträngigen Nukleinsäuren wurden in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 bis zu einer Konzentration von 300 - 400 µM gelöst. Anschließend werden 7 - 10 nmol der zu hybridisierenden Einzelstränge in äquimolaren Mengen zusammen mit 10 mM MgCl₂ und 50 mM NaCl in ein gemeinsames 0.2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Hybridisierung der einzelsträngigen Nukleinsäuren erfolgt durch systematisches Erhitzen und langsames Abkühlen in einem Thermocycler (Mastercycler personal, EPPENDORF). Das nachfolgende Programm wurde für alle in dieser Arbeit erwähnten hybridisierten, doppelsträngigen Nukleinsäuren verwendet und ermöglichte eine basenspezifische Hybridisierung der involvierten Einzelstränge.

Thermocycler-Programm zur Hybridisierung von Nukleinsäuren.

		Temperatur [°C]	Dauer [min]
1.	<i>Initiale Denaturierung</i>	95	10
2.	<i>Rasches Abkühlen</i>	80	1
3.	<i>Schrittweises Abkühlen</i> <i>(Modifikation: je Zyklus)</i>	80 (-1°C / Zyklus)	1
4.	<i>Lagerung</i>	4 oder 16	∞

Der Schritt 3 wurde bis zum Erreichen einer Temperatur von 20 °C 60x wiederholt. Die Qualität der Hybridisierung kann gegebenenfalls mittels nativer PAGE (3.4.6) überprüft werden.

3.2.17 ^{32}P -Markierung kurzer Nukleinsäuren

Die für Bindungs- oder Aktivitätsstudien verwendeten kurzen (< 300bp) radioaktiv markierten Nukleinsäuren in Form von Sonden oder Substraten wurden ausschließlich mit dem Radionuklid ^{32}P markiert. Alle Markierungsreaktionen wurden auf enzymatischem Weg durchgeführt, wobei bei einer einfachen 5'-Phosphorylierung die T4-Polynukleotidkinase und bei Mehrfachmarkierung eine thermostabile DNA-Polymerase oder ein Klenow-Fragment verwendet wurde. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen sind im Folgenden detaillierter beschrieben.

Erzeugung von ^{32}P -markierten Nukleinsäuren für *electrophoretic mobility shift assays* und andere Bindungsexperimente

Doppelsträngige DNA-Sonden ($\leq 58\text{bp}$) wurden im Vorfeld aus zwei komplementären Einzelsträngen hybridisiert (3.2.16), wohingegen einzelsträngige DNA-Sonden ($\leq 58\text{b}$) direkt enzymatisch mittels T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende phosphoryliert wurden. Eine 260bp dsDNA-Sonde wurde mittels PCR erzeugt. Um die Effizienz der nachfolgenden Phosphorylierungsreaktion zu erhöhen, besitzen alle doppelsträngigen DNA-Sonden einen 5'-TA-Überhang, der im Zuge der Hybridisierungsreaktion oder im Fall der 260bp dsDNA-Sonde mittels NdeI-Verdau und anschließender Behandlung mit Alkalischer Phosphatase entsteht. In der darauf folgenden Phosphorylierungsreaktion wurden jeweils 10 - 50 pmol der Sonde in 20 bis 40 μl 70 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT pH 7.6 vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 30 $\mu\text{Ci} \gamma$ - ^{32}P ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase gestartet. Der Ansatz wurde 20 - 30 Minuten in einem Thermocycler (Mastercycler personal, EPPENDORF) bei 37 °C inkubiert und später durch Zugabe von 25 mM EDTA gestoppt.

Eine 260b lange ssDNA-Sonden wurde mittels asymmetrischer Amplifikation erzeugt. Die Amplifikation wurde unter Standardbedingungen durchgeführt, wobei im Gegensatz zu einer regulären PCR lediglich ein Primer im Ansatz vorhanden war. Als *template*-DNA wurde ein 260bp dsDNA-Fragment (ca. 0.1 pmol) verwendet. Die Markierung mit ^{32}P erfolgte durch Zugabe von 0.3 μM α - ^{32}P dCTP (3 Ci/ μmol) unter gleichzeitiger Verringerung der kalten dCTP Konzentration auf 0.1 mM im Reaktionsansatz.

Die markierten Nukleinsäuren wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.9) und anschließender Ethanol-Fällung (3.2.10) aus dem Ansatz isoliert.

Erzeugung von kurzen (< 50bp) ^{32}P -markierten und modifizierten Nukleinsäuren für Aktivitätsstudien

Die in dieser Arbeit verwendeten modifizierten und radioaktiv markierten Nukleinsäuren (<50bp) zur Untersuchung einer möglichen DNA-Glykosylaseaktivität wurden wie im Folgenden genauer beschrieben erzeugt. Die Integration einer modifizierten Base in einen Nukleinsäurestrang basiert auf dem Prinzip einer Primer-Verlängerungsreaktion, wobei das *template*-Oligonukleotid und der zu verlängernde Primer so konzipiert wurden, sodass stets zuerst das entsprechende basenmodifizierte Desoxynukleosidtriphosphat angefügt wurde. Hierbei wurde der Umstand ausgenutzt, dass sich manche Basenmodifikationen nicht nennenswert auf die basenspezifische Komplementarität im Verlauf der DNA-Polymerase-reaktion auswirken. Aufgrund dessen kann die zu untersuchende Basenmodifikation sehr spezifisch an einer vorbestimmten Position im DNA-Strang eingefügt werden. Allerdings ergibt sich dadurch ebenfalls die Einschränkung, dass nur solche Basenmodifikationen verwendet werden können, welche eine DNA-Polymerasereaktion nicht inhibieren. Um eine möglichst hohe Einbaurate des modifizierten Nukleotids zu erreichen, verlief die Primer-Verlängerungsreaktion zum einen in zwei Schritten und zum anderen wurde als DNA-Polymerase lediglich ein Klenow-Fragment ($3' \rightarrow 5'$ exo-) verwendet, welches keine 3'-Exonukleaseaktivität besitzt. Zunächst wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μl 2.5 pmol des *template*-Oligonukleotids und des zu verlängernden Primers in 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT pH 7.9 vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 40 μM des modifizierten Nukleotids und 5 U Klenow-Fragment gestartet. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend alle anderen für die Primer-Verlängerungsreaktion benötigten 2'-Desoxynukleosid-triphosphate (je Nukleotid 60 μM) und 75 μCi α - ^{32}P -dATP zugegeben und für weitere 5 - 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der verwendeten Oligonukleotide erfolgte die radioaktive Markierung mit α - ^{32}P -dATP stets an den beiden letzten Positionen des Nukleinsäurestrangs, welcher die Basemodifikation trägt. In diesem Kontext wurden einzelsträngige DNA-Substrate

durch Aufschmelzen und rasches Abkühlen (flüssiger Stickstoff) der doppelsträngigen DNA-Substrate erzeugt.

Die markierten Nukleinsäuren wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.9) und anschließender Ethanol-Fällung (3.2.10) aus dem Ansatz isoliert.

Erzeugung von kurzen (< 50bp) ^{32}P -markierten und mittels Psoralen-Derivaten quervernetzter Nukleinsäuren für Aktivitätsstudien

Die Quervernetzung beider DNA-Stränge eines DNA-Doppelstrangs wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Verwendung des photoreaktiven Psoralen-Derivats Methoxsalen erreicht. Methoxsalen kann nach Anregung mit UV-Licht eine kovalente Verbindung mit Thymin ausbilden. Dies kann dazu genutzt werden, um sequenzspezifisch eine intermolekulare Verknüpfung zwischen beiden DNA-Einzelsträngen zu erzeugen. Im konkreten Fall wurden beide Einzelstränge im Bereich der Basenabfolge dTdA verknüpft. Im Vorfeld wurde ein kurzes doppelsträngiger DNA-Fragment durch Hybridisierung (3.2.16) aus zwei Oligonukleotiden hergestellt. Im Reaktionsansatz wurden 25 µM des kurzen dsDNA-Fragments zusammen mit 600 µM Methoxsalen in 25 mM KP pH 7.5 bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 4 °C für 60 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt. Die dsDNA-Fragmente wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.9) und anschließender Ethanol-Fällung (3.2.10) aus dem Ansatz isoliert. Im Folgenden wurden die kurzen dsDNA-Fragmente am 5'-Ende mittels Phosphorylierung radioaktiv markiert. Hierzu wurden 20 pmol quervernetztes dsDNA-Fragment in 50 µl 70 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT pH 7.6 vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 30 µCi γ - ^{32}P ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase gestartet. Der Ansatz wurde 20 - 30 Minuten in einem Thermocycler (Mastercycler personal, EPPENDORF) bei 37 °C inkubiert und später durch Zugabe von 25 mM EDTA gestoppt.

Die markierten Nukleinsäuren wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.9) und anschließender Ethanol-Fällung (3.2.10) aus dem Ansatz isoliert.

3.2.18 Herstellung und Reinigung oxidiertener Nukleoside und Nukleotiden

In dieser Arbeit wurden oxidierte Nukleotide und Nukleoside als Substrate zur Untersuchung einer potentiellen Nukleosidphosphorylase- beziehungsweise Nukleotidphosphatase-Aktivität verwendet. Dabei wurden zunächst Nukleosidtriphosphate oder Nukleosidmonophosphate mittels Udenfriend-System (Kasai und Nishimura 1984) oxidiert. Im Gegensatz zur Fenton-

Reaktion (Pignatello et al. 2006) kann diese Art der Oxidation bereits unter relativ milden Bedingungen stattfinden, wodurch organische Moleküle lediglich oxidiert, aber ansonsten nicht durch weitere Nebenreaktionen zerstört werden. Das Udenfriend-System (Udenfriend et al. 1954) basiert wie die Fenton-Reaktion auf Fe(II)- und Fe(III)-Ionen, allerdings werden diese mittels EDTA chelatiert und in Kombination mit Ascorbinsäure ein zur Fenton-Reaktion vergleichbarer Oxidations-Reduktions-Zyklus ausgebildet. Die Oxidationsstärke des Udenfriend-Systems kann ebenfalls durch Zugabe von Wasserstoffperoxid erhöht werden (Kasai und Nishimura 1984, Udenfriend et al. 1954). Im Anschluss an die Oxidationsreaktion wurden die Nukleotide von den restlichen Bestandteilen durch Ionenaustauschchromatographie (*gravity flow*) getrennt. Die entsprechend oxidierten Nukleoside wurden in den nachgeschalteten Experimenten *in situ* durch Zugabe einer alkalischen Phosphatase erzeugt.

Die Oxidationsreaktion und die Reinigung wurden wie folgt durchgeführt. Es wurden 10 mM Nukleotid in 50 mM KP, 1.3 mM FeCl₂, 6.5 mM EDTA pH 6.8 vorgelegt. Anschließend wurden zunächst 50 mM Wasserstoffperoxid und zuletzt 14 mM Ascorbinsäure zugegeben. Der Ansatz wurde im Dunkeln bei 37 °C für 3 - 4 h geschüttelt. Am Ende der Oxidationsreaktion wurden die Nukleotide und die restlichen Bestandteile des Ansatzes mit Hilfe eines starken Anionenaustauschers (AG1-X8, quartäre Ammoniumverbindung) voneinander getrennt. Der gesamte Reaktionsansatz (500 µl) wurde mittels *gravity flow* über 100 µl AG1-X8 Säulenmaterial nach dem in Tabelle 3.1 angegebenen Elutionsprofil gereinigt und in nachfolgenden Experimenten auf ihre Rolle als mögliche Substrate von YbiB getestet.

Tabelle 3.1: Reinigungs- und Elutionsprofil zur Isolierung oxiderter Nukleotide mittels Ionenaustauschchromatographie im *gravity flow* Verfahren.

Lösung	Volumen [ml]	
Probe	0.5	Auftrag
ddH ₂ O	1.5	
0.1 M NaCl	0.5	Waschschrifte
0.05 M NaCl	1.5	
1 M NaCl	1.5	Elution

3.2.19 Herstellung von N7-Formyl-N7-Methyl-dGTP

Das zu 8-Oxo-dGTP strukturell verwandte N7-Formyl-N7-Methyl-dGTP (*ring opened* 7-Methyl-dGTP) wurde im Verlauf dieser Arbeit aus 7-Methyl-dGTP hergestellt. Hierzu wurden 5 mM 7 Methyl-dGTP in einer 330 mM NaOH-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der alkalische Ansatz durch Zugabe einer äquimolaren Menge an HCl neutralisiert. Das N7-Formyl-N7-Methyl-dGTP wurde zusammen mit oxidativ geschädigten Nukleotiden (3.4.12) als potentielles Substrat für YbiB getestet.

3.3 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 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 OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und parallel bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ zwischen 0.6 - 0.8 erreicht hatten, wurde einer Kultur zur Induktion der Genexpression 0.5 mM IPTG und gegebenenfalls zusätzlich noch 0.02% (w/v) L-Arabinose zugegeben. Die Kulturen wurden weiter bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 300 µl der Kultur entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 8000g, 4 °C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) geerntet. Die Pellets wurden in jeweils 350 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, 16000g, 4 °C, EPPENDORF Centrifuge 5415R) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 350 µl Aufschlusspuffer aufgenommen, die Aliquots beider Fraktionen 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.

3.3.2 Präparative Expression von *ybiB*, seinen Varianten, *alkA*, *mug*, *mutT* und *deoA*

E. coli *ybiB*-Wildtyp, alle weiteren *ybiB*-Varianten, sowie *alkA*, *mug*, *mutT* und *deoA* wurden in *E. coli* rekombinant exprimiert. Dazu wurde 1 l vorgewärmtes LB-Selektivmedium mit einer frischen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm unter Beobachtung der Zelldichte inkubiert. Sobald die Kultur die gewünschte Zelldichte erreicht hatte, wurde die Genexpression durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde über Nacht

bei der für das jeweilige Protein optimalen Temperatur weiter inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 rpm, 4 °C, Beckman Avanti J-26S XP, JLA-8.1 Rotor) und das Zellpellet in 30 - 40 ml Aufschlusspuffer I (2.8.3) 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. Der YbiB-Wildtyp, seine Varianten, AlkA, Mug, MutT und DeoA wurden alle als Fusion mit einem C-terminalen *his₆-tag* nach den in Tabelle 3.2 angegebenen Bedingungen exprimiert und mittels Metallchelataffinitätschromatographie (3.3.5) gereinigt.

Tabelle 3.2: Übersicht der Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit gereinigten Proteine.

Konstrukt	Plasmid	Zelltyp	Bedingungen	
YbiB R12A K14A R18A	pQE60	M15	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG
			Temperatur	37 °C
YbiB H204TAG	pQE60	M15 [pEVOL] oder M15 ΔybiB [pEVOL]	Medium	LB oder TB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG und L-Arabinose
			Temperatur	25 °C
YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A	pQE60	M15	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG
			Temperatur	25 °C
YbiB	pQE60	M15 oder M15 ΔmutT	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG
			Temperatur	37 oder 30 °C
AlkA	pET21a	BL21(DE3) [pLysS]	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 1.5 - 2.0
			Induktor	IPTG
			Temperatur	37 °C
YbiB W173TAG	pQE60	M15 ΔybiB [pEVOL]	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG und L-Arabinose
			Temperatur	25 °C
YbiB R178TAG	pQE60	M15 ΔybiB [pEVOL]	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG und L-Arabinose
			Temperatur	25 °C
MUG	pET21a	BL21(DE3) [pLysS]	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 1.5 - 2.0
			Induktor	IPTG
			Temperatur	30 °C
YbiB E9C W277F	pQE60	M15	Medium	LB
			Induktion	OD ₆₀₀ 0.6 - 0.8
			Induktor	IPTG
			Temperatur	30 °C

YbiB E9C K93W W173F W277F	pQE60	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
YbiB E9C W173F E206W W277F	pQE60	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
YbiB E9C W173F H204W W277F	pQE60	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
YbiB E9C W173F E263W W277F	pQE60	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
YbiB H16W K93C W173F W277F	pQE60	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
YbiB R18W K93C W173F W277F	pQE60	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
MutT	pET21a	BL21(DE3) [pLysS]	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 30 °C
DeoA	pQE70	M15	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 37 °C
YbiB H16TAG	pQE60	M15 $\Delta ybiB$ [pEVOL]	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB oder TB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG und L-Arabinose 25 °C
YbiB D21TAG	pQE60	M15 $\Delta ybiB$ [pEVOL]	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB oder TB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG und L-Arabinose 25 °C
YbiB E248TAG	pQE60	M15 $\Delta ybiB$ [pEVOL]	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB oder TB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG und L-Arabinose 25 °C
YbiB E263TAG	pQE60	M15 $\Delta ybiB$ [pEVOL]	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB oder TB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG und L-Arabinose 25 °C

YbiB E290TAG	pQE60	M15 Δ <i>ybiB</i> [pEVOL]	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB oder TB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG und L-Arabinose 25 °C
YbiB L40E I51E	pQE60	M15 oder M15 Δ <i>mutT</i>	Medium Induktion Induktor Temperatur	LB OD_{600} 0.6 - 0.8 IPTG 25 °C

3.3.3 Präparative Expression einer YbiB-Variante unter Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure *para*-Benzoyl-L-phenylalanin (pBPA)

Das von Wang und Schultz (2001) entwickelte *in vivo*-Verfahren zur gezielten Integration von nichtnatürlichen Aminosäuren in rekombinante Proteine, wurde dazu verwendet, um die photoreaktive Aminosäure pBPA in YbiB an verschiedenen Positionen einzufügen (Abbildung 3.5). Die nichtnatürliche Aminosäure wird dabei zunächst durch eine orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase auf eine Suppressor-tRNA übertragen. Diese Suppressor-tRNA erkennt spezifisch das *amber*-Stoppcodon TAG und fügt so gezielt bei der Translationsreaktion am Ribosom das pBPA in die Aminosäuresequenz ein. Das *amber*-Stoppcodon TAG wird in *E. coli* nur sehr selten in essentiellen Genen verwendet (Xie und Schultz 2005), weshalb dessen Suppression die Translation anderer Gene in *E. coli* lediglich geringfügig beeinflusst.

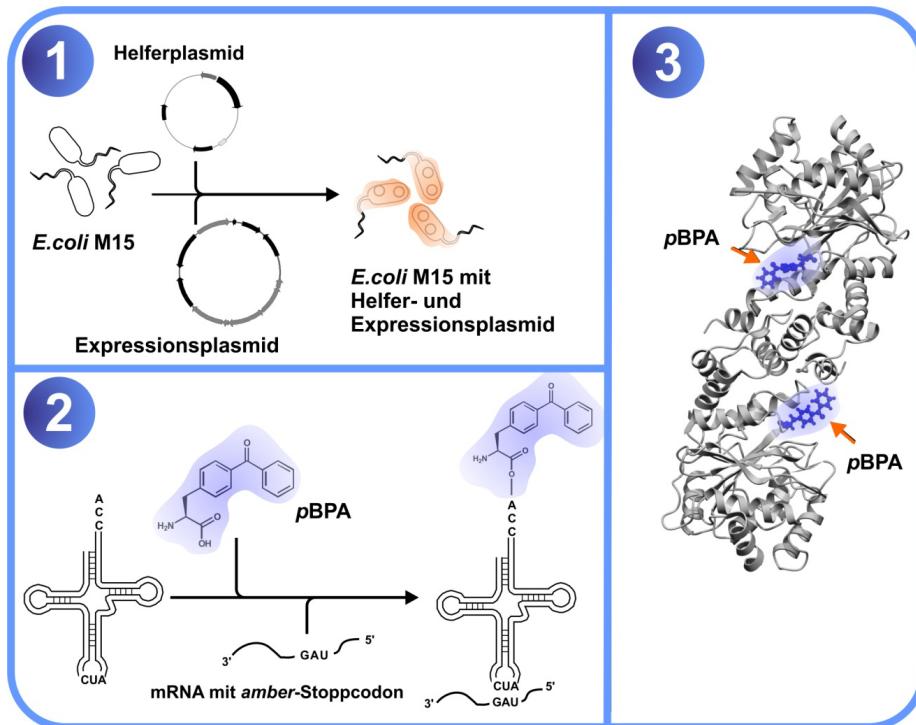


Abbildung 3.5: Prinzip des Einbaus einer nichtnatürlichen Aminosäure *in vivo*. Dieses Schema zeigt exemplarisch den Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure *para*-Benzoyl-L-phenylalanin (*p*BPA) in das rekombinante YbiB-H204*p*BPA, in welchem das Basentriplett von H204 gegen das *amber*-Stoppcodon TAG ausgetauscht wurde. (1) Hierzu wird zunächst ein entsprechender *E. coli*-Expressionstamm, im Beispiel M15, sowohl mit dem jeweiligen Expressionsplasmid, als auch mit einem Helferplasmid, welches die orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase und tRNA kodiert, transformiert. (2) Im Anschluss kann nach der Induktion beider Plasmide der Einbau durch die mit *p*BPA beladene tRNA, welche das *amber*-Stoppcodon erkennt, am Ribosom erfolgen. (3) Beim erfolgreichen Einbau von *p*BPA in die Aminosäuresequenz erhält man das dimere YbiB-H204*p*BPA mit *p*BPA anstelle des Histidins an der gewählten Position 204.

Die in dieser Arbeit verwendeten M15 *E. coli*-Expressionsstämme mit (Schneider 2011) oder ohne (diese Arbeit) *ybiB*-Gen wurden so transformiert, sodass dieser die nötige Aminoacyl-tRNA-Synthetase, die Suppressor-tRNA und den Expressionsvektor besitzen. Das Expressionsplasmid kodiert eine entsprechende *ybiB*-Variante in der das jeweilige Basentriplett gegen das *amber*-Stoppcodon ausgetauscht wurde.

Die Expression dieser rekombinanten YbiB-Varianten mit *p*BPA wurde entweder in LB- oder TB-Medium wie folgt durchgeführt.

Expression rekombinanter YbiB-*p*BPA-Varianten in LB-Medium

Im LB-Medium der Expressionskultur muss die nichtnatürliche Aminosäure *p*BPA letztlich in einer Endkonzentration von 1 mM vorliegen. Aus diesem Grund wurde vorab eine entsprechende Menge *p*BPA in möglichst wenig 1 M HCl (steril filtriert) vollständig gelöst und

unmittelbar danach ins Medium gegeben. Damit der pH-Wert des LB-Mediums wieder im neutralen Bereich lag, wurde mit 1 M NaOH (steril filtriert) neutralisiert. Nachdem das Medium wieder einen pH-Wert von 7 - 8 erreicht hatte, wurden die beiden Antibiotika Ampicillin (Expressionsplasmid; 2.6) und Chloramphenicol (Helperplasmid, pEVOL; 2.6) zugegeben.

Die Präparative Expression erfolgte in einem Volumen von 1 l, wobei die Kolben zunächst mittels einer 50 ml üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.8 bei 37 °C unter Schütteln (120 - 150 rpm) inkubiert wurden. Die Kolben wurden vor Induktion für 20 Minuten bei 25 °C geschüttelt, um die Kulturen für die nachfolgende Expression auf 25 °C zu temperieren. Im Anschluss an die Induktion des Helperplasmids mit 0.02% L-Arabinose und des Expressionsplasmids mit 0.5 mM IPTG, erfolgte die Expression üN bei 25 °C unter Schütteln.

Expression rekombinanter YbiB-pBPA-Varianten in TB-Medium

Zur Kostenersparnis kann die Menge der eingesetzten nichtnatürlichen Aminosäure durch die Verkleinerung des Expressionsvolumens verringert werden, allerdings muss in diesem Fall auf ein reichhaltigeres Nährmedium wie zum Beispiel *terrific broth* (TB) zurückgegriffen werden. Dieses nährstoffreiche Medium ermöglicht *E. coli* höhere Zelldichten zu erreichen, wodurch das kleinere Expressionsvolumen wieder ausgeglichen wird. Folglich kann auf diese Weise die Menge an eingesetzter nichtnatürlicher Aminosäure ohne größere Auswirkung auf die Proteinausbeute verringert werden (Liu et al. 2010). Hierzu wurde wie folgt vorgegangen.

Aus einer üN-Kultur wurde 1 l LB-Medium auf OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und unter Schütteln (120 – 150 rpm) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.8 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (20 min, 4000 rpm, 4 °C, Beckman Avanti J-26S XP, JLA-8.1 Rotor) geerntet. Parallel wurde eine entsprechende Menge pBPA in möglichst wenig 1 M HCl gelöst und zu 100 ml TB-Medium bis zu einer Endkonzentration von 1 mM gegeben. Anschließend wurde das TB-Medium mit einer äquivalenten Menge 1 M NaOH wieder neutralisiert, Antibiotika zugegeben und darin das zuvor geerntete Zellpellet resuspendiert. Die Expression der YbiB-pBPA-Varianten wurde ebenfalls durch Zugabe von 0.02% L-Arabinose und 0.5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte üN bei 25°C unter Schütteln.

Ernte und Zellaufschluss der M15 Expressionszellen

Am folgenden Tag wurden die Zellen mittels Zentrifugation (20 min, 4000 rpm, 4 °C, Beckman Avanti J-26S XP, JLA-8.1 Rotor) geerntet und das Zellpellet in 30 - 40 ml Aufschlusspuffer I (2.8.3) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall (BRANSON Sonifier 250D, Makrospitze), gepulst bei einer Amplitude von 40% für 2.5 min (Pulsintervall 15 Sekunden) auf Eis. Zur Abtrennung der Zellreste wurde das Lysat erneut zentrifugiert (60 min, 13500 rpm,

4 °C, SORVALL SS34-Rotor). Der Überstand wurde abgenommen und das Zielprotein anhand dessen C-terminalen *his₆-tag* mittels Metallchelataffinitätschromatographie (ÄKTA Basic 10 better System, GE HEALTHCARE) gereinigt (3.3.5).

3.3.4 Photoinduzierte Quervernetzung einiger YbiB-Varianten mit Nukleinsäuren über pBPA

Proteine, die die nichtnatürliche Aminosäure *pBPA* tragen, können durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 366$ nm mit anderen organischen Molekülen, wie Proteinen oder Nukleinsäuren kovalent verknüpft werden (Kauer et al. 1986, Dorman und Prestwich 1994, Chin et al. 2002). Als Reaktionspartner von *pBPA* können dabei alle CH-Bindungen dienen, die sich in einem Abstand von etwa 3 Å zur nichtnatürlichen Aminosäure befinden (Abbildung 3.6).

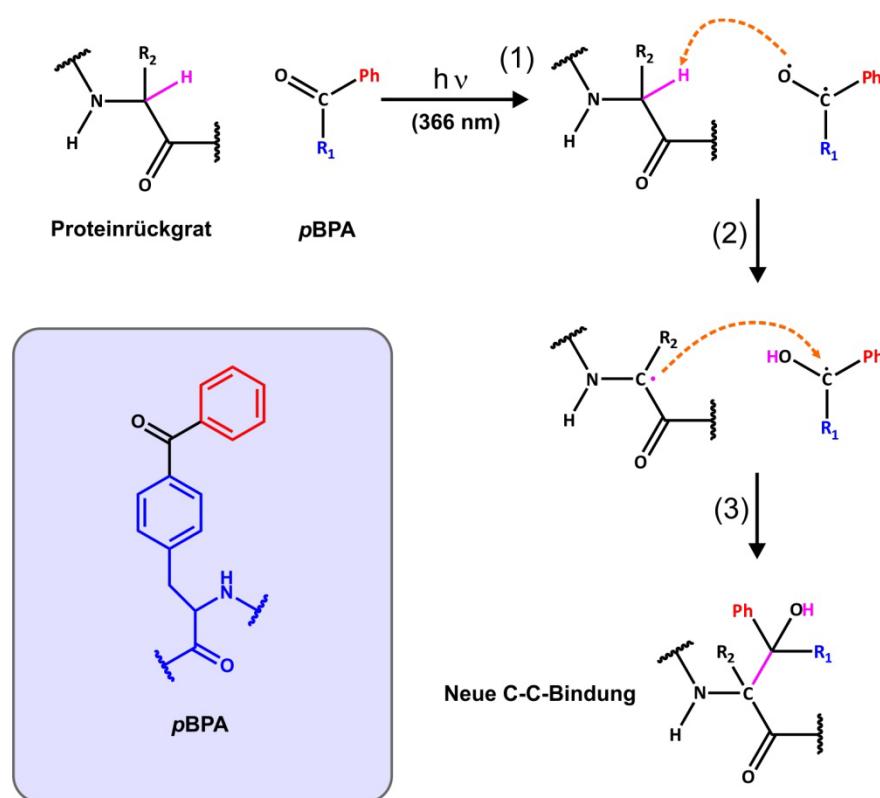


Abbildung 3.6: Reaktionsmechanismus der photoinduzierten Quervernetzung durch *pBPA*. Dargestellt ist ein *pBPA*-Rest, der rekombinant in die Primärsequenz eines Proteins eingefügt wurde (unten links) und mit dem Rückgrat eines anderen Proteins kovalent Verknüpft wird. Im eigentlichen Reaktionsschema ist der *pBPA*-Rest in vereinfachter Form abgebildet. Durch Absorption eines Photons (1) bei etwa 366 nm werden die π -Elektronen angeregt, wodurch zwei Radikale entstehen. (2) Das halbbesetzte n-Orbital des Sauerstoffatoms verhält sich elektrophil und interagiert mit einer schwachen C-H- σ -Bindung (Magenta) unter Abstraktion des Wasserstoffatoms (hier exemplarisch das Wasserstoffatom des α -Kohlenstoffatoms einer Aminosäure aus einem Protein). (3) Die entstandenen Ketyl- und Alkyl-Radikale rekombinieren zu einer neuen C-C- σ -Bindung (Dorman und Prestwich 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *pBPA* genutzt, um YbiB mit verschiedenen Nukleinsäuren kovalent zu verknüpfen. Die auf diese Weise erzeugten kovalenten YbiB-DNA-Komplexe wurden entweder in Kristallisationsexperimenten oder zur weiteren lokalen Eingrenzung der Nukleinsäurebindestelle verwendet.

Für die Kopplungsreaktion wurden 30 µM einer YbiB-*pBPA*-Variante und 60 µM Nukleinsäure in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 vorgelegt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend entweder in eine 96-well-Platte zu je 20 µl oder in Petrischalen (92x16 mm) zu je 13 ml aliquotiert und für 15 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt. Anschließend wurden alle Proben wieder vereinigt und gegebenenfalls für nachfolgende Experimente oder weitere Reinigungsschritte bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.5 Metallchelataffinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mittels Metallchelataffinitätschromatographie 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 werden. Die drei noch freien Koordinationsstellen der Metallionen stehen weiterhin für die Komplexierung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung.

Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem *his₆-tag* 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-Seitenketten des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren.

Die Reinigung der YbiB Varianten, AlkA, Mug, MutT und DeoA wurden nach folgender Methode durchgeführt.

Flussrate: 5 ml/min

Äquilibrierung: 50 mM KP pH 7.5, 300 mM KCl,
10 mM Imidazol für 5 CV

Beladen:	Probe in 50 mM KP pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Waschen:	50 mM KP pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol für 10 CV
Eluieren:	10 - 750 mM Imidazol über 20 CV
Reinigung der Säule:	1 M Imidazol für 10 CV
Spülen und Lagerung der Säule:	spülen mit 10 CV H ₂ O; 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, welche das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Dialyse (3.3.10) in den gewünschten Puffer überführt.

3.3.6 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie (IEC, *Ion Exchange Chromatography*) 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 Änderung des pH-Wertes. Bei Trägermaterialien, die selbst positive Ladungen aufweisen und in der Lage sind Anionen zu binden, spricht man von Anionenaustauschern, während man bei negativ geladenen Trägermaterialien, welche Kationen binden können, von Kationenaustauschern spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ionenaustauschchromatographie dazu verwendet, um kovalente YbiB-DNA-Komplexe von nicht miteinander verknüpften YbiB-Proteinen und Nukleinsäuren zu trennen. Da sich der kovalente YbiB-DNA-Komplex, ungebundenes YbiB und freie Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Nettoladungen deutlich voneinander unterscheiden, können diese unter optimalen Bedingungen voneinander getrennt werden. Somit können nach einer UV-vermittelten Verknüpfungsreaktion (3.3.4) kovalente YbiB-DNA-Komplexe besonders effizient von nichtverknüpften YbiB-Proteinen getrennt werden. Die auf diese Weise gereinigten kovalenten Komplexe enthalten allerdings noch zu einem gewissen Anteil ungebundene Nukleinsäuren, daher ist im Anschluss an die Ionenaustauschchromatographie ein weiterer Reinigungsschritt in Form der präparativen Größenausschlusschromatographie (3.3.7) nötig. Bevor die Ansätze auf das Chromatographiesystem aufgetragen wurden, wurden diese nach

Zugabe von 100 mM KP pH 7.5 noch für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, wodurch sich nichtkovalente Komplexe auflösen und sich somit die Trennleistung verbessert. In Abhängigkeit der zu trennenden Menge wurde entweder die Anionenaustauschersäule MonoQ 5/50 GL oder MonoQ 16/10 (GE HEALTHCARE) verwendet. Alle Reinigungen wurden an der Chromatographieanlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach den in Tabelle 3.3 aufgelisteten Methoden durchgeführt.

Tabelle 3.3: Bedingungen zur Ionenaustauschchromatographie.

	MonoQ 5/50 GL	MonoQ 16/10
Säulenvolumen (CV)[ml]	1	20
Flussrate [ml/min]	1	5
Äquilibrierung	100 mM KP pH 7.5 (5 CV)	100 mM KP pH 7.5 (5 CV)
Beladung	Probe in 50 mM Tris/HCl, 100 mM KP pH 7.5	Probe in 50 mM Tris/HCl, 100 mM KP pH 7.5
Waschen	100 mM KP pH 7.5 (10 CV)	100 mM KP pH 7.5 (10 CV)
Eluieren	0 - 800 mM NaCl (50 CV)	0 - 400 mM NaCl (25 CV) für ssDNA 0 - 800 mM NaCl (25 CV) für dsDNA
Reinigung	1M NaCl (10 CV)	1M NaCl (10 CV)
Spülen und Lagerung der Säule	Spülen: ddH ₂ O (10 CV) Lagerung: 20% Ethanol	Spülen: ddH ₂ O (10 CV) Lagerung: 20% Ethanol

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 und mittels präparativer Größenausschlusschromatographie (3.3.7) weiter gereinigt.

3.3.7 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC, *Size-Exclusion Chromatographie*) ist in der Lage Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Größe und Form voneinander zu trennen. In der SEC werden als Säulenmaterial poröse, kugelförmige Partikel aus Dextran oder Agarose verwendet, die ihrerseits zahlreiche Kanäle und Poren besitzen. Demzufolge können sich je nach Molekülgröße und Form die Moleküle entweder nur zwischen den Partikeln der Matrix bewegen oder sogar in diese eindringen. Da kleine Moleküle somit ein größeres relatives Diffusionsvolumen wahrnehmen, benötigen sie deutlich länger, um das gesamte Säulenmaterial zu durchwandern als größere Moleküle. Dies spiegelt sich ebenfalls in der relativen Retentionszeit wieder, wobei große Moleküle zuerst und kleine Moleküle später von der Säule eluieren.

Die SEC wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um eine möglichst reine und homogene Präparation eines kovalenten YbiB-DNA-Komplexes für diverse Kristallisationsexperimente zu erhalten. Der zuvor bereits mittels Ionenaustauscher gereinigte Ansatz (3.3.6) wurde über die Chromatographie Anlage ÄKTAprime plus, die Gelfiltrationssäule High Load 26/60 Superdex 200 und einen isokratischen Elutionsprofil (1.5 CV, 50 mM Tris/HCl 2 mM KP pH 7.5) weiter aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (3.4.3) analysiert und Fraktionen mit reinen kovalenten YbiB-DNA-Komplexen wurden vereinigt.

3.3.8 Kristallisierungsansätze

Die Identifizierung molekularer Wechselwirkungen in Protein-Protein- oder Protein-DNA-Komplexen erfolgt in vielen Fällen anhand entsprechender Komplex-Strukturen, die mittels NMR oder Röntgenkristallographie gewonnen wurden. Anhand dieser Techniken ist es möglich die Struktur von Makromolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren detailliert als dreidimensionales Objekt darzustellen. Da teilweise Auflösungen von bis zu 1 Å erreicht werden, kann selbst die räumliche Ausrichtung von Aminosäureseitenketten eindeutig bestimmt werden. Dieser hohe Informationsgehalt kann dazu beitragen, Aufschluss über inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen zu geben. In dieser Arbeit wurde die Röntgenkristallographie dazu verwendet, die Interaktion zwischen YbiB und Nukleinsäuren auf molekularer Ebene genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht verschiedene kovalente YbiB-DNA-Komplexe mittels Dampfdiffusion im *hanging drop*-Verfahren zu kristallisieren. Bei dieser Vorgehensweise werden wenige Mikroliter der zuvor gereinigten Proteinlösung auf einen Glasträger gegeben und mit einem gleichen Volumen einer Reservoir-Lösung gemischt. Der Glasträger mit dem Tropfen wird anschließend so über dem Reservoir aufgelegt, sodass der Tropfen und das Reservoir luftdicht abgeschlossen sind. Dieser Vorgang wurde entweder manuell oder unter Verwendung des Pipettierroboters Mosquito (TTP LABTECH LIMITED, Melbourn GB) durchgeführt. Da die Lösung im Reservoir höher konzentriert ist als die Lösung des Tropfens, diffundiert langsam das Wasser aus dem Tropfen. Dadurch steigt die Konzentration aller im Tropfen enthaltenen, nicht verdampfbaren Bestandteile stetig an, was unter Umständen zur Kristallisation von Proteinen oder Nukleinsäuren führt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Reservoir-Lösungen in Form von kommerziellen Kristallisierungs-Screens oder eigener Optimierungsansätze sind im Folgenden für jeden kovalenten YbiB-DNA-Komplex separat aufgelistet. Die genauen Zusammensetzungen der optimierten Kristallisierungsbedingungen können Anhang 7.2 entnommen werden. Es wurden stets Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 20 mg/ml verwendet und alle Kristallisierungsansätze wurden konstant bei 18 °C gelagert.

Kristallisationsexperimente mit kommerziellen *Screens* wurden stets im 96-well Format und unter Verwendung des Pipettierroboters Mosquito (TTP LABTECH LIMITED, Melbourn GB) durchgeführt. Hierzu wurden 200 µl der jeweiligen Reservoir-Lösung manuell in die einzelnen wells pipettiert. Anschließend wurden je 0.5 µl Reservoir- und Proteinlösung mittels Pipettierroboter auf dem verschließbaren Deckel der 96-well-Platte gemischt. Nachdem alle Bedingungen angesetzt waren, wurde der Deckel mit den Protein-Reservior-Tropfen vorsichtig auf die 96-well-Platte aufgebracht und diese somit luftdicht verschlossen. Kristallisationsexperimente mit manuell optimierten Kristallisationsbedingungen wurden wie folgt durchgeführt. In 15-well-EasyXtal Platten (Qiagen) wurden in jedes well 500 µl der optimierten Kristallisationsbedingung als Reservoir-Lösung pipettiert. Im Anschluss wurden auf der Innenseite der Deckel jeweils 1 µl Reservoir- und Proteinlösung gemischt. In manchen Fällen wurde zusätzlich auf demselben Deckel eine Mischung aus 1 µl Reservoir-Lösung und 1 µl des Protein-Lagerungspuffers als entsprechende Kontrolle aufgetragen. Der Deckel wurde auf das jeweilige well geschraubt und dadurch dieses luftdicht abgeschlossen.

Bedingungen zur Kristallisation eines kovalenten 20b dT H2O4pBPA Komplexes.

Kommerzielle Kristallisations-Screens

MIDAS™ MD1-59, Molecular Dimensions

Natrix HAT HR2-131, Hampton Research

Kerafast EE0001 (A-D), Kerafast

Morpheus (E-H), Molecular Dimensions

Optimierte Kristallisations-Screens

MIDAS™ Bedingung D5 (7.2; Tabelle 7.1)

Morpheus Bedingung G4(1) (7.2; Tabelle 7.2)

Morpheus Bedingung G4(2) (7.2; Tabelle 7.3)

Bedingungen zur Kristallisation eines kovalenten 22bp dsDNA H204pBPA Komplexes.

Kommerzielle Kristallisations-Screens

MIDASTM MD1-59, Molecular Dimensions

Morpheus (E-H), Molecular Dimensions

Optimierte Kristallisations-Screens

Morpheus Bedingung G4(2) (7.2; Tabelle 7.3)

MIDASTM Bedingung C2 (7.2; Tabelle 7.4)

MIDASTM Bedingung D8 (7.2; Tabelle 7.5)

3.3.9 Maleimid vermittelte Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine

Die Maleimid-Kopplung beruht auf der spezifischen Reaktion zwischen Maleimid und Thiol-Gruppen, wodurch auf schonende Weise Fluoreszenzfarbstoffe kovalent über Cystein-Reste an Proteine gebunden werden können. Im Zuge dieser Arbeit wurden mittels Maleimid-Kopplung verschiedene YbiB-Varianten für spätere FRET-Experimente mit dem Fluorophor N-7-Dimethylamino-4-Methylcoumarin-3-yl-Maleimid (DACM) markiert.

In einem ersten Schritt wurden zunächst 50 - 100 µM Protein in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 zusammen mit 20 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt sollten alle lösungsmittelexponierten Cysteine in ihrer reduzierten Form vorliegen. Anschließend wurden 200 µM DACM (gelöst in DMSO) unter rühren zugegeben und der Kopplungsansatz für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Ansatz befindliches nicht gebundenes DACM wurde mittels präparativer NAP-5 Gelfiltrationssäulchen und anschließender Dialyse (3.3.10) gegen 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 entfernt.

3.3.10 Dialyse von Proteinlösungen

Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden nach der chromatographischen Reinigung und ebenso 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 Dialyseschläuch (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 Zentrifugenröhrchen über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben durch Ultrafiltration (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 3220g, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Ausgangsvolumen der zu konzentrierenden Proteinlösung und dem gewünschten Endvolumen.

3.3.12 Lagerung gereinigter Proteine

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

3.4 ANALYTISCHE METHODEN

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie

Im UV-Bereich von 250 - 300 nm absorbieren zum einen die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cystine (Disulfidbrücken gebildet durch Cysteine). Anhand der Anzahl dieser Aminosäuren kann der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) und bei bekanntem Molekulargewicht der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0.1\%} A_{280}$) des Proteins mit folgenden Gleichungen berechnet werden (Pace et al. 1995).

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

Gleichung 3.2: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} .

$$^{1.0\%} A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{M_R}$$

Gleichung 3.3: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0.1\%} A_{280}$.

Anhand des Lambert-Beer'schen-Gesetzes kann über folgende Formel die Proteinkonzentration berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{d \cdot 1.0\% A_{280}}$$

Gleichung 3.4: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $0.1\% A_{280}$.

- c: Konzentration [mg/ml]
- 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. Zudem sollte der Quotient A_{280}/A_{250} mindestens 1.8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, da diese auf Lichtstreuung verursacht durch Aggregation hinweist.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Eine weitere quantitative Methode zur Proteinbestimmung in wässriger Lösung ist der Bradford-Test. Bei dieser Methode wird der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G250* eingesetzt, welcher unspezifisch an Proteine bindet, wobei sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm (Bradford 1976) verschiebt. Die Interaktion zwischen dem Farbstoff und dem Protein beruht vorwiegend auf den 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-Test wurde zur Konzentrationsbestimmung der YbiB-Varianten mit der eingebauten nichtnatürlichen Aminosäure *pBPA* verwendet. Dies ist notwendig, da die nichtnatürliche Aminosäure im Bereich von 260 bis 280 nm ebenfalls absorbiert und so die spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration in unbekanntem Maße verfälscht.

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

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

Gleichung 3.5: Berechnung der Proteinkonzentration c [mg/ml] nach Bradford.

- A₅₉₅: Absorption bei 595 nm
- y₀: y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade
- m: Steigung der Kalibriergerade

3.4.3 SDS-Polyacrylamidgeleelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamidgeleelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung 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 13.5%-ige Polyacrylamidgele verwendet (2.8.4). 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 µg/mm². 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 im Gel bis zu einer Menge von 10 - 0.1 ng/mm² nachzuweisen. Der Färbeprozess beruht dabei auf verschiedenen Oxidationszuständen von Silberionen, die an die Aminosäureketten des Proteins gebunden werden.

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel zweimal je 30 min in Fixierlösung I und anschließend für 60 min in Fixierlösung II geschwenkt. Das Gel wurde nun dreimal für jeweils 15 min mit ddH₂O gewaschen und im Folgenden für 60 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 (ca. 8 - 15 min). Die

Reaktion wurde durch Schütteln in 50 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde das Gel in ddH₂O gewaschen (Heukeshoven und Dernick 1988).

3.4.6 *Electrophoretic mobility shift assay*

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) wird dazu verwendet, um die Interaktion zwischen Proteinen und Nukleinsäuren zu untersuchen (Hellman und Fried 2007). Dabei führt die Protein-Nukleinsäure-Komplexbildung zu einer verringerten elektrophoretischen Migrationsgeschwindigkeit der im Komplex enthaltenen Nukleinsäure im Vergleich zur ungebundenen Nukleinsäure. Anhand dieser Beobachtung kann die Affinität eines Protein-Nukleinsäure-Komplexes bestimmt werden, indem die zuvor markierte Nukleinsäure zusammen mit einer steigenden Menge Protein inkubiert wird. Nach einstellen des Gleichgewichts werden die entstandenen Komplexe mittels Elektrophorese getrennt und im Anschluss die Banden der gebundenen und freien Nukleinsäure je nach verwendeter Markierungsmethode detektiert und quantifiziert.

In dieser Arbeit wurden alle verwendeten Nukleinsäuren im Vorfeld mit ³²P markiert (3.2.17). Es wurden immer 0.1 - 0.3 nM der markierten Sonde mit unterschiedlichen Mengen YbiB-Wildtyp in 50 mM Tris/HCl, 2 mM pH 7.5 gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Proben auf ein natives 6- oder 10%-iges Polyacrylamidgel (2.8.4) in 1xTAE pH 7.0 geladen und mittels Elektrophorese die vorliegenden Bestandteile getrennt. Die Banden der gebundenen und freien Nukleinsäure wurden mittels Autoradiographie (Cyclone Phosphor-Imager, PerkinElmer Life Sciences) visualisiert. Im Anschluss wurden die Banden der freien Nukleinsäure mittels OptiQuant Version 3.0 (PerkinElmer Life Sciences) ausgewertet, wobei die Intensität der Bande gegen die Gesamtintensität der Probenspur normalisiert wurde. Aus den normalisierten Werten der freien Nukleinsäure wurde indirekt der Anteil der gebundenen Nukleinsäure (Y) bestimmt, dieser gegen die YbiB-Wildtyp Konzentration (x) aufgetragen und unter Anpassung der Hill-Gleichung (Gleichung 3.6) (Hill 1910) an die Datenpunkte der jeweilige apparette K_D-Wert berechnet. Der Parameter a in Gleichung 3.6 steht für die maximal mögliche Signalstärke, somit ergibt sich im vorliegenden Kontext a = 1. Des Weiteren ist es möglich durch eine genauere Untersuchung der Datenpunkte im Übergangsbereich den Hill-Koeffizient (n) relativ einfach zu bestimmen. Hierzu wird Gleichung 3.6 in Gleichung 3.7 umgeformt und anschließend die Werte von Y/(1-Y), als auch die YbiB-Konzentration (x) im Übergangsbereich logarithmisch in Form eines Hill-Diagramms aufgetragen. Die aus dem Diagramm abgeleitete Geradensteigung entspricht dem Hill-Koeffizient (n).

$$Y = \frac{a x^n}{K_D^n + x^n}$$

Gleichung 3.6: Hill-Gleichung zur Bestimmung der Affinität zweier Interaktionspartner zueinander.

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log x - \log K_D$$

Gleichung 3.7: Gleichung zur Bestimmung des Hill-Koeffizienten im Übergangsbereich.

3.4.7 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde verwendet, um die Bindung unterschiedlicher Nukleinsäuren an verschiedene YbiB-Varianten zu untersuchen. Um Interaktionen mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachten zu können, muss sich im Zuge der Bindung die Umgebung eines Fluorophors ändern. Diese Änderungen sind entweder direkt auf die Bindung oder auf dadurch induzierte Konformationsänderungen zurückzuführen. Die Interaktion kann sich sowohl auf das Emissionsmaximum, als auch auf die Quantenausbeute des Fluorophors auswirken und letztlich eine Signaländerung bewirken (Schmid 1997). Als Fluoreszenzsignal dient hierbei entweder die intrinsische Proteinfluoreszenz, hervorgerufen durch Tryptophan und Tyrosin, oder das extrinsische Fluoreszenzsignal eines Fluoreszenzfarbstoffes.

Die Bindung unterschiedlicher Nukleinsäuren an YbiB-Wildtyp und einiger YbiB-Varianten wurde anhand der intrinsischen Proteinfluoreszenz oder der Fluoreszenz des Farbstoffes Dansylchlorid untersucht. Die Messungen wurden alle in einem JASCO FP-6500 Fluoreszenzspektrometer durchgeführt.

Sofern die intrinsische Proteinfluoreszenz als Signal verwendet wurde, wurden stets 2 µM einer YbiB-Variante in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 vorgelegt, die Küvette auf 25 °C temperiert und zum Ansatz unterschiedliche Nukleinsäuren hinzu titriert. Dabei wurde die Proteinfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und das emittierte Licht bei 340 nm detektiert. Im Anschluss wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten um den inneren Filtereffekt, der durch die Zugabe der Nukleinsäuren hervorgerufen wird, korrigiert. Hierzu wurde die Steigung der Fluoreszenzabnahme nach Erreichen der Sättigung bestimmt. Die Affinität der verschiedenen Nukleinsäuren gegenüber den YbiB-Varianten wurde durch Auftragung der korrigierten Fluoreszenzintensität gegen die Nukleinsäurekonzentration und anschließendes anpassen von Gleichung 3.8 (Reinstein et al. 1990) an die Messdaten bestimmt.

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \frac{([A]_0 + [B]_0 + K_D) - \sqrt{([A]_0 + [B]_0 + K_D)^2 - 4[A]_0[B]_0}}{2[A]_0}$$

Gleichung 3.8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der Konzentration beider Interaktionspartner.

F: korrigierte Fluoreszenzintensität

F_0 : Startwert der korrigierten Fluoreszenzintensität

F_{max} : korrigierte Fluoreszenzintensität in Sättigung

$[A]_0$: Konzentration der vorgelegten YbiB-Variante

$[B]_0$: Konzentration der zugegebenen Nukleinsäure

Das Fluoreszenzsignal von Dansylchlorid wurde verwendet, um den Bindeort vom YbiB-Wildtyp und der monomeren YbiB-Variante I40E L51E auf einem Nukleinsäurefragment relativ zu dort eingebauten Fehlern qualitativ zu lokalisieren. Die relative Lokalisierung ist möglich, da die Dansyl-Gruppe sehr sensitiv auf Änderungen in seiner Umgebung reagiert. So führt die Interaktion mit Proteinen (Chen 1967) zu einer Blauverschiebung des Emissionsspektrums und zugleich zu einer signifikanten Erhöhung der Quantenausbeute. Da dieser Effekt mit der räumlichen Distanz abnimmt, kann dadurch qualitativ eine Aussage über die relative Distanz zwischen einer Dansyl-Gruppe und einem Protein, welches an eine Nukleinsäure bindet, getroffen werden, sofern die Nukleinsäure mit einer Dansyl-Gruppe markiert wurde. In diesem Kontext wurden einzel- oder doppelsträngige DNA-Sonden eingesetzt, die nur an einem 5'-Ende eine Dansyl-Gruppe trugen. Die kovalente Kopplung des Dansyl-Fluorophors erfolgte durch die Firma BIOMERS. Doppelsträngige DNA-Sonden mit verschiedenen Modifikationen wie AP-sites oder Basenfehlpaarungen wurden im Vorfeld der Messung durch Hybridisierung (3.2.16) entsprechender Oligonukleotide erzeugt. In den Messansätzen wurde jeweils 1 µM DNA-Sonde in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 bei 25 °C vorgelegt und in mehreren Schritten YbiB-Wildtyp oder die YbiB-Variante I40E L51E zutitriert. Der Dansyl-Fluorophor wurde bei 335 nm angeregt und dessen Emission bei 550 nm detektiert. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und anhand des Kurvenverlaufs konnte qualitativ die relative räumliche Lage des ersten Bindungsergebnisses zur Dansyl-Gruppe bestimmt werden.

3.4.8 Förster Resonanzenergietransfer (FRET)

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beschreibt die Energieübertragung eines zuvor angeregten Fluorophors (Donor, D) auf ein zweites Fluorophor (Akzeptor, A) (Stryer 1978; Foley und Burkart 2009). Damit es zum Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren kommen kann, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst müssen sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, damit die vom Donor abgegebene Energie in Form eines Photons vom Akzeptor aufgenommen werden kann. Dadurch kann man beobachten, dass sich die Intensität des vom Donor emittierten Lichts verringert, sofern ein effizienter Energietransfer stattfindet. Die Effizienz des Energietransfers (E) wird anhand der Intensität am Emissionsmaximum des vom Donor emittierten Lichts in An- und Abwesenheit (F_{DA} und F_D) des Akzeptors nach Gleichung 3.9 berechnet.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

Gleichung 3.9: Berechnung der Effizienz (E) des Energietransfers.

Da die Effizienz der Energieübertragung maßgeblich vom Abstand der beiden Fluorophore beeinflusst wird, kann FRET dazu verwendet werden, den mittleren Abstand der Fluorophore zu bestimmen. Der mathematische Zusammenhang kann Gleichung 3.10 entnommen werden.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Gleichung 3.10: Abhängigkeit der Effizienz (E) vom Abstand (r) zwischen Donor und Akzeptor.

Der für die Berechnung notwendige Försterradius R_0 ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Effizienz der Energieübertragung genau 50% beträgt. R_0 ist für jedes Donor-Akzeptor-Pärchen konstant und muss im Vorfeld mittels entsprechender Referenzsubstanzen bestimmt werden. Der Försterradius R_0 wird unter anderem durch die Quantenausbeute des Donors (ϕ_D), den Orientierungsfaktor κ^2 und das Überlappungsintegral ($J(\lambda)$) zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors beeinflusst.

$$R_0^6 = \frac{\phi_D \kappa^2 9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 N_A \eta^4} J(\lambda)$$

Gleichung 3.11: Gleichung zur Berechnung von R_0 .

Anhand der Gleichung 3.11 kann der Försterradius berechnet werden. N_A steht hierbei für die Avogadro-Konstante und η für den Brechungsindex des Lösungsmittels, der bei wässrigen Puffersystemen im Durchschnitt bei $\eta = 1.4$ liegt. Der Orientierungsfaktor κ^2 beschreibt die räumliche Lage der elektronischen Dipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander, wobei die Effizienz mit steigender Orthogonalität sinkt. Im Falle von biologischen Makromolekülen die in Lösung untersucht werden, nimmt man einen Standardwert von $2/3$ für κ^2 an. Die Quantenausbeute des Donors (ϕ_D) lässt sich durch entsprechende Referenzsubstanzen und Gleichung 3.12 bestimmen (Chen 1972).

$$\frac{\phi_D}{\phi_{st}} = \frac{I_D A_{st} \sigma_{st} \eta_{st}^2}{I_{st} A_D \sigma_D \eta_D^2}$$

Gleichung 3.12: Bestimmung der Quantenausbeute eines Fluorophors (D) mittels Referenzsubstanzen (st).

Als Referenzsubstanz (Index st) kann jeder Fluorophor dienen, sofern dessen Quantenausbeute (ϕ_{st}) im entsprechenden experimentellen Kontext bekannt ist. Alle anderen in Gleichung 3.12 auftretenden Variablen müssen für beide Fluorophore unter identischen Bedingungen bestimmt werden. Einige Ausnahmen hierfür stellen die Korrekturfaktoren σ und η dar, welche zum einen die relative Photonenausbeute der Lampe bei der jeweiligen Wellenlänge und zum anderen den Brechungsindex des bei der Messung verwendeten Lösungsmittels beschreiben. Im Idealfall werden allerdings beide Fluorophore im selben Lösungsmittel gelöst und mit Licht der gleichen Wellenlänge angeregt, wodurch σ und η für beide Fluorophore identische Werte annehmen und Gleichung 3.12 vereinfacht werden kann.

$$\frac{\phi_D}{\phi_{st}} = \frac{I_D A_{st}}{I_{st} A_D}$$

Gleichung 3.13: Vereinfachung von Gleichung 3.12 unter der Annahme, dass beide Fluorophore in identischen Puffer-Systemen vorliegen.

Des Weiteren ist es nötig die Absorption (A_{st} , A_D) der Fluorophore bei der gewählten Anregungswellenlänge zu messen und diese gegebenenfalls auf die späteren experimentellen Bedingungen zu korrigieren. Die Integrale der Emissionsspektren beider Fluorophore (I_{st} , I_D) können hinreichend genau durch eine Riemann-Summe (vergleiche Gleichung 3.15) ausgedrückt werden.

Das Überlappungsintegral ($J(\lambda)$) zur Berechnung von R_0 ergibt sich aus Gleichung 3.14.

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Gleichung 3.14: Formelle Bestimmung des Überlappungsintegrals $J(\lambda)$.

Da für das Integral keine einfache Lösung existiert, kann das Integral ebenfalls durch eine Riemann-Summe in Form von Gleichung 3.15 angenähert werden.

$$J(\lambda) \cong \sum_{i=1}^{i=n} F_D(\bar{\lambda}_i) \varepsilon_A(\bar{\lambda}_i) \bar{\lambda}_i^4 \Delta\lambda$$

Gleichung 3.15: Vereinfachte Riemann-Summe des Überlappungsintegrals $J(\lambda)$.

Die Fluoreszenzintensität des Donors (F_D) und die Absorption des Akzeptors (ε_A) werden aus einem zuvor normierten Emissionsspektrum und einem molaren Absorptionsspektrum (normiert auf eine 1 M Lösung) entnommen.

In dieser Arbeit wurde der Förster-Resonanzenergietransfer dazu verwendet, die Dynamik von YbiB im Zuge der Interaktion mit dsDNA zu beobachten. Als Donor wurde ein Tryptophan-Rest verwendet, der in einer ansonsten tryptophanfreien YbiB-Variante an verschiedenen Positionen platziert wurde. Als Akzeptormolekül wurde N-7-Dimethylamino-4-Methylcoumarin-3-yl-Maleimid (DACM) verwendet. Die Markierung mit DACM wurde wie unter (3.3.9) beschrieben durchgeführt.

Die Fluoreszenzspektren der verschiedenen YbiB-Varianten wurden an einem JASCO FP-6500 Fluoreszenzspektrometer gemessen. Hierzu wurde stets 1 µM Protein mit oder ohne DACM-Markierung in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 bei 20°C in einem Gesamtvolume von 500 µl vorgelegt. Die Probe wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 290 nm angeregt und ein Emissionsspektrum im Bereich von 300 bis 550 nm aufgezeichnet. Die in allen gemessenen Spektren auftretende Raman-Streuung wurde mittels Subtraktion eines reinen Puffer-Spektrums entfernt. Um den Einfluss der Nukleinsäurebindung auf die YbiB-Struktur genauer zu untersuchen, wurde die Effizienz des Energietransfers (siehe Gleichung 3.9) sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von 1 µM eines 12bp dsDNA Stranges (2.7.2) bestimmt. Anhand Gleichung 3.10 wurden die relativen Abstände (r) zwischen den Tryptophan-Resten und dem DACM-Fluorophor berechnet. Für jede untersuchte YbiB-Variante wurde der Försterradius (R_0) und die Quantenausbeute des Tryptophan-Restes (ϕ_D) wie oben beschrieben bestimmt. Als Referenzsubstanz zur Bestimmung von ϕ_D wurde in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 gelöstes Tryptophan verwendet und für $\phi_{\text{Tryptophan}}$ ein Wert von 0.14 angenommen (Eisinger 1969). Der

Fluorophor DACM besitzt ein Absorptionsmaximum bei 391 nm und einen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{391} = 23000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Machida et al. 1977).

3.4.9 Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarisation kann dazu verwendet werden, die Interaktion zwischen Proteinen und Nukleinsäure zu untersuchen, wobei als Messsignal die Polarisation des emittierten Lichtes dient. Zu Beginn der Messung wird der mit dem Fluorophor versehene Interaktionspartner in der Küvette vorgelegt und anschließend mit linearpolarisierterem Licht angeregt. Im Anschluss wird die Polarisation (P) des emittierten Lichts durch Messung der Intensität einmal parallel (I_{\parallel}) und einmal orthogonal (I_{\perp}) zur Anregung bestimmt (Gleichung 3.16).

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Gleichung 3.16: Formale Definition der Fluoreszenzpolarisation (P).

In Lösung vermessene biologische Systeme zeigen aufgrund der Rotationsdiffusion des Fluorophors in der Regel eine deutliche Depolarisation des emittierten Lichts. Da die Rotationsdiffusion eines Fluorophors maßgeblich durch dessen Volumen bestimmt wird, ist es möglich, die Interaktion zwischen zwei Molekülen in Lösung zu untersuchen, sofern sich das Volumen des Fluorophors im Komplex deutlich von seinem Ausgangsvolumen unterscheidet. Somit sollte sich P im Zuge der Komplexbildung erhöhen, da dadurch die Rotationsgeschwindigkeit des Fluorophors signifikant reduziert wird. Ein weiterer Aspekt, der insbesondere bei der praktischen Durchführung eine Rolle spielt und deshalb hier kurz erwähnt wird, ist die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors (τ). Dieser Parameter definiert im Wesentlichen den zeitlichen Abstand zwischen der Anregung des Fluorophors und dessen Emission und bestimmt somit, in welchen Grenzen sich das Volumen im Zuge der Komplexbildung ändern muss, damit diese mittels Fluoreszenzpolarisation beobachtet werden kann. Aus diesem Grund wurde in den im Anschluss beschriebenen Experimenten der Farbstoff Chromis 500N verwendet, da dieser eine ausreichend lange Fluoreszenzlebensdauer aufweist.

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzpolarisation zum einen dazu verwendet, die Bindung von wildtypischem YbiB an Nukleinsäuren mit oder ohne Modifikation zu untersuchen. Zum anderen wurde diese Messmethode ebenfalls dazu herangezogen, um die Affinität der Bindung von verschiedenen Nukleotiden an den YbiB-Wildtyp im Kontext eines kompetitiven Bindungs-experiments zu bestimmen.

Fluoreszenzpolarisation als Mittel zur Untersuchung der Bindung von YbiB-Wildtyp an Nukleinsäuren

Die mittels Fluoreszenzpolarisation untersuchte Bindung von YbiB-Wildtyp an Nukleinsäuren wurde an einem JASCO FP-6500 mit eingebauten Polarisationsfiltern gemessen. Für die Messungen wurden 12 oder 22bp lange dsDNA Sonden verwendet, die stets mit dem Farbstoff Chromis 500N markiert waren und teils eine Basenmodifikation in Form eines AP-site-Analogons (dSpacer, *abasic furan*) aufwiesen. In der Küvette wurden jeweils 50 nM 12bp oder 5 nM 22bp dsDNA Sonde in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 bei 15 beziehungsweise 25 °C vorgelegt. Das Fluorophor Chromis 500N wurde bei 498 nm angeregt und dessen Emission bei 511 nm verfolgt. Im Verlauf der Messung wurde schrittweise YbiB-Wildtyp zugegeben und jeweils nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes die Polarisation gemessen. Die Fluoreszenzpolarisationswerte wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, und mit dem Programm DynaFit wurde ein einfaches Bindungsmodell mit ein oder zwei Bindestellen an die Daten angepasst. Sofern die verwendeten Sonden die gleiche Anzahl an Basen aufwiesen, wurden diese mit den gleichen Parametern ausgewertet. Im Anhang 7.3 befindet sich ein verallgemeinertes Schema des DynaFit *Input*-Befehls.

Fluoreszenzpolarisation als indirektes Signal in kompetitiven Bindungsexperimenten zur Bestimmung der Affinität von Nukleotiden gegenüber YbiB-Wildtyp

Die kompetitiven Bindungsexperimente wurden an einem JASCO FP-6500 mit eingebauten Polarisationsfiltern durchgeführt. Hierfür wurden 5 µM YbiB-Wildtyp und 50 nM 12bp dsDNA Sonde in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 bei 15°C vorgelegt. Das Fluorophor Chromis 500N wurde bei 498 nm angeregt und die Emission bei 511 nm verfolgt. Durch die schrittweise Zugabe von Nukleotiden kann deren kompetitive Wirkung auf den DNA-Protein-Komplex untersucht werden, da beide Liganden in etwa um die gleiche Bindestelle konkurrieren. Die gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte wurden gegen die Nukleotidkonzentration aufgetragen und mit SigmaPlot 12.0 die Gleichung 3.17 (Wang 1995) an die Messwerte angepasst. Die Konstanten aus Gleichung 3.17 sind in Gleichung 3.18 definiert.

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \frac{\left\{ 2\sqrt{a^2 - 3b} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right\}}{3 K_A + \left\{ 2\sqrt{a^2 - 3b} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right\}}$$

Gleichung 3.17: Mathematische Beschreibung der kompetitiven Bindung zweier Liganden an eine Bindestelle.

$$\theta = \text{arc cos} \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

$$a = K_A + K_B + [A]_0 + [B]_0 - [P]_0$$

$$b = K_B([A]_0 - [P]_0) + K_A([B]_0 - [P]_0) + K_A K_B$$

$$c = -K_A K_B [P]_0$$

Gleichung 3.18: Definition der Konstanten θ , a , b und c aus Gleichung 3.17.

F	Gemessenes Fluoreszenzpolarisationssignal
F_0	Anfängliches Fluoreszenzpolarisationssignal
F_{max}	Fluoreszenzpolarisationssignal in Sättigung
K_A/K_B	Dissoziationskonstante K des Liganden A oder B
$[A]_0$	Gesamtkonzentration des Liganden A im Ansatz
$[B]_0$	Gesamtkonzentration des Liganden B im Ansatz
$[P]_0$	Gesamtkonzentration des vorgelegten Proteins

3.4.10 High performance liquid chromatography (HPLC)

Bei der HPLC-Analytik können die verschiedenen Substanzen eines Probengemisches mit sehr hoher Empfindlichkeit und Trennschärfe detektiert werden. Dabei werden die Substanzen chromatographisch auf einer Säule getrennt und mit Hilfe unterschiedlichster Detektionsverfahren ein Elutionsprofil erstellt. Je nach den zu trennenden Substanzen können verschiedene Laufmittel und Säulenmaterialien eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HPLC-Analytik zur Trennung von Nukleotiden, Nukleosiden und Nukleobasen verwendet. Alle Trennungen wurden an einem HPLC-System LC 1200 (Agilent) durchgeführt. Da sich die Probenzusammensetzungen je nach vorangegangener Fragestellung und experimenteller Vorgehensweisen deutlich voneinander unterschieden, wurden unterschiedliche *reversed phase*-Säulen, Laufmittelgemische und Elutionsprofile verwendet. Im Allgemeinen wird bei der *reversed phase*-Chromatographie eine apolare stationäre Phase in

Form von modifiziertem Kieselgel und ein wässriges Puffersystem als mobile Phase verwendet. Die Interaktion zwischen der stationären Phase und dem zu trennenden Substanzen beruht im Wesentlichen auf hydrophoben Wechselwirkungen, wobei unterschiedlich modifizierte stationäre Phasen zusätzlich noch weitere physikalische Eigenschaften als Trennkriterium heranziehen können. Die Modifikationen der stationären Phase reichen hierbei von einfachen aliphatischen Resten bis hin zu komplexeren organischen Verbindungen. Die Elution der an die stationäre Phase gebundenen Substanzen erfolgt in der Regel durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels wie Acetonitril, wodurch die Polarität der mobilen Phase sinkt und somit dessen Elutionskraft zunimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten HPLC-basierten Analytikmethoden sind im Folgenden genauer beschrieben.

Radioaktiv markierte Nukleobasen wurden mit einer Nucleosil NH₂-RP Säule (Macherey-Nagel) getrennt. Das Säulenmaterial besteht in diesem Fall aus mit Aminopropyl-Gruppen modifiziertem Kieselgel. Bei den verwendeten Laufbedingungen basiert die Trennung der Komponenten auf hydrophoben und schwachen anionischen Wechselwirkungen. Die Komponenten wurden mit Hilfe eines mehrstufigen Gradienten eluiert. Als wässriger Puffer wurde 40 mM NH₄OAc pH 6.0 und als organisches Lösungsmittel Acetonitril verwendet. Der verwendete Elutionsgradient kann Tabelle 3.4 entnommen werden.

Komplexe Probengemische aus mehreren Nukleosiden oder Nukleotiden wurden mit einer Luna PFP(2)-Säule (Phenomenex) getrennt. Das Säulenmaterial besteht aus mit Pentafluorphenylpropyl-Resten modifiziertem Kieselgel. Im Gegensatz zu klassischen *reversed phase*-Säulen erfolgt die Trennung nicht ausschließlich anhand hydrophober Wechselwirkungen, sondern ebenfalls aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, der Aromatizität und der Tendenz, Wasserstoffbrücken auszubilden. Da sich normalerweise die verschiedenen Substanzen eines Probengemisches zumindest anhand einer physikalischen Eigenschaft voneinander unterscheiden, können somit mit Hilfe dieser speziellen Säule auch komplexere Probengemische analysiert werden. Die Trennung erfolgte in Form eines mehrstufigen Gradienten, wobei als wässriger Puffer standardmäßig 20 mM NH₄OAc pH 4.5 und als organisches Lösungsmittel Acetonitril verwendet wurde. Sobald die Absorption unter 230 nm für die Analytik von Bedeutung war, wurde der wässrige Puffer gegen 20 mM KP pH 3.0 ausgetauscht. Der verwendete Elutionsgradient kann Tabelle 3.4 entnommen werden.

Die bei enzymatischen Umsätzen von Reinsubstanzen entstandenen Produkte wurden auf einer Luna C18(2)-Säule (Phenomenex) getrennt. Das Säulenmaterial besteht aus mit Octadecyl-Resten modifiziertem Kieselgel, wodurch das Trennprinzip auf einem klassischen hydrophoben Mechanismus beruht. Die Elution der Substanzen erfolgte mit einem linearen Gradienten. Als wässriger Puffer wurde 20mM NH₄OAc pH 4.5 und als organisches Lösungsmittel Acetonitril verwendet. Der verwendete Elutionsgradient kann Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Analytik Methoden.

	Trennung radioaktiv markierter Nukleobasen	Trennung komplexer Nukleotid-, Nukleosidgemische	Produktanalyse nach enzymatischem Umsatz von Reinsubstanzen			
HPLC-Säule	Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 NH2-RP	Phenomenex Luna 3µm PFP(2) 100 A, 150 x 4.6 mm	Luna 5µm C18(2) 100 A, 150 x 3 mm			
Laufmittel A:	40 mM NH ₄ OAc pH 6.0	20 mM NH ₄ OAc pH 4.5 oder 20 mM KP pH 3.0	20 mM NH ₄ OAc pH 4.5			
Laufmittel B:	Acetonitril	Acetonitril	Acetonitril			
HPLC-Säule gelagert in	30% Acetonitril	40% Acetonitril	100% Acetonitril			
Säulenofen	30 °C	30 °C	30 °C			
Flussrate	0.8 ml/min	0.35 ml/min	0.8 ml/min			
	Zeit [min]	Anteil B [%]	Zeit [min]	Anteil B [%]	Zeit [min]	Anteil B [%]
Gradient	0	100	0	0	0	3
	1.5	100	1.8	0	10	10
	2	98	2.6	0.1	12	10
	4.5	98	3.5	0.3	13	3
	5	96	4.3	0.7	15	3
	7.5	96	5.2	1.3		
	8	94	6	2		
	10.5	94	15	10		
	11	92	18	20		
	13.5	92	20.4	30		
	14	90	22.2	30		
	18	90	27	40		
	20	40	28.8	40		
	28	40	31	60		
	29	100	33	60		
	35	100	35	0		
			45	0		

3.4.11 *In vitro*-Aufklärung einer potentiellen DNA-Glykosylaseaktivität

Untersuchung einer hypothetischen DNA-Glykosylaseaktivität im Kontext methylierter DNA-Schäden

Methylierungen stellen neben Oxidationen eine große Gruppe von DNA-Schäden dar, welche ebenfalls durch DNA-Glykosylasen erkannt und aus genomischer DNA entfernt werden. Um zu klären, inwiefern methylierte Nukleobasen als potentielle Substrate für wildtypisches YbiB in Frage kommen, wurde durch Methylierung geschädigte genomische DNA zusammen mit YbiB-Wildtyp inkubiert und versucht mögliche Reaktionsprodukte mittels HPLC und Szintillationszähler zu detektieren. Zu Beginn des Experiments wurde einzel- oder doppelsträngige Heringssperma DNA (Sigma-Aldrich) in 20 mM Cacodylat-Puffer pH 7.0 in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Als Alkylierungsreagens wurde radioaktiv markiertes

N-Methyl [³H]-N-Nitrosourea (Hartmann Analytics; ART 1616) verwendet, da es zum einen ein möglichst breites DNA-Methylierungsmuster erzeugt (Beland und Poirier 1994) und zum anderen aufgrund der tritiummarkierten Methylgruppen bereits geringe Mengen an freigesetzten, methylierten Nukleobasen detektiert werden können. Im Alkylierungsansatz wurden 500 µg der zuvor gelösten Heringssperma-DNA mit 50 µCi N-Methyl [³H]-N-Nitrosourea (1 µCi/µl) gemischt und bei 37 °C für 5 h inkubiert. Anschließend wurde die methylierte DNA aus dem Ansatz mittels Ethanol-Fällung (3.2.10) isoliert und in einem entsprechenden Volumen 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP pH 7.5 gelöst. Im nächsten Schritt wurden zwischen 500 000 - 750 000 cpm der methylierten einzel- oder doppelsträngigen DNA zusammen mit 30 µM YbiB-Wildtyp oder 10 µM AlkA in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP, 50 mM EDTA pH 7.5 bei 37 °C für 5 h inkubiert. Um den Einfluss von Magnesium-Ionen auf die Reaktion zu untersuchen, wurde in einigen Ansätzen 5 mM MgCl₂ anstelle des EDTAs verwendet. Die Isolierung möglicher abgespaltener Nukleobasen aus dem Reaktionsansatz erfolgte mittels Ultrafiltration (Amicon, MWCO 10000). Die einzelnen Bestandteile der Filtrate wurden anschließend mittels HPLC (3.4.10; Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 NH2-RP) weiter aufgetrennt, und manuell fraktioniert. In den ersten 20 Minuten der HPLC-Trennung fand die Fraktionierung in Zeitintervallen von je 20 Sekunden statt und wurde danach auf 60 Sekunden erhöht. Die Radioaktivität der Fraktionen wurden im Szintillationszähler (TRI-CARD 2900TR, Packard; LSC-Universalcocktail Rostiszint eco plus) in einem für Tritium üblichen Bereich von 0 - 12 keV (vgl. Tabelle 3.5) gemessen und die detektierten Zerfälle pro Minute gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

Tabelle 3.5: Übersicht der eingestellten Messbereiche des Szintillationszählers.

Messbereich im Szintillationszähler	Energie der gemessenen radioaktiven Strahlung
A	0 - 12 keV
B	12 - 156 keV
C	156 - 1700 keV

Untersuchung einer potentiellen DNA-Glykosylaseaktivität mittels DNA *Nicking Assay*

Der DNA *Nicking Assay* kann dazu verwendet werden, um spezifische DNA-Schäden als mögliche Substrate für eine DNA-Glykosylase zu identifizieren. Hierbei ist es erforderlich, den zu untersuchenden DNA-Schaden an einer definierten Stelle in einem kurzen DNA-Fragment einzufügen und diesen für eine spätere Detektion zu markieren. Anschließend werden die DNA-Fragmente zusammen mit einer DNA-Glykosylase inkubiert. Sofern das Enzym die entsprechende Modifikation als Substrat erkennt, wird die jeweilige Base aus dem DNA-Fragment entfernt und es entsteht eine abasische Position (AP-site). Diese kann nun entweder

enzymatisch oder durch Behandlung mit NaOH in einen DNA-Einzelstrangbruch überführt werden (Hendrich et al. 1999), wodurch kleinere DNA-Fragmente entstehen. Somit kann das Auftreten kleinerer Spaltprodukte als Nachweis einer DNA-Glykosylaseaktivität in Verbindung mit dem jeweiligen vorliegenden DNA-Schaden gedeutet werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten modifizierten doppel- und einzelsträngigen DNA-Substrate wurden wie in 3.2.17 beschrieben erzeugt und mit ^{32}P radioaktiv markiert. Im eigentlichen Reaktionsansatz wurden 4 nM (80 fmol) des modifizierten, radioaktiv markierten DNA-Fragments in 10 mM Bis-Tris-Propan/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA pH 7.0 vorgelegt, mit 1 μM Enzym (YbiB-Wildtyp, AlkA, MUG oder FPG (New England Biolabs GmbH)) gemischt und für 3 h bei 37 °C in einem Thermocycler (Mastercycler personal, EPPENDORF) inkubiert. Im Anschluss wurden entstandene AP-sites durch Zugabe von 90 mM NaOH und erhitzten auf 99 °C für 10 Minuten in einen DNA-Einzelstrangbruch überführt. Die Proben wurden anschließend 1:1 mit zweifachem Formamidprobenpuffer (2.8.4) versetzt und ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 99 °C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen aufzulösen. Abschließend wurden die Proben auf ein denaturierendes 20%-iges Polyacrylamid-Harnstoffgel in 1xTBE geladen. Die einzelnen Komponenten der Proben wurden mittels Elektrophorese (konstante Stromstärke I = 45 mA) aufgetrennt, durch Autoradiographie (Cyclone Phosphor-Imager, PerkinElmer Life Sciences) visualisiert und anhand der Software OptiQuant Version 3.0 (PerkinElmer Life Sciences) analysiert.

3.4.12 *In vitro* Aufklärung und Charakterisierung einer potentiellen Nukleosidphosphorylase- beziehungsweise Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität

Reaktionsbedingungen zur Identifizierung einer Nukleosidphosphorylase- oder Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität im Kontext von ungeschädigten und oxidierten Nukleosiden oder Nukleotiden.

Im Zuge der Überprüfung einer möglichen Nukleosidphosphorylase- oder Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität von YbiB-Wildtyp für intakte und oxidierte Nukleoside beziehungsweise Nukleotide wurden stets mehrerer Substrate gleichzeitig in einem gemeinsamen Ansatz untersucht. Als nachgeschaltete Analysemethode wurde die HPLC-Analytik verwendet, um so die komplexen Probengemische mit einer hohen Trennschärfe und Sensitivität zu analysieren. Somit war es möglich in relativ kurzer Zeit viele verschiedene potentielle Substrate zu testen.

Die intakten oder oxidierten Nukleoside/Nukleotide (3.2.18) wurden zusammen mit YbiB-Wildtyp oder entsprechenden Kontrollenzymen (DeoA, MutT) unter den folgenden Bedingungen inkubiert. In den Ansätzen wurden die Substratgemische in einer Konzentration von insgesamt

250 - 1000 µM in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP, 10 mM MgCl₂ pH 7.5 vorgelegt. Im Anschluss wurden 5 - 20 µM Enzym (YbiB-Wildtyp, DeoA oder MutT) zugegeben und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Im Fall der Untersuchung von Nukleosiden wurden diese *in situ* durch Zugabe von 10 U Alkalischer Phosphatase (New England Biolabs GmbH) aus entsprechenden Nukleosidmono-phosphaten hergestellt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Enzyme mittels Ultrafiltration (Amicon, 10000 MWCO) aus dem Ansatz entfernt und das Filtrat mittels HPLC und einer Luna PFP-Säule (3.4.10) analysiert. In einigen Fällen war es notwendig das Filtrat im Vorfeld der HPLC-Analytik mittels Vakuumzentrifugation (Eppendorf Concentrator 5301) bei 30 - 45 °C weiter einzusaugen, wodurch die Konzentration der Analyten erhöht wurde.

Reaktionsbedingungen zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung einer Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität

Die von YbiB-Wildtyp gegenüber dem Substrat 8-Oxo-dGTP zu beobachtende Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Die katalytische Effizienz beziehungsweise der Einfluss einiger Reaktionsbedingungen auf die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität im Kontext von 8-Oxo-dGTP wurden wie im Folgenden angegeben bestimmt. Zudem wurden ebenfalls unter identischen Bedingungen andere Nukleosidtriphosphate als potentielle Substrate getestet.

Der Umsatz von 8-Oxo-dGTP oder anderer Nukleosidtriphosphate durch YbiB-Wildtyp erfolgte stets bei 37 °C in 40 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl und 2 mM KP pH 7.5. Es wurden lediglich einzelne Komponenten verändert, sofern deren Einfluss auf die Enzymreaktion bestimmt werden sollte. Die Inkubationszeiten bei 37 °C, sowie die Protein- und Substratkonzentrationen wurden an die jeweilige Fragestellung angepasst und können Tabelle 3.6 entnommen werden.

Tabelle 3.6: Reaktionsbedingungen zur Charakterisierung der 8-Oxo-dGTP Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität von YbiB-Wildtyp.

	YbiB-Konzentration	Nukleosidtriphosphatkonzentration	Inkubationszeit bei 37 °C
Untersuchung potentieller Substrate	5 µM	50 µM [alle (d)NTPS]	üN
Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktion	20 µM	50 µM [8-Oxo-dGTP]	1h
Einfluss der verwendeten divalenten Kationen	5 µM	30 µM [8-Oxo-dGTP]	üN
Bestimmung enzymkinetischer Parameter	20 µM	1 - 60 µM [8-Oxo-dGTP]	0 - 45 min

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt und die Proben für eine nachfolgende HPLC-Analyse vorbereitet. Hierzu wurde das Protein aus dem Ansatz mittels Ultrafiltration (Amicon MWCO 10000) entfernt und das Filtrat mittels HPLC und einer Luna C18 oder PFP-Säule (3.4.10) genauer analysiert.

Bestimmung und Auswertung der kinetischen Parameter von YbiB-Wildtyp gegenüber dem Substrat 8-Oxo-dGTP mittels HPLC-basierter Stopp-Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde YbiB-Wildtyp zusammen mit 1, 2, 5, 10, 20, 40 und 60 μ M 8-Oxo-dGTP unter den oben genannten Bedingungen (Tabelle 3.6) bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben aus den Ansätzen entnommen, die Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt und das Protein vom restlichen Ansatz mittels Ultrafiltration (Amicon, 10000 MWCO) abgetrennt. Die Filtrate wurden anschließend mittels HPLC-Analytik und einer Luna C18(2)-Säule (Phenomenex) (3.4.10) analysiert, wobei die Menge an gebildetem 8-Oxo-dGMP bestimmt wurde. Die Umrechnung der 8-Oxo-dGMP Peak-Fläche in die jeweilige Produktkonzentration erfolgte anhand einer Eichgerade (7.5). Da 8-Oxo-dGMP und 8-Oxo-dGTP identische Absorptionsspektren aufweisen, wurde die Eichgerade mit dem Substrat 8-Oxo-dGTP erstellt. Die Linearität zwischen der Peak-Fläche und der Stoffmenge (n) ist allerdings nur für $n \leq 6$ nmol gegeben, weshalb je nach verwendeter Substratkonzentration unterschiedliche Injektionsvolumen verwendet wurden. Aus diesem Grund wurden die berechneten Stoffmengen auf das jeweilige Injektionsvolumen normiert und im Folgenden die Konzentration an gebildetem 8-Oxo-dGMP bestimmt. Im Anschluss wurden die 8-Oxo-dGMP Konzentrationen gegen die jeweiligen Inkubationszeiten aufgetragen (7.5). Durch die lineare Anfangssteigung der Umsatzkurve wurde letztlich die Reaktionsgeschwindigkeit v_i bestimmt, diese gegen die vorgelegte Substratkonzentration aufgetragen und durch Anpassen der Gleichung 3.19 an die Daten der k_{cat} - und K_M -Wert für wildtypisches YbiB gegenüber dem Substrat 8-Oxo-dGTP berechnet.

$$v_i = \frac{E_0 k_{cat} [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 3.19: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzym- und Substratkonzentration nach Michealis und Menten.

3.4.13 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine markierungsfreie Methode zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen in Lösung (Lewis und Murphy 2005), wodurch sowohl die Affinität (K_D), als auch die Bindungsenthalpie (ΔH) gleichzeitig bestimmt werden

können. Die Komplexbildung wird über die aufgenommene oder abgegebene Wärme beobachtet. Die gemessene Wärmeänderung (ΔH) stellt dabei im Wesentlichen die Summe aller an der Bindung beteiligten, sich verändernden molekularen Wechselwirkungen dar. Im Verlauf einer ITC-Messung wird zunächst ein Bindungspartner in der Messzelle vorgelegt und in mehreren Schritten der andere Bindungspartner zutitriert. Betrachtet man nach jedem Titrationsschritt die Wärmeänderung und trägt diese gegen das molare Verhältnis beider Bindungspartner auf, können aus dem resultierenden Thermogramm die Werte für Affinität (K_D), Stöchiometrie (n) und Enthalpie (ΔH) entnommen werden. Hierbei können die Kenngrößen K_D und n aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf des Thermogramms anhand der Steigung und des Wendepunkts im Übergangsbereich bestimmt werden. Sofern die Verdünnungsenthalpie im Verlauf der Titration berücksichtigt wurde, entspricht die Enthalpie ΔH der abgegebenen Wärmemenge pro Mol des zutitrierten Bindungspartners. Die Werte für die freie Gibbs'sche Energie ΔG und die Entropie ΔS können aus den zuvor bestimmten Werten und mittels Gleichung 3.20 berechnet werden.

$$\Delta G = -RT \ln K_D = \Delta H - T\Delta S$$

Gleichung 3.20: Thermodynamischer Zusammenhang zwischen ΔG , ΔH , ΔS und K_D .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ITC dazu verwendet die Bindung verschiedener Nukleotide an den YbiB-Wildtyp zu messen. Die Messungen wurden alle an einem MicroCal PEAQ-ITC (MALVERN) durchgeführt. Hierzu wurden in der Messzelle 100 μM YbiB-Wildtyp vorgelegt und dazu eine 1.5 mM Nukleotidlösung in 19 Titrationsschritten mit je 2 μl Injektionsvolumen hinzutitriert. Beide Interaktionspartner lagen in 50 mM Tris/HCl, 40 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM KP pH 7.5 vor und die Messzelle wurde auf 25 °C temperiert. Die erhaltenen Thermogramme wurden mit der von MALVERN mitgelieferten Analyse-Software MicroCal PEAQ-ITC ausgewertet.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 UNTERSUCHUNG DER NUKLEINSÄUREBINDUNG UND DEREN AUSWIRKUNG AUF DIE YBIB-STRUKTUR

Die Fähigkeit, mit Nukleinsäuren zu interagieren wurde bereits im Vorfeld dieser Dissertation sowohl für das *E. coli* TrpD2-Protein YbiB, als auch für das *Aquifex aeolicus* TrpD2 nachgewiesen (Schneider 2011). Diese spezielle Eigenschaft der TrpD2-Proteine, die nicht bei den verwandten metabolischen TrpD- und NP-II-Enzymen vorzufinden ist (Schneider et al. 2015), steht im Einklang mit der Vermutung, dass YbiB Teil der SOS-Antwort ist (Schneider et al. 2015). Erste Untersuchungen zeigten, dass YbiB sowohl mit RNA, als auch mit DNA in vergleichbarer Art und Weise interagieren kann. Es zeigten sich allerdings leichte Unterschiede im Bezug auf einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäuren, wobei die Affinität für erstere größer zu sein schien. Des Weiteren konnte mittels SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) keine Basenabfolge identifiziert werden, zu der YbiB eine höhere Affinität aufwies, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass YbiB sequenzunspezifisch mit Nukleinsäuren wechselwirkt. Im Hinblick auf eine potentielle Beteiligung des YbiB-Proteins an einem möglichen DNA-Reparaturmechanismus beruht diese Interaktion vermutlich auf dem Prinzip des *DNA-hoppings*, was es DNA-Reparaturenzymen gestattet, das Genom möglichst schnell nach etwaigen DNA-Schäden abzusuchen (Hedglin und O'Brien 2010). Diese Annahme würde allerdings ebenfalls bedeuten, dass es bestimmte DNA-Modifikationen geben müsste, die spezifisch von YbiB erkannt werden. Da eine spezifische Interaktion in direktem Zusammenhang mit der möglichen biologischen Funktion des YbiB-Proteins im Kontext der SOS-Antwort steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Nukleinsäurebindung weiter charakterisiert. Alle nachfolgenden DNA-Interaktionsexperimente wurden unter der Annahme durchgeführt, dass es sich bei YbiB um ein neuartiges DNA-Reparaturenzym handelt. Die in Abschnitt 4.1.1 gezeigten Daten wurden in dieser Form bereits teilweise publiziert (Schneider et al. 2015).

4.1.1 Bindung von YbiB-Wildtyp und einiger YbiB-Varianten an verschiedene Nukleinsäuren

Wie eingangs erwähnt, scheint YbiB nicht zwischen RNA und DNA differenzieren zu können, weshalb man davon ausgehen kann, dass die Bindung vermutlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem YbiB-Protein und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren beruht. Diese Annahme konnte insofern durch die Beobachtung bestätigt

werden, dass sich die Affinität gegenüber Nukleinsäuren deutlich verschlechtert, sobald die Ionenstärke des Lösungsmittels zunimmt. So erhöht sich beispielsweise der K_D -Wert von YbiB-Wildtyp gegenüber einem 12b poly(dT)-Oligonukleotid von 39 nM auf 195 oder 285 nM sobald die NaCl-Konzentration auf 300 mM oder die Phosphationen-Konzentration auf 15 mM steigt (vgl. Anhang 7.1, Abbildung 7.1). Zudem zeigte die nähere Betrachtung der YbiB-Struktur, dass das homodimere YbiB über zwei stark positiv geladene Furchen verfügt, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die potentiellen Bindestellen handelt (Abbildung 4.1).

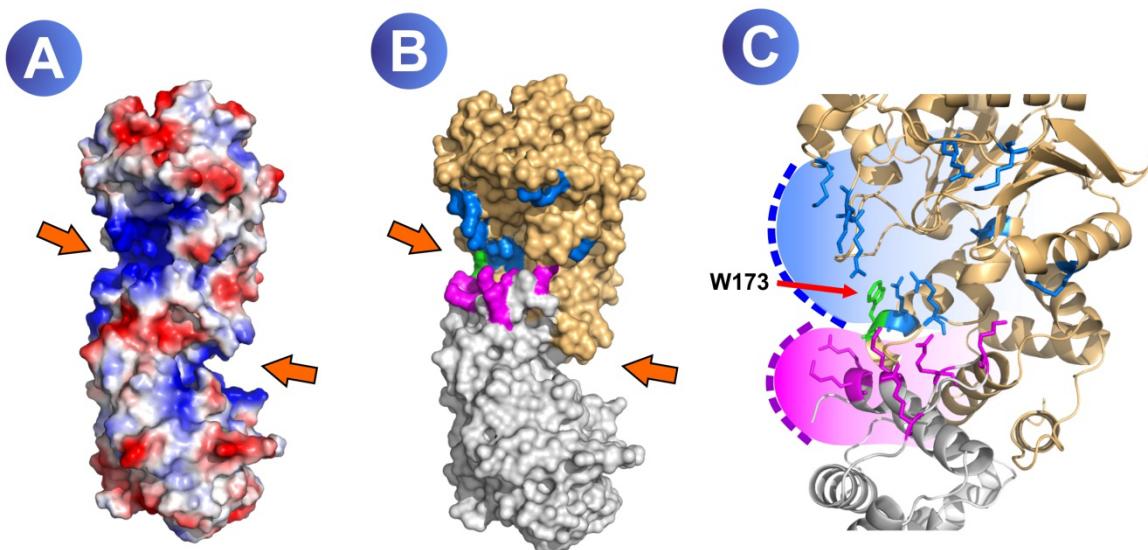


Abbildung 4.1: Oberflächenladungsverteilung und Beitrag beider Protomere zur Bindetasche. (A) Dargestellt ist die Ladungsverteilung auf der Oberfläche des homodimeren YbiB-Wildtyps (positiv = blau und negativ = rot). Es sind zwei stark positiv geladene Furchen (orange Pfeile) zu erkennen, die aufgrund der C2-Symmetrie des Dimers identisch aufgebaut sind. (B) Diese Furchen werden erst durch die Dimerisierung der beiden Protomere (in Weiß und Hellorange dargestellte Proteinoberflächen) vollständig ausgebildet. Die in einer der beiden Furchen enthaltenen Lysine und Arginine wurden ja nach Protomer unterschiedlich eingefärbt (Magenta = unteres Protomer, Blau = oberes Protomer). (C) Es befinden sich etwa 15 Lysine/Arginine in der Tasche, wobei 6 vom unteren und 9 vom oberen Protomer stammen. Der Tryptophan-Rest W173, dessen Fluoreszenzspektrum sich im Zuge der Nukleinsäurebindung signifikant verändert und der daher als Sonde in Fluoreszenztitrationsexperimenten verwendet wurde, ist in Strichform (grün) dargestellt.

Interessanterweise werden beide Furchen erst im Zuge der Dimerisierung vollständig ausgebildet. Die innerhalb der TrpD2-Proteinfamilie teilweise stark konservierten basischen Aminosäuren der Furche werden demzufolge von beiden Protomeren bereitgestellt. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine monomerisierte YbiB-Variante (YbiB L40E I51E) hergestellt und teilweise charakterisiert (Holinski 2011, Schneider et al. 2015). Diese spezielle YbiB-Variante ist trotz unvollständiger Bindetasche immer noch in der Lage, Nukleinsäuren mit einer akzeptablen Affinität zu binden (siehe Tabelle 4.1). Der für verschiedene Nukleinsäuren gemessene K_D -Wert dieser monomeren Variante verschlechtert sich im Vergleich zum YbiB-Wildtyp lediglich um

einen Faktor von 2 - 3, wodurch sich die Affinität für einzelsträngige Nukleinsäuren immer noch zwischen 50 - 100 nM bewegt.

Tabelle 4.1: Mittels Fluoreszenztitration bestimmte K_D -Werte verschiedener YbiB-Varianten und Nukleinsäuren.

K_D -Werte [nM] ^(a)	12b poly(dT) ssDNA	14b poly(dT) ssDNA	24b poly(dT) ssDNA	26b poly(dT) ssDNA	28b poly(dT) ssDNA
YbiBwt^(b)	39.3 ± 21.4	17.4 ± 24.0	39.6 ± 6.7	36.8 ± 7.8	19.1 ± 15.6
YbiB L40E I51E^(b)	86.5 ± 25.7	49.9 ± 28.4			53.6 ± 31.1
YbiB R12A K14A R18A	94.0 ± 74.3	42.4 ± 15.3			19.9 ± 8.6
YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A	72.8 ± 24.4	182.3 ± 22.5			62.0 ± 13.4
aaTrpD2^(c)	59 ± 27	50 ± 28			54 ± 31

^(a) Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der im Triplikat gemessenen K_D -Werte.

^(b) Die Ergebnisse stammen aus einer früheren Arbeit (Kaiser 2012)

^(c) Die Ergebnisse stammen aus einer früheren Arbeit (Schneider 2011)

Im Gegensatz zur Affinität unterscheidet sich jedoch die Bindungsstöchiometrie der monomeren YbiB L40E I51E Variante deutlich von wildtypischen YbiB (Tabelle 4.2). Aus vorrangegangenen Bindungsstudien wurde eine mittlere Bindungslänge von 14 ± 2 Basen, beziehungsweise eine Mindestbindungslänge von 7 ± 1 Basen je dimeres YbiB-Molekül bestimmt (Kaiser 2012). Zugleich scheint es eine Art negativer Kooperation zwischen den beiden Bindetaschen zu geben, da augenscheinlich stets nur eine der beiden identischen Bindetaschen eine Nukleinsäure binden kann, wohingegen die Andere unbesetzt bleibt. Dieses spezielle Bindeverhalten führt letztlich zu einem beobachtbaren und konsistenten Muster, was das Verhältnis der Anzahl gebundener YbiB-Protomere je Nukleinsäure betrifft. Die Stöchiometrie verändert sich hierbei für den YbiB-Wildtyp schrittweise von 2:1, 4:1 auf 6:1 Protomere pro Nukleinsäure für Nukleinsäuren der Länge $n \leq 12b(p)$, $14b(p) \leq n \leq 24b(p)$ und $26b(p) \leq n$ (Tabelle 4.2). Die zuvor erwähnte negative Kooperativität ist im Fall von YbiB L40E I51E aufgehoben, was es nun jedem in Lösung vorliegenden Protomer gestattet Nukleinsäuren zu binden. Folglich verschieben sich unter ansonsten identischen Messbedingungen die molaren Verhältnisse auf 1:1, 2:1 und 3:1.

Tabelle 4.2: Mittels Fluoreszenztitration bestimmte Stöchiometrie der YbiB-Nukleinsäure-Komplexe.

Stöchiometrie ^a	12b poly(dT)	14b poly(dT)	24b poly(dT)	26b poly(dT)	28b poly(dT)
	ssDNA	ssDNA	ssDNA	ssDNA	ssDNA
YbiBwt ^b	2.1 ± 0.2	3.8 ± 0.3	4.4 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.9 ± 0.8
YbiB L40E I51E ^b	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2			3.4 ± 0.1
YbiB R12A K14A R18A	1.8 ± 0.1	3.8 ± 0.3			5.4 ± 0.2
YbiB R4A K5A K8A	2.0 ± 0.2	3.9 ± 0.5			7.0 ± 0.7
R12A K14A R18A					

^a Die Stöchiometrie entspricht der Anzahl der YbiB-Protomere pro Nukleinsäure. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils im Triplikat gemessenen Stöchiometrien.

^b Die Ergebnisse stammen aus einer früheren Arbeit (Kaiser 2012)

Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich nun die Frage, inwiefern tatsächlich alle basischen Aminosäuren und im speziellen die sechs Lysine/Arginine des unteren Protomers (Abbildung 4.1) für eine effiziente Interaktion mit Nukleinsäuren notwendig sind, beziehungsweise ob diese mitunter die negative Kooperativität vermitteln. Die 6 Aminosäuren befinden sich zum einen auf einer relativ flexiblen Schlaufe (R12, K14 und R18) und zum anderen auf einer starren α -Helix (R4, K5, K8). Die Lysine und Arginine der Schlaufe wurden in einem Schritt mittels homologer Rekombination auf *multi-copy*-Plasmiden (3.2.14) und die der α -Helix schrittweise mittels QickChange Mutagenese (3.2.12) jeweils gegen Alanine ausgetauscht. Die Affinität und Bindungsstöchiometrie gegenüber einzelsträngigen poly(dT) Oligonukleotiden wurde für die YbiB-Varianten YbiB R12A K14A R18A und YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A mittels Fluoreszenztitration (3.4.7) bestimmt. Als Messsignal wurde die intrinsische Fluoreszenz des Tryptophan-Restes W173 verwendet, der sich am Rand der Furche befindet (Abbildung 4.1, C).

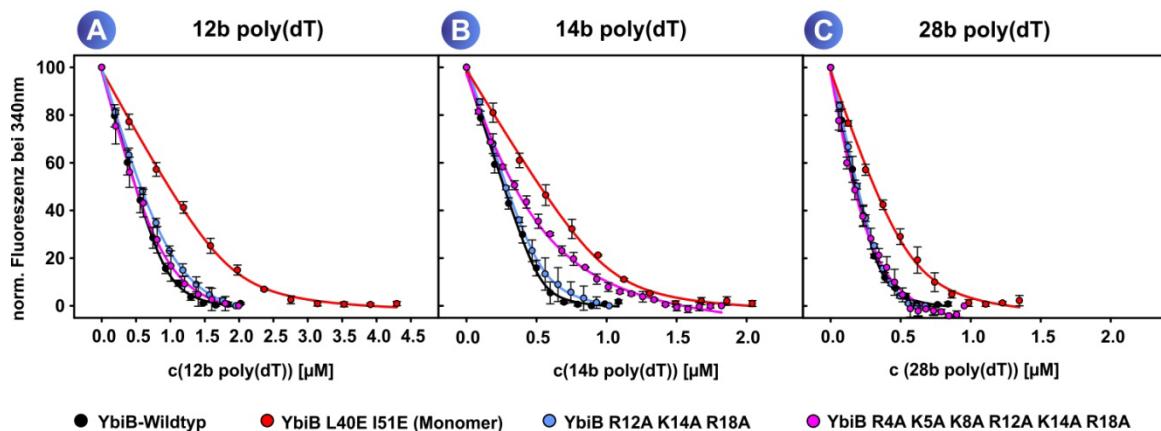


Abbildung 4.2: Einfluss der YbiB-Dimerisierung auf die Affinität und Stöchiometrie der Nukleinsäurebindung. Die Bindung von 12, 14 oder 28 Basen langen poly(dT)-Oligonukleotiden an diverse YbiB-Varianten (YbiB-Wildtyp, YbiB L40E I51E, YbiB R12A K14A R18A und YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A) wurde mittels Fluoreszenztitration verfolgt. Hierzu wurden stets 2 µM der jeweiligen YbiB-Variante vorgelegt und schrittweise Oligonukleotide hinzutitriert. Als Messsignal diente die Veränderung der Proteinfluoreszenz bei 340 nm. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde normiert und gegen die Oligonukleotidkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte aller Bindungskurven wurden im Triplikat gemessen und an diese mittels *curve fitting* der gezeigte Kurvenverlauf angepasst.

Die Auswertung der Titrationskurven (Abbildung 4.2) zeigte, dass die beiden neuen YbiB-Varianten YbiB R12A K14A R18A und YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A eine zum Wildtyp identische Bindungsstöchiometrie aufweisen (Tabelle 4.2). Folglich bedeutet dies, dass im Zuge der Nukleinsäurebindung die beobachtete negative Kooperativität anscheinend nicht durch eine der 6 mutierten Aminosäurereste auf die andere Bindetasche übertragen wird. Somit muss diesbezüglich die Kommunikation zwischen beiden Furchen über andere Aminosäurereste stattfinden. Im Gegensatz dazu zeigten die YbiB-Varianten YbiB R12A K14A R18A und YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A eine zur monomeren YbiB-Variante vergleichbar niedrigere Affinitäten gegenüber den eingesetzten poly(dT)-Oligonukleotiden (vgl. Tabelle 4.1). Als mögliche Begründung kann man die erniedrigte positive Ladungsdichte im Bereich der Furche heranziehen. Lediglich die YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A Variante zeigt im Fall des 14b poly(dT)-Oligonukleotids einen unerwartet hohen Anstieg des K_D -Wertes. Als mögliche Ursache hierfür wären zusätzliche sterische Effekte denkbar, da sich genau ab 14 Basen die Stöchiometrie von 2:1 auf 4:1 YbiB-Protomere pro Nukleinsäure erhöht und somit die räumliche Koordination des YbiB-DNA-Komplexes deutlich anspruchsvoller wird. Folglich könnte die Entfernung der Lysine/Arginine in diesem Bereich der Tasche synergistisch durch sterische Effekte verstärkt werden, was zu einer unerwartet stärkeren Erniedrigung der Affinität gegenüber einem 14b poly(dT)-Oligonukleotid führen könnte. Diese sterischen Effekte könnten im Fall der monomeren YbiB-Variante dadurch kompensiert werden, da zwei Monomere auf dem DNA-Strang deutlich weniger Platz benötigen als zwei Dimere. Ausgehend von diesen Beobachtungen kann jedoch festgestellt werden, dass bezüglich der Nukleinsäurebindung die verbleibenden Lysine/Arginine

ausreichend sind. Jedoch könnte die Dimerisierung im Rahmen der biologischen Funktion von YbiB eine entscheidende Rolle spielen, weshalb dieser Aspekt in den nachfolgenden Kapiteln des Öfteren noch aufgegriffen und im jeweiligen Kontext diskutiert wird.

Im Hinblick auf eine mögliche Rolle als DNA-Reparaturenzym wurde im Rahmen dieser Arbeit die Affinität gegenüber doppelsträngiger DNA genauer untersucht. Es wurden entsprechende doppelsträngige DNA-Fragmente hergestellt (3.2.16) und deren Interaktion mit YbiB-Wildtyp unter anderem mittels Fluoreszenzspektroskopie (3.4.7) und EMSA (3.4.6) beobachtet.

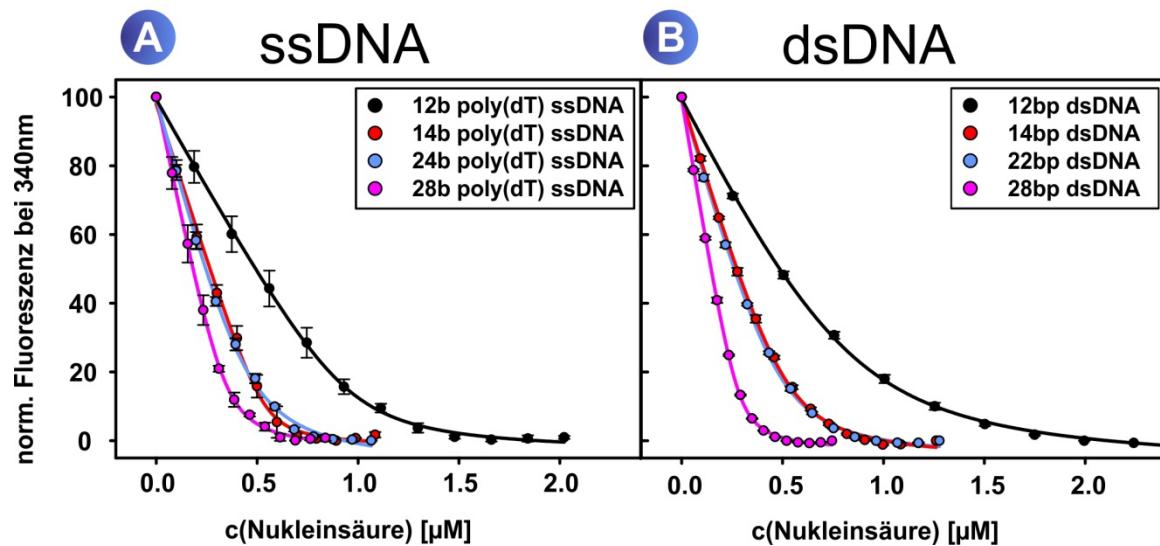


Abbildung 4.3: Bindung einzel- und doppelsträngiger DNA an den YbiB-Wildtyp. Die Bindung von unterschiedlich langer (A) einzel- und (B) doppelsträngiger DNA an den YbiB-Wildtyp wurde mittels Fluoreszenztitration verfolgt. Hierzu wurden stets 2 μM YbiB-Wildtyp vorgelegt und schrittweise die jeweilige Nukleinsäure hinzutitriert. Als Messsignal diente die Veränderung der Proteinfluoreszenz bei 340 nm. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde normiert und gegen die Oligonukleotidkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte aller Bindungskurven wurden im Triplikat gemessen und an diese mittels *curve fitting* der gezeigte Kurvenverlauf angepasst.

Tabelle 4.3: Vergleich der K_D -Werte und Stöchiometrien zwischen ssDNA und dsDNA.

	12b poly(dT) ssDNA ^(a)	12bp random dsDNA	14b poly(dT) ssDNA ^(a)	14bp random dsDNA	22bp random dsDNA	24b poly(dT) ssDNA ^(a)	28b poly(dT) ssDNA ^(a)	28bp random dsDNA
K_D -Werte [nM] ^(b)	39.3 ± 21.4	114.4 ± 12.3	17.4 ± 24.0	31.0 ± 2.1	33.6 ± 1.5	39.6 ± 6.7	19.1 ± 15.6	9.3 ± 0.9
Stöchiometrie ^(c)	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.4 ± 0.3	5.9 ± 0.8	7.1 ± 0.1

^(a) Die Ergebnisse stammen aus einer früheren Arbeit (Kaiser 2012)

^(b) Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der im Triplikat gemessenen K_D -Werte.

^(c) Die Stöchiometrie entspricht der Anzahl der YbiB-Protomere pro Nukleinsäure. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils im Triplikat gemessenen Stöchiometrien.

Aus den Messwerten der Fluoreszenztitrationen (Abbildung 4.3, Tabelle 4.3) geht hervor, dass der YbiB-Wildtyp ebenfalls eine hohe Affinität gegenüber doppelsträngiger DNA aufweist. Im Vergleich zu entsprechenden einzelsträngigen Oligonukleotiden erhöht sich der K_D -Wert lediglich um den Faktor 3, weshalb man annehmen kann, dass YbiB zumindest nicht aktiv zwischen einzel- oder doppelsträngiger DNA diskriminieren kann. Der geringe Unterschied in den Affinitäten zwischen ssDNA und dsDNA könnte durch die erhöhte Flexibilität einzelsträngiger DNA (Shusterman et al. 2004) erklärt werden, da diese sich vermutlich leichter an die Bindetasche anlagern kann. Im Gegensatz dazu scheint es im Fall der Bindungsstöchiometrie eine eindeutige Übereinstimmung zwischen ssDNA und dsDNA zu geben. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte ebenso die Auswertung der EMAS (Abbildung 4.4; Tabelle 4.4).

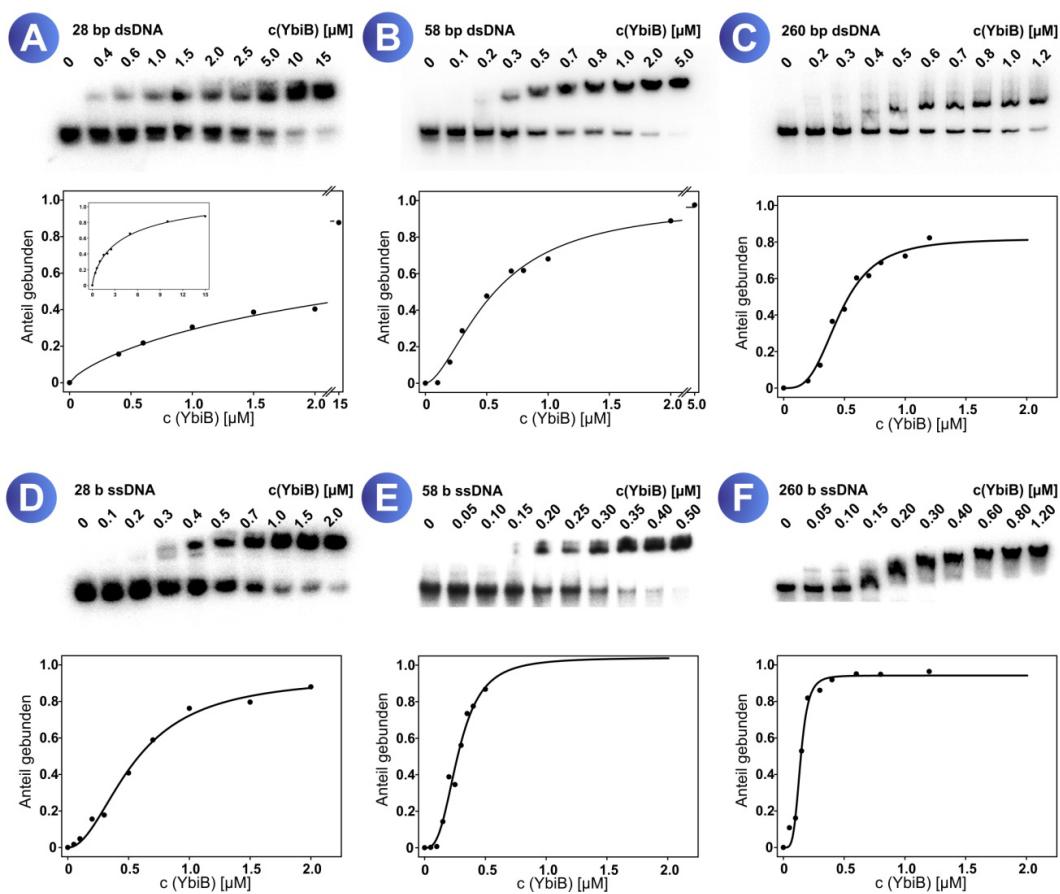


Abbildung 4.4: Mittels EMSA beobachtete Bindung von YbiB-Wildtyp an verschiedene einzel- und doppelsträngige DNA-Sonden. Dargestellt sind die mittels EMSA bestimmten Bindungskurven von YbiB-Wildtyp an unterschiedlich lange, radioaktiv markierte einzelsträngige (A, B, C) und doppelsträngige (D, E, F) DNA-Sonden. Unterschiedliche Proteinkonzentrationen wurden zusammen mit einer stets konstanten Menge radioaktiv markierter DNA-Sonde in 50 mM Tris/HCl 2 mM KP pH 7.5 inkubiert und anschließend auf einem nativen 6 oder 10%-igen Polyacrylamidgel analysiert. Die Protein Protomer-Konzentration (μM) der einzelnen Ansätze ist über jeder Spur angegeben. Der Anteil der gebundenen DNA-Sonde wurde indirekt durch die Quantifizierung der freien DNA-Sonde mittels Autoradiographie bestimmt und diese gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Graphen unter den EMSA-Autoradiogramm). Die Hill-Gleichung wurde an die Datenpunkte angepasst und darüber für jede DNA-Sonde der K_D -Wert und Hill-Koeffizient (n) berechnet (Tabelle 4.4). Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form bereits publiziert (Schneider et al. 2015).

Tabelle 4.4: Durch EMSA ermittelte Parameter der Bindung von YbiB-Wildtyp an ssDNA- und dsDNA-Sonden.

	28b random ssDNA	58b random ssDNA	260b random ssDNA
K _{Dapp} ^(a) [μM]	0.55	0.28	0.14
n ^(b)	1.7	3.8	4.5
	28bp random dsDNA	58bp random dsDNA	260bp random dsDNA
K _{Dapp} ^(a) [μM]	2.55	0.56	0.46
n ^(b)	1.0	1.7	2.6

^(a) apparette K_D-Werte und ^(b) n Hill-Koeffizient

Im Falle der EMASAs wurde anders als bei den Fluoreszenztitrationsexperimenten die DNA-Sonde vorgelegt und YbiB-Wildtyp in steigenden Konzentrationen zutitriert. Auf diese Weise war es möglich die Bindung des Proteins an die Nukleinsäure zu verfolgen, wodurch einige neue, interessante Aspekte der Nukleinsäurebindung von YbiB-Wildtyp identifiziert werden konnten. Im Gegensatz zu den mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeföhrten Bindungsstudien weisen die Titrationskurven der EMASAs einen sigmoidalen anstelle eines hyperbolischen Verlaufs auf. Ein sigmoidaler Kurvenverlauf deutet in der Regel auf ein kooperatives Bindeverhalten hin, was nach einer genaueren Analyse auch bestätigt werden konnte. Die aus den Übergangsbereichen bestimmten Hill-Koeffizienten (Tabelle 4.4) liegen mit einer Ausnahme alle über 1.5, was auf ein eindeutig kooperatives Bindeverhalten hindeutet. Demzufolge beginnen bereits gebundene YbiB-Dimere die Bindung weiterer YbiB-Dimere an den Nukleinsäurestrang. Diese Art des Bindungsmodus wurde bereits bei einigen anderen DNA interagierenden Proteinen wie beispielsweise dem SSB-Protein (*single stranded DNA binding protein*) beobachtet (Lohman und Ferrari 1994). Lediglich im Fall der doppelsträngigen 28bp dsDNA-Sonde konnte keine Kooperativität beobachtet werden, was vermutlich auf ähnliche Weise wie im Fall der YbiB-Variante YbiB R4A K5A K8A R12A K14A R18A durch sterische Effekte erklärt werden kann. Ab 26bp erfolgt der Wechsel der Stöchiometrie auf 3 YbiB-Dimere je Nukleinsäure. Somit müssen die 3 YbiB-Dimere auf der eingesetzten 28bp dsDNA-Sonde relativ dicht nebeneinander binden. Diese sterische Hinderung führt vermutlich dazu, dass nicht genügend YbiB-Dimere gleichzeitig auf dem DNA-Strang binden können und somit der kooperative Effekt nicht vollständig ausgebildet wird. Eine vergleichbare einzelsträngige DNA-Sonde könnte diesen Effekt durch ihre erhöhte Flexibilität ausgleichen (Shusterman et al. 2004). Dieses spezielle Bindeverhalten ist aufgrund der experimentellen Bedingungen ($c(YbiB_{wt}) \gg K_D$ -Wert) nicht mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachtbar, weshalb diese Titrationskurven einen hyperbolischen Verlauf aufweisen.

Zudem führt die beobachtete Kooperativität vermutlich dazu, dass eine DNA-Sonde zunächst vollständig mit YbiB-Proteinen besetzt wird, bevor die restlichen YbiB-Proteine im Ansatz an eine weitere DNA-Sonde binden. Aufgrund dessen ist in allen Spuren der EMSA-Gele neben der

ungebundenen DNA-Sonde lediglich noch die Bande der gesättigten DNA-Sonde zu erkennen. Ein vergleichbares Bindeverhalten kann beispielsweise bei RecA beobachtet werden (Bugreeva et al. 2005), welches ebenfalls kooperativ an einzelsträngige DNA bindet und somit größere Protein-DNA-Filamente bildet. Im Fall des YbiB-Proteins ist allerdings zu erkennen, dass die Bande der gebundenen DNA-Sonde kein einheitliches Migrationsverhalten aufweist. Die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten korrelieren hierbei mit der YbiB-Konzentration, wobei bei hohen Proteinkonzentrationen die Banden der gebundenen DNA-Sonde ein nahezu identisches Laufverhalten aufweisen. Die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität der gebundenen DNA-Sonde werden insbesondere im Übergangsbereich der 260b ssDNA-Sonde deutlich (Abbildung 4.4, F). Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin bestehen, dass die Bindung an die DNA-Sonde nur transient erfolgt, wodurch gleichermaßen keine stabilen YbiB-DNA-Filamente entstehen. Im Zuge der Durchführung der EMSAs geht man für gewöhnlich davon aus, dass der gebildete Protein-DNA-Komplex während der elektrophoretischen Trennung im nativen Gel bestehen bleibt. Sobald es sich jedoch um einen eher transienten Komplex mit relativ hohen k_{on} - und k_{off} -Raten handelt, kann es passieren, dass sich die Komponenten im elektrischen Feld soweit voneinander trennen, sodass das thermodynamische Gleichgewicht gestört wird. Dies könnte unter Umständen dazu führen, dass die DNA-Sonde in Abhängigkeit zur vorgelegten Proteinkonzentration teilweise nur unvollständig mit Proteinen besetzt wird und somit die gebundene DNA-Sonde unterschiedlich weit im elektrischen Feld wandert. Die Ausbildung transienter Protein-DNA-Komplexe wurde bereits bei einigen DNA-Glykosylasen beobachtet, die im Sinne des DNA-*hoppings* an ungeschädigte DNA-Fragmente mit relativ hohen k_{on} - und k_{off} -Raten binden (Grippon et al. 2011). Da die Interaktion zwischen YbiB-Wildtyp und Nukleinsäuren sequenzspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen stattfindet, könnte diese Erklärung ebenfalls für YbiB zutreffen. Aufgrund dessen war es nicht möglich, die Bande der gebundenen DNA-Sonde genauer zu quantifizieren, weshalb in diesem Fall entschieden wurde, den Anteil der gebundenen DNA-Sonde anhand des langsamen Verschwindens der freien DNA-Sonde zu bestimmen. Zusätzlich war es aufgrund der kooperativen Bindung der YbiB-Proteine an die DNA-Sonden nicht möglich distinkte K_D -Werte für die einzelnen Bindungereignisse zu bestimmen, weshalb aus den Titrationskurven lediglich apparente K_D -Werte abgeleitet werden konnten. Der Vergleich der erhaltenen apparenten K_D -Werte zeigt, dass die Affinität für ssDNA-Sonden um den Faktor 2 - 5 höher ist, als für entsprechende dsDNA-Sonden. Somit konnte sowohl mittels Fluoreszenzspektroskopie, als auch mittels EMSA eine leichte Präferenz gegenüber einzelsträngigen Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Die um den Faktor 5 maximal unterschiedlichen K_D -Werte sind jedoch vermutlich auf die hohe strukturelle Flexibilität der einzelsträngigen DNA zurückzuführen und weniger auf eine aktive Diskriminierung seitens des YbiB-Proteins.

Zusammenfassend kann man an dieser Stelle festhalten, dass der YbiB-Wildtyp keinerlei eindeutige Präferenz für eine bestimmte Art von Nukleinsäure zeigt. Die Interaktion mit unbeschädigten Nukleinsäuren erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit über ionische

Wechselwirkungen und es scheint sich in diesen Fällen eher ein transienter Komplex zu bilden (siehe EMSA-Daten). Die Betrachtung der Nukleinsäurebindung sowohl aus der Sicht des YbiB-Proteins (Fluoreszenzspektroskopie), als auch aus der Perspektive der Nukleinsäure (EMSA) lieferten einige neue Erkenntnisse. Die Ursache der im Vorfeld und im Rahmen dieser Arbeit beobachteten negativen Kooperativität zwischen den beiden Bindetaschen des homodimeren YbiB-Proteins konnte nicht aufgeklärt werden. Allerdings kann die Beteiligung einiger basischer Aminosäuren an diesem Mechanismus nahezu ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Daten der EMASAs eine eindeutige positive Kooperativität, was die Bindung mehrerer YbiB-Dimere an einen Nukleinsäurestrang betrifft. Inwiefern dieser Bindungsmodus für die biologische Funktion von YbiB relevant ist, muss in einer nachfolgenden Arbeit noch geklärt werden.

4.1.2 Bindung von YbiB-Wildtyp an modifizierte Nukleinsäuren

Interaktionsstudien mit strukturell intakten Nukleinsäuren legen den Schluss nahe, dass der Kontakt zwischen dem YbiB-Protein und den Nukleinsäuren nur transienter Natur ist. Unter der Annahme, dass es sich bei YbiB um ein potentielles DNA-Reparaturenzym der SOS-Antwort handelt, erscheint dieses Bindeverhalten auch plausibel zu sein. Dies lässt jedoch auch den Schluss zu, dass es eine oder mehrere DNA-Modifikationen geben müsste, die spezifisch von YbiB erkannt werden. Die Identifizierung solcher Modifikationen würde es erlauben, Rückschlüsse auf die biologische Funktion des YbiB-Proteins im Rahmen der SOS-Antwort zu ziehen. Demzufolge wurde bereits zuvor versucht, derartige DNA-Modifikationen dadurch zu ermitteln, dass der Phänotyp verschiedener *E. coli* $\Delta ybiB$ -Deletionsstämme sowohl ohne, als auch unter Anwesenheit eines DNA-schädigenden Reagens untersucht wurde (Schneider 2011, Kaiser 2012). In diesen Studien wurde mitunter das *ybiB*-Gen auch in Kombination mit anderen SOS-Genen deletiert. Unglücklicherweise konnte trotz verschiedener DNA-schädigender Reagenzien bei allen untersuchten Deletionsstämmen bezüglich *ybiB* kein signifikant auffälliger Phänotyp festgestellt werden. Folglich war es nicht möglich, anhand der gesammelten *in vivo* Daten, auf potentielle DNA-Modifikationen zu schließen, welche von YbiB unter Umständen spezifisch erkannt werden. Da es in zellbasierten Experimenten mitunter zur Überlagerung mehrerer zellulärer Effekte kommen kann, wodurch bestimmte Phänotypen unter Umständen nicht hervortreten, sollte im Rahmen dieser Arbeit anderweitig verfahren werden. So sollte die Untersuchung der Interaktion von YbiB mit unterschiedlich modifizierten Nukleinsäuren *in vitro* weitere Erkenntnisse über die tatsächliche biologische Funktion liefern. Da es eine Vielzahl an möglichen DNA-Modifikationen in Form von alkylierten, oxidierten oder reduzierten Nukleobasen gibt, musste eine sorgfältige Auswahl der zu untersuchenden Modifikationen getroffen werden. Von vielen DNA-Glykosylasen war beispielsweise bekannt, dass diese eine hohe Affinität gegenüber der von ihnen erzeugten abasischen Position (AP-site) aufweisen (Grippon et al. 2011, Morgan et al. 2011). Diese Form der Produktinhibition schirmt die erzeugte

AP-site vom Lösungsmittel ab, wodurch diese geschützt wird und somit das Risiko eines DNA-Einzelstrangbruches durch Hydrolyse der labilen AP-site deutlich verringert wird. Des Weiteren kann die immer noch gebundene DNA-Glykosylase auf diese Weise andere DNA-Reparaturenzyme an den Ort des DNA-Schadens rekrutieren, wodurch dieser weiter prozessiert werden kann (Gripon et al. 2011).

Basierend auf dieser Beobachtung wurde das Nukleinsäurebindeverhalten des YbiB-Wildtyps unter Anwesenheit eines AP-site-Analogons untersucht. Bei dem besagten Analogon handelt es sich um einen hydrolyseresistenten abasischen Furan-Ring (dSpacer, Abbildung 4.5), dem die Hydroxyl-Gruppe an der 1'-Position fehlt. Da ansonsten keine weiteren Unterschiede zwischen der AP-site und diesem Analogon bestehen, kann dieses stellvertretend in entsprechenden Experimenten eingesetzt werden. Um die Diskussion und die Beschreibungen in allen nachfolgenden Kapiteln und Experimenten zu vereinfachen, wird nicht weiter zwischen einer normalen AP-site und dem Analogon unterschieden und daher nur der Begriff der AP-site verwendet.

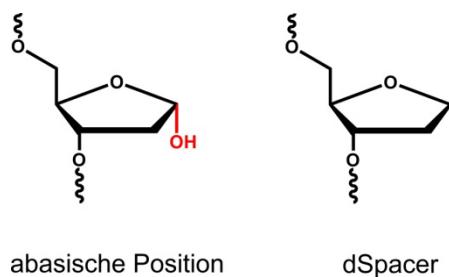


Abbildung 4.5: Vergleich zwischen abasischer Position und dSpacer-Analogon. Die unter anderem von DNA-Glykosylasen erzeugte abasische Position (AP-site) ist aufgrund der Hydroxyl-Gruppe an der 1'-Position relativ instabil. Das abasische Furan-Ring-Analogon (dSpacer) besitzt diese Hydroxyl-Gruppe nicht, weshalb es deutlich stabiler ist.

Sofern YbiB die AP-site erkennt, sollte YbiB bevorzugt an diese binden und sich ein relativ stabiler Komplex ausbilden. Diese Komplexbildung sollte sich deutlich von der Interaktion mit strukturell intakten Nukleinsäuren unterscheiden. Im Folgenden wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie (3.4.7) und Fluoreszenzpolarisation (3.4.9) die Interaktion von YbiB-Wildtyp mit einer AP-site untersucht.

So wurde unter der Annahme, dass YbiB spezifisch im Bereich der AP-site bindet versucht, die Bindung des ersten YbiB-Dimers an eine Nukleinsäure durch Variation der AP-site Position zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche 22bp dsDNA-Sonden hergestellt, die entweder keine oder in der Nähe des 5'- oder 3'-Endes eine AP-site besitzen. Um die Bindung des ersten YbiB-Dimers an die dsDNA-Sonde zu lokalisieren, befindet sich an einem der beiden 5'-Enden ein Dansyl-Fluorophor. Dieses spezielle Fluorophor reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen in seiner näheren Umgebung, wobei sich beispielsweise dessen Quantenausbeute durch die Interaktion mit Proteinen signifikant erhöht (Chen 1967). Die

Positionen der AP-sites auf den 22bp dsDNA-Sonden sind so gewählt, dass durch die Bindung an eine AP-site das Dansyl-Fluorophor entweder nicht oder vollständig mit dem YbiB-Dimer interagiert (siehe Abbildung 4.6, Schema I-III).

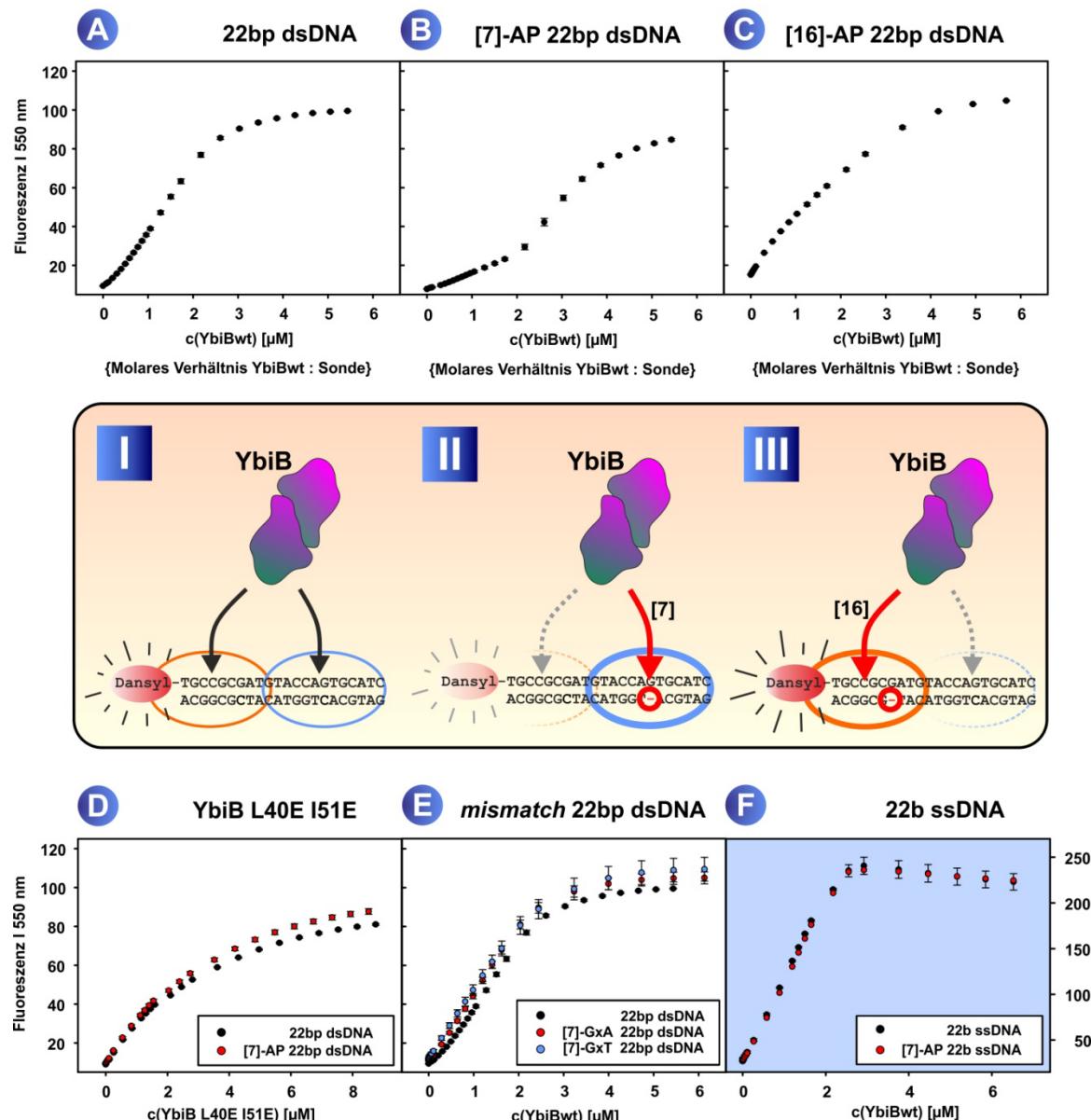


Abbildung 4.6: Bindung verschiedener YbiB-Varianten an DNA-Sonden unter Anwesenheit einer AP-site oder Fehlpaarung. Dargestellt sind die Titrationskurven (A-F) der Bindung verschiedener YbiB-Varianten an unterschiedliche DNA-Sonden. Es wurde jeweils 1 μ M Sonde vorgelegt und dazu die jeweilige YbiB-Variante hinzutitriert, weshalb die in den Graphen angegebene YbiB-Konzentration gleichzeitig dem molaren Verhältnis von Protein zur DNA-Sonde entspricht. Jede DNA-Sonde besitzt nur an einem der beiden 5'-Enden eine Dansyl-Gruppe und auf dem komplementären DNA-Strang entweder keine oder an Position [7] beziehungsweise [16] eine AP-site (kleiner roter Kreis) (Schema I-III). Die Bindung der YbiB-Dimere sollte entweder proximal (roter Kreis) oder distal (blauer Kreis) zum Dansyl-Fluorophor erfolgen. Die Schemata zeigen den jeweils vermuteten Bindungsmodus (Details im Haupttext). Die Titration (E) wurde mit DNA-Sonden durchgeführt, die an Position [7] eine Basenfehlpaarung (G-A bzw. G-T) enthielten.

Die Bindung an eine strukturell intakte DNA-Sonde zeigte den erwarteten Kurvenverlauf (Abbildung 4.6, A). In diesem Fall scheint es so zu sein, dass die Bindung des ersten YbiB-Dimers zu gleichen Teilen sowohl proximal, als auch distal zur Dansyl-Gruppe erfolgt (Abbildung 4.6, Schema I), weshalb die Dansyl-Fluoreszenz von Anfang an signifikant und gleichmäßig steigt. Sobald sich jedoch eine AP-site in dem vom Dansyl-Rest aus gesehenen distalen Ende der DNA-Sonde befindet, kann ein gänzlich anderer Verlauf der Dansyl-Fluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 4.6, B). In diesem Fall verändert sich das Fluoreszenzsignal anfänglich eher wenig, steigt jedoch nach Zugabe einer gewissen Menge YbiB-Protein plötzlich sprunghaft an. Eine plausible Erklärung für diesen Verlauf wäre, dass YbiB mit höherer Affinität im Bereich der AP-site bindet. Folglich würde die Bindung des ersten YbiB-Dimers distal erfolgen (Abbildung 4.6, Schema II). Dies würde die anfänglich niedrige Änderung der Dansyl-Fluoreszenz erklären, da das Bindungsereignis aufgrund der Distanz die Fluoreszenzeigenschaften des Dansyl-Restes nur geringfügig beeinflussen dürfte. Des Weiteren müssten alle distalen AP-sites ab einem zweifachen molaren Überschuss YbiB-Protomer (1:2-Stöchiometrie, vgl. Tabelle 4.3, entspricht $c(YbiB_{wt}) = 2 \mu\text{M}$) nahezu vollständig mit YbiB-Dimeren besetzt sein. Ab dieser YbiB-Konzentration müsste die Bindung weiterer YbiB-Dimere in der proximalen Position erfolgen und in der Tat untermauern die Messwerte mit ihrer jetzt deutlich erhöhten Fluoreszenzintensität diese Hypothese. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass sich der Effekt wie erwartet umgekehrt verhält, sobald sich eine AP-site proximal zur Dansyl-Gruppe befindet (Abbildung 4.6, C, Schema III). Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt hier bereits zu Beginn der Titration teilweise stärker als im Fall einer DNA-Sonde ohne AP-site. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass YbiB spezifisch im Bereich einer AP-site bindet. Interessanterweise scheint dieses Bindeverhalten weder bei einzelsträngigen DNA-Sonden mit distaler AP-site, noch bei der monomeren YbiB L40E I51E-Variante aufzutreten (Abbildung 4.6, D und F). Dies könnte bedeuten, dass sowohl die Dimerisierung des YbiB-Proteins, als auch das Vorliegen der AP-site in einem DNA-Doppelstrang zwingend notwendig sind, um das zuvor beschriebene Bindeverhalten zu ermöglichen. Um diese Fragen zu klären, müssen allerdings noch weitere Experimente durchgeführt werden.

Im Rahmen dieses speziellen Experiments wurde auf vergleichbare Weise stichpunktartig untersucht, ob YbiB-Wildtyp auch in der Lage ist einige Basenfehlpaarungen zu erkennen. Es wurden erneut 22bp dsDNA-Sonden verwendet, die nun aber an Position 7 des komplementären DNA-Stranges entweder ein Adenin oder Thymin besitzen und dadurch Basenfehlpaarungen mit Guanin hervorrufen (GxA, GxT). Der Titrationskurvenverlauf beider dsDNA-Sonden (Abbildung 4.6, E) war vergleichbar zu dem der intakten dsDNA-Sonde. Somit scheint YbiB zumindest mit diesen beiden Basenfehlpaarungen nicht spezifisch zu interagieren. Inwiefern es jedoch andere Basenfehlpaarungen gibt, die von YbiB als solche eindeutig erkannt werden, muss diesbezüglich durch weiterführende Experimente noch geklärt werden. Allerdings lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass der zuvor beobachtete Effekt im Zusammenhang mit AP-sites nicht allein auf der strukturellen Veränderung der DNA-Helix beruht, sondern gegebenenfalls weitere Faktoren bei

der Erkennung einer AP-site durch YbiB eine Rolle spielen. Im Anschluss wurde daher versucht die Bindung von YbiB-Wildtyp an eine AP-site genauer zu charakterisieren.

Zunächst wurde die Affinität von YbiB-Wildtyp gegenüber einer 12bp dsDNA-Sonde ohne und mit AP-site mittels Fluoreszenzpolarisation bestimmt. Die Messwerte konnten für die dsDNA-Sonde ohne bzw. mit AP-site an ein 1:1 Bindungsmodell (je DNA-Molekül genau ein Bindungsereignis) angepasst werden und man erhielt K_D -Wert von 202 ± 6 und 105 ± 3 nM (Abbildung 4.7). Folglich ergibt sich lediglich eine um den Faktor 2 erhöhte Affinität gegenüber einer AP-site.

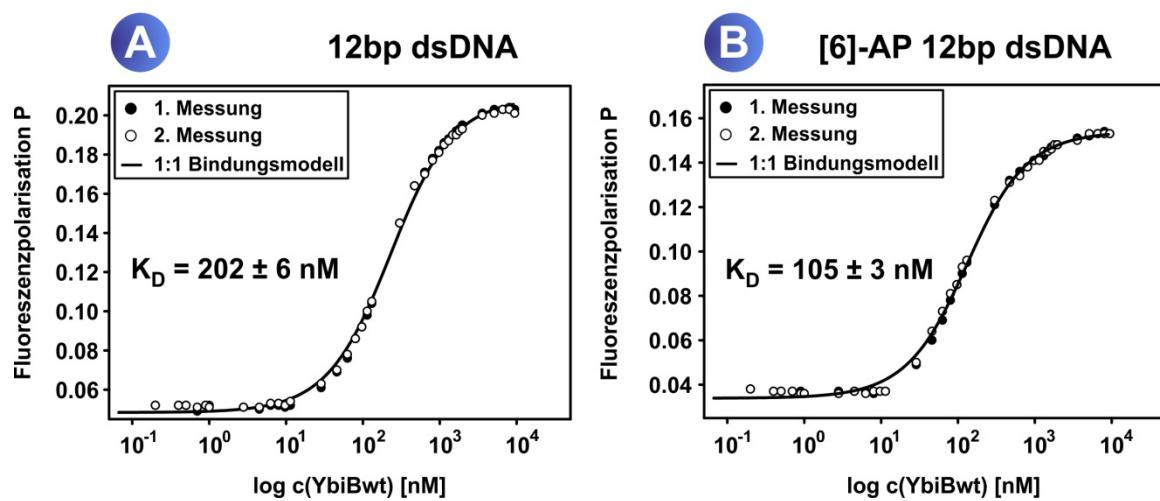


Abbildung 4.7: YbiB-Wildtyp Affinität gegenüber einer DNA mit AP-site. Gezeigt sind Fluoreszenzpolarisationsmessungen zur Bestimmung der Affinität von YbiB-Wildtyp gegenüber einer AP-site im Kontext einer 12bp dsDNA-Sonde. An einem der beiden 5'-Enden jeder dsDNA-Sonde befindet sich ein Chromis 500N Fluorophor, die AP-site ist an Position 6 des komplementären Stranges lokalisiert. In Duplikaten wurden jeweils 50 nM der DNA-Sonde vorgelegt und YbiB-Wildtyp schrittweise zutitriert. Die Fluoreszenzpolarisation des Chromis 500N Farbstoffes wurde verfolgt und gegen die logarithmische YbiB-Konzentration aufgetragen. An die Messpunkte beider Messreihen wurde letztlich ein 1:1 Bindungsmodell (je DNA-Molekül genau ein Bindungsereignis) angepasst und somit für die Sonde ohne AP-site (A) ein K_D -Wert von 202 ± 6 nM und für die Sonde mit AP-site ein K_D -Wert von 105 ± 3 nM bestimmt.

Der mittels Fluoreszenzpolarisation bestimmte Unterschied in den K_D -Werten ist zu gering, um die zuvor beobachtete Bindung eines YbiB-Dimers im Bereich einer AP-site zu erklären. Um diesem Widerspruch weiter nachzugehen, wurde die Bindung des YbiB-Proteins an die unter anderem zuvor verwendeten 22bp dsDNA-Sonden erneut mittels Fluoreszenzpolarisation verfolgt (Abbildung 4.8).

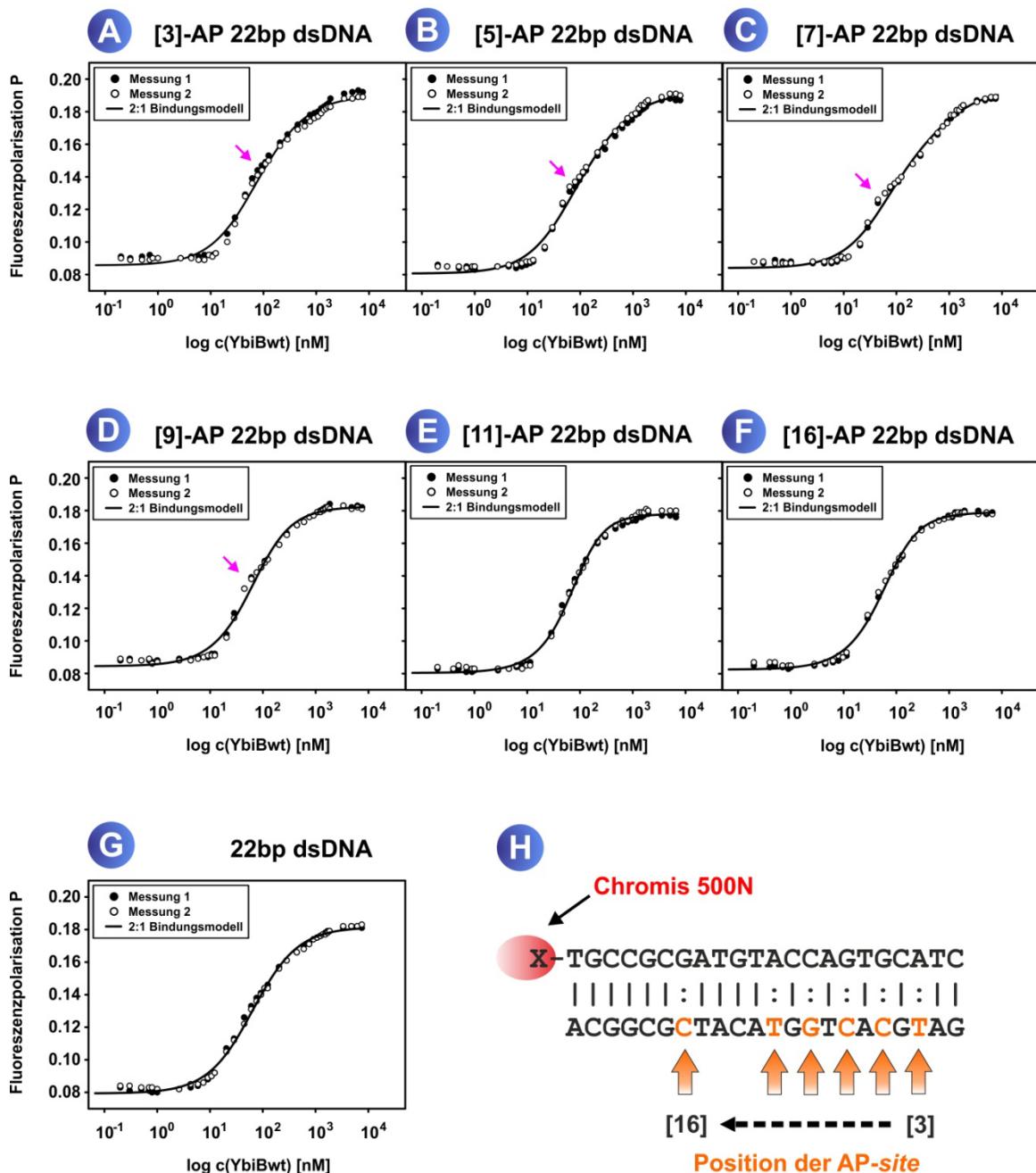


Abbildung 4.8: YbiB-Wildtyp Bindung an verschiedene 22bp dsDNA-Sonden. (A-G) Gezeigt ist die mittels Fluoreszenzpolarisation verfolgte Bindung von wildtypischen YbiB an verschiedene 22bp dsDNA-Sonden. (H) An einem der beiden 5'-Enden jeder dsDNA-Sonde befindet sich ein Chromis 500N Fluorophor. Die Position der AP-site auf dem komplementären Strang wurde für jede Sonde variiert. Im Duplikat wurden jeweils 5 nM dsDNA-Sonde vorgelegt und YbiB-Wildtyp schrittweise zutitriert. Die Fluoreszenzpolari-sation des Chromis 500N Farbstoffes wurde verfolgt und gegen die logarithmische YbiB-Konzentration aufgetragen. An die Messpunkte beider Messreihen wurde ein 2:1 Bindungsmodell (zwei Bindungsereignisse je DNA-Molekül) angepasst. In einigen Fällen (A-D) wurde ein anscheinend zweiphasiges Bindeverhalten beobachtet, dass sich durch das Auftreten einer kleinen Schulter (Pfeil, Magenta) auszeichnetet. Dies führte letztlich dazu, dass das 2:1 Bindungsmodell nur mäßig an die Messwerte angepasst werden konnten.

Die Auswertung der Fluoreszenzpolarisationdaten der 22bp dsDNA-Sonden zeigte, dass sich erneut die AP-site Position auf den Verlauf der Bindungskurve auswirkt. Vor allem die Kurvenverläufe der Sonden mit einer AP-site an Position 3, 5, 7 und 9 scheinen zumindest aufgrund des Auftretens einer kleinen Schulter einem zweiphasigen Bindungsmodell zu entsprechen (Abbildung 4.8, A-D). In diesen Fällen war es nicht möglich das einfache 2:1 Bindungsmodell (zwei Bindungsereignisse je DNA-Molekül) an die Messwerte anzupassen. Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Daten der Dansyl-Fluoreszenz (Abbildung 4.6) kann der in diesen Experimenten beobachtete Kurvenverlauf nicht durch eine veränderte Quantenausbeute erklärt werden, da der Farbstoff Chromis 500N nicht sensitiv auf Änderungen in seiner Umgebung reagiert und somit dessen Fluoreszenzeigenschaften im Verlauf der Messung konstant bleiben. Zudem wurde in diesen Experimenten die Fluoreszenzpolarisation und nicht die Fluoreszenzintensität beobachtet. Demzufolge basieren die im Zuge der Titration auftretenden Veränderungen des Messsignals allein auf der Bindung der YbiB-Proteine an die fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde, wodurch sich folglich deren Rotationsdiffusion signifikant ändert. Interessanterweise kann bei einigen DNA-Glykosylasen ein ähnlicher Kurvenverlauf beobachtet werden (Morgan et al. 2011). Allerdings ist in diesen Fällen die Schulter teilweise stärker ausgeprägt und wird gelegentlich von einem anschließenden Plateau begleitet. Grund hierfür sind die deutlich unterschiedlichen K_{D1} - und K_{D2} -Werte, welche die Bindung des ersten und des zweiten Proteins beschreiben. In der Regel müssen sich der K_{D1} - und K_{D2} -Wert mindestens um den Faktor 50 unterscheiden, damit ein zweiphasiger Kurvenverlauf erkennbar ist. Aus den vorangegangenen Experimenten ist allerdings bekannt, dass sich die Affinität zu Nukleinsäuren mit und ohne AP-site lediglich um den Faktor 2 voneinander unterscheidet und somit viel zu gering wäre, um die Schulter zu erzeugen. Des Weiteren erklärt dies ebenfalls nicht, weshalb die Schulter nur bei manchen und nicht bei allen Titrationskurven auftritt. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass die Interaktion mit einer AP-site unter Umständen eine Änderung der homodimeren YbiB-Struktur induziert, wodurch die Bindung weiterer Dimere an die noch freien Bereiche der dsDNA-Sonde behindert wird. Änderungen der Konformation bestimmter Bereiche der Proteinstruktur werden bei einigen DNA-Reparaturenzymen beobachtet, wodurch diese entweder ihre katalytisch aktive Konformation einnehmen (Kanazhevskaya et al. 2010) oder dadurch weitere essentielle Reparaturenzyme rekrutieren (Sharma et al. 2013).

Um dieser Annahme weiter nachzugehen, wurden unter Vorbehalt für alle dsDNA-Sonden die K_{D1} - und K_{D2} -Werte anhand eines 2:1 Bindungsmodells mittels DynaFit4 bestimmt. Hierzu wurden zwei Gleichgewichtsreaktionen definiert, die sowohl die Bindung des ersten, als auch des zweiten YbiB-Proteins an die DNA-Sonde beschreiben (vgl. DynaFit4 Input-Datei Anhang 7.3). Die Gleichgewichtsreaktionen werden anschließend durch DynaFit4 automatisch in Form verschiedener Differentialgleichungen ausgedrückt, diese iterativ an die Messwerte angepasst und dadurch die Gleichgewichtskonstanten K_{D1} - beziehungsweise K_{D2} -Wert der beiden Bindungsereignisse berechnet. Die auf diese Weise ermittelten Gleichgewichtskonstanten

dürfen jedoch angesichts der nur teilweisen Übereinstimmung des Modells mit den tatsächlichen Messwerten nicht als absolute K_D -Werte angesehen werden. Der Vergleich der für alle Kurven identisch bestimmten K_{D1} - und K_{D2} -Werte zeigte, dass sich der K_{D1} -Wert für alle Sonden relativ konstant im Bereich von 25 - 60 nM bewegt (Tabelle 4.5). Im Gegensatz dazu ändert sich der K_{D2} -Wert je nach Position der AP-site teilweise sehr abrupt. Trägt man die bestimmten K_D -Werte graphisch gegen die AP-site Position auf (Abbildung 4.9), stellt man fest, dass sich die Bindung des zweiten YbiB-Dimers immer weiter verschlechtert, sofern sich die AP-site von Position [3] (350 nM) auf Position [7] (915 nM) zubewegt. Sobald Position [9] erreicht ist, verbessert sich der K_{D2} -Wert schlagartig (170 nM) und normalisiert sich weiter bis zu einem Wert der mit dem K_{D2} -Wert einer intakten dsDNA-Sonde (125 nM) nahezu übereinstimmt.

Tabelle 4.5: Liste der aus den Fluoreszenzpolarisationskurven bestimmten K_{D1} - und K_{D2} -Werte.

22bp dsDNA-Sonden mit und ohne AP-site							
	[3]	[5]	[7]	[9]	[11]	[16]	---
K_{D1} -Wert [nM] ^a	47.6 ± 4.1	54.0 ± 3.5	56.4 ± 3.1	52.2 ± 4.8	84.1 ± 8.6	55.5 ± 4.3	27.9 ± 2.2
K_{D2} -Wert [nM] ^a	349.6 ± 65.9	545.0 ± 85.6	915.7 ± 129.9	168.8 ± 31.0	91.9 ± 15.8	115.1 ± 16.1	125.1 ± 9.4

^a Angegeben sind die mittleren K_D -Werte samt Standardabweichungen der mittels DynaFit4 ausgewerteten Titrationskurven (Abbildung 4.8). Die im Duplikat gemessenen Messdaten wurden an ein 2:1 Bindungsmodell angepasst, welches sowohl die Bindung des ersten (K_{D1}), als auch des zweiten (K_{D2}) YbiB-Proteins an die DNA-Sonde beschreibt.

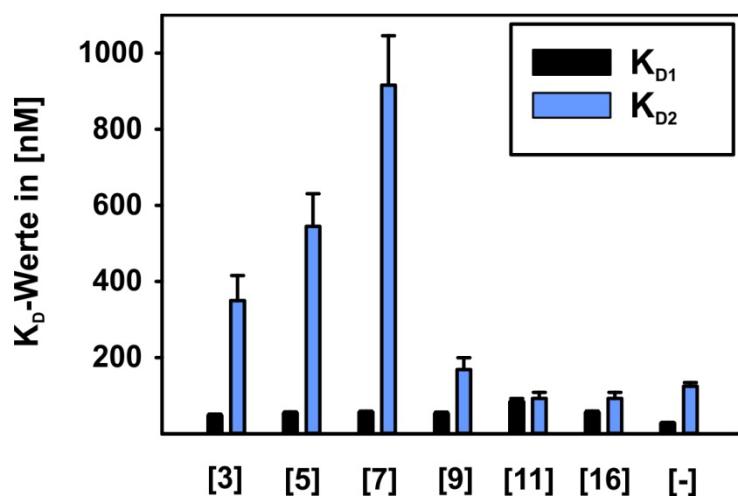


Abbildung 4.9: Grafische Darstellung der K_{D1} - und K_{D2} -Werte der Bindung von YbiB-Wildtyp an 22bp dsDNA-Sonden mit und ohne AP-site. Die K_{D1} - und K_{D2} -Werte aus Tabelle 4.5 wurden graphisch gegen die Position der AP-site aufgetragen.

Der relativ konstante K_{D1} -Wert und der AP-site-abhängige K_{D2} -Wert würden für ein Bindungsmodell sprechen, bei dem sich im Bereich der AP-site ein stabiler YbiB-DNA-Komplex bildet. Zudem wäre es denkbar, dass die Interaktion zu einer Veränderung der YbiB-Struktur führt. Somit könnte in einem entsprechenden Modell zunächst ein YbiB-Dimer ungehindert an die DNA-Helix binden, was den nahezu konstanten K_{D1} -Wert erklären würde. Kommt es im weiteren Verlauf dieser ersten Bindung zur Interaktion mit einer AP-site, könnte sich ein stabiler Komplex mit leicht geänderter Konformation ausbilden. Dieser stabile YbiB-DNA-Komplex könnte die Bindung des zweiten YbiB-Dimers erschweren, wodurch sich der K_{D2} -Wert vergleichsweise deutlich verschlechtert. Für diesen sterischen Effekt würde einerseits sprechen, dass sich der K_{D2} -Wert systematisch für AP-sites an den Positionen 3, 5 und 7 erhöht und unmittelbar im Anschluss ab Position 9 abrupt endet. Der sterische Effekt ist somit nicht relevant, sofern der stabile YbiB-DNA-Komplex nicht zu viel Platz auf der dsDNA-Sonde in Anspruch nimmt.

Obwohl dieses Bindungsmodell mit den Messwerten und Beobachtungen im Einklang steht, wurden dennoch weitere Experimente durchgeführt, um ein detaillierteres Bild über die molekularen Wechselwirkungen im Verlauf der Nukleinsäurebindung zu erhalten. So wurde unter anderem untersucht, inwiefern sich die Nukleinsäurebindung auf die Struktur des homodimeren YbiB-Proteins auswirkt. Zu diesem Zweck wurden sowohl FRET-Messungen, als auch diverse Kristallisationsexperimente wie in den beiden nachfolgenden Kapiteln im Detail beschrieben durchgeführt.

4.1.3 Untersuchung der strukturellen Dynamik im Zuge der Nukleinsäurebindung

Die Interaktion zwischen Proteinen und Nukleinsäuren führt in der Regel dazu, dass sich die Konformation beider Interaktionspartner verändert, was entweder essentiell für die Erkennung oder die Prozessierung der entsprechenden DNA-Modifikationen ist (Andrabi et al. 2014). Bei den zu TrpD2 verwandten TrpD- und NP-II-Enzymen wurde ebenfalls beobachtet, dass sich im Verlauf der Katalyse die α/β -Domäne mittels Scharnierbewegung zur α -Domäne hinbewegt (Pugmire et al. 1998, Marino et al. 2006). Man geht davon aus, dass diese Konformationsänderung die Substrate räumlich näher zusammenführt und so die Reaktion eingeleitet wird. Daher wäre es denkbar, dass auch das YbiB-Protein im Zuge der Nukleinsäurebindung, und im speziellen in Anwesenheit einer AP-site, seine Konformation maßgeblich ändert. Um die strukturelle Dynamik der Nukleinsäurebindung besser einschätzen zu können, wurde ein FRET-System etabliert. In diesem FRET-System wurden unterschiedlich platzierte Tryptophan-Reste als Donor und der Fluoreszenzfarbstoff N-7-Dimethylamino-4-Methylcoumarin-3-yl-Maleimid (DACM) als Akzeptor verwendet. So wurden in einer tryptophanfreien YbiB-Variante mittels QuikChange Mutagenese (3.2.12) an rational

ausgewählten Positionen Tryptophan-Reste eingefügt. Der DACM-Farbstoff wurde mittels Maleimid-Kopplung an ein ebenfalls nachträglich rational eingeführtes Cystein gekoppelt (3.3.9). Das DACM wurde als Akzeptor eingesetzt, da dessen Absorptionsspektrum zum einen mit dem Emissionsspektrum von Tryptophan überlagert. Zum anderen fluoresziert dieser Farbstoff erst nach Kopplung mit einem Cystein-Rest (Machida et al. 1977), wodurch ein mögliches Hintergrundsignal durch ungebundene DACM-Moleküle in der Protein-Präparation praktisch nicht auftritt.

Mit diesem FRET-System wurde versucht zum einen eine mögliche Scharnierbewegung der α/β -Domäne im Zuge der DNA-Bindung zu beobachten und zum anderen wurde die Dynamik zweier Schlaufen im Bereich der Bindetasche untersucht (Abbildung 4.10). Die Schlaufen haben in der Apostruktur einen Abstand von etwa 14 Å, was insbesondere für die Bindung von doppelsträngigen Nukleinsäuren problematisch ist, da diese einen Durchmesser von etwa 20 Å (B-DNA) aufweisen. Somit scheinen die beiden Schlaufen den Zugang zur Bindetasche zu limitieren. Man kann somit davon ausgehen, dass sich diese im Zuge der Nukleinsäurebindung signifikant bewegen sollten.

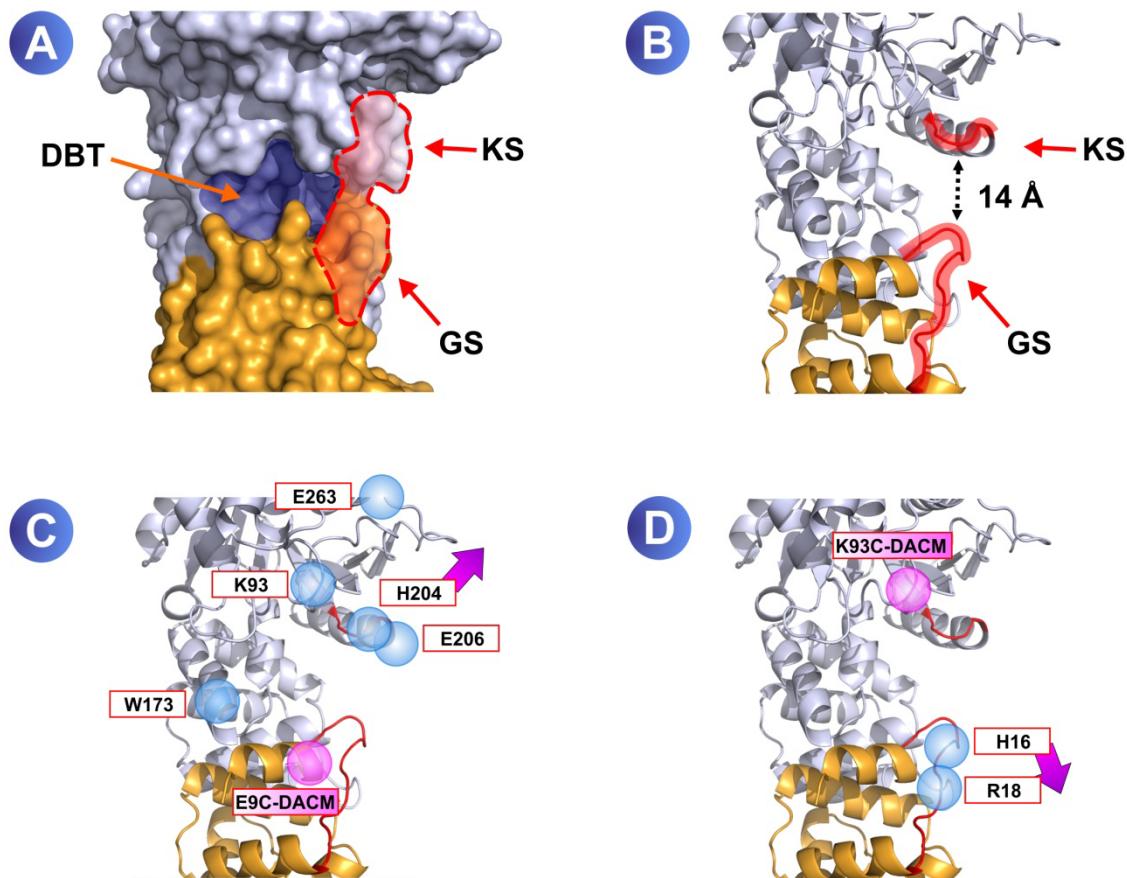


Abbildung 4.10: Lokalisation der potentiellen Nukleinsäurebindetasche, der flexiblen Schlaufen und Position aller Donor- und Akzeptor-Moleküle des FRET-Systems. (A) Eine der beiden Nukleinsäurebindetaschen (DBT = DNA-Bindetasche, dunkelblau eingefärbt) ist vergrößert dargestellt. Zudem ist zu erkennen, dass der Zugang zur Tasche durch das Zusammenwirken zweier Schlaufen (KS = kleine Schlaufe, GS = große Schlaufe) blockiert wird. (B) Diese beiden Schlaufen haben laut Apostruktur einen mittleren Abstand von etwa 14 Å. Da sich zumindest diese Schlaufen im Zuge der DNA-Bindung verändern müssen, wurde ein auf Tryptophan und DACM basierendes FRET-System etabliert. (C) Es wurde an Position 9 ein Cystein-Rest (E9C) eingefügt und dieser kovalent mit dem Akzeptor-Molekül DACM verknüpft. An den Positionen 93, 173, 204, 206 und 263 wurden in verschiedenen YbiB-Varianten Tryptophan-Reste als Donor-Molekül platziert. Anhand dieser Varianten war es möglich sowohl eine potentielle Scharnierbewegung, als auch die Dynamik der kleinen Schlaufe zu untersuchen. (D) Für die Untersuchung der konformationellen Flexibilität der großen Schlaufe, wurde in zwei weiteren Varianten an Position 16 und 18 ein Tryptophan-Rest eingefügt. Auf der Basis experimenteller Ergebnisse, wurde das DACM Akzeptor-Molekül in diesem Kontext an ein nachträglich eingeführtes Cystein an Position 93 gekoppelt. Sofern sich im Zuge der DNA-Bindung die Position einzelner Donor-Moleküle um mehr als 1 Å veränderte, wurde dies relativ zum Akzeptor-Molekül in Form eines Pfeiles (Magenta) angegeben.

Die FRET-Effizienz (E) wurde für jede YbiB-Variante wie im Abschnitt 3.4.8 beschrieben bestimmt. Diese wurde einerseits in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit eines 12bp dsDNA-Fragmentes ohne und mit AP-site durchgeführt. Anhand der beobachteten Effizienzen war es möglich, die räumliche Distanz (r) jedes Donor-Akzeptor-Pärchens im Zuge der Nukleinsäurebindung zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden für jede YbiB-Variante die

Quantenausbeute des jeweiligen Tryptophan-Donors (ϕ) und dadurch deren Försterradius (R_0) berechnet. Der Vergleich der relativen Distanzen in Ab- beziehungsweise Anwesenheit einer Nukleinsäure führte zur Identifizierung der sich im Rahmen des Bindungsergebnis verändernden Strukturelemente (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: FRET-Effizienzen, Quantenausbeuten, Försterradien und relativer Distanzen aller mittels FRET untersuchten YbiB-Varianten in Ab- und Anwesenheit von 12bp dsDNA-Fragmenten.

Position Donor (Akzeptor)	Quantenausbeute	R_0 [Å]	Nukleinsäure	Effizienz [%] ^(a)	r [Å]	Δr [Å] ^(b)
H16W (K93C-DACM)	0.06	24.1	ohne	62.5±0.9	22.1	
			dsDNA	49.9±0.8	24.1	2.0
			dsDNA+AP	52.0	23.8	1.6
R18W (K93C-DACM)	0.10	26.5	ohne	59.9±0.8	24.8	
			dsDNA	58.1±0.8	25.1	0.3
			dsDNA+AP	---	---	---
K93W (E9C-DACM)	0.06	23.9	ohne	62.0±1.4	22.0	
			dsDNA	62.3±0.2	21.9	-0.1
			dsDNA+AP	64.6	21.6	-0.4
W173 (E9C-DACM)	0.03	20.5	ohne	45.8±1.8	21.1	
			dsDNA	46.2±0.2	21.0	-0.1
			dsDNA+AP	---	---	---
H204W (E9C-DACM)	0.03	20.9	ohne	54.5±0.5	20.3	
			dsDNA	43.6±0.4	21.8	1.5
			dsDNA+AP	41.3	22.2	1.9
E206W (E9C-DACM)	0.04	22.3	ohne	72.9±0.2	18.9	
			dsDNA	69.4±0.6	19.5	0.6
			dsDNA+AP	68.0	19.7	0.8
E263W (E9C-DACM)	0.09	24.7	ohne	37.5±2.1	26.9	
			dsDNA	43.0±2.2	25.9	-1.0
			dsDNA+AP	42.%	26.0	-0.9

^(a) Die Messung ohne und mit 12bp dsDNA erfolgte jeweils im Duplikat. Hierzu wurden stets 1 μM einer YbiB-Variante ohne oder mit DACM vorgelegt und anschließend 1 μM eines 12bp dsDNA-Fragments hinzupipettiert. Die Tryptophan-Fluoreszenz wurde bei 290 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 300 – 550 nm aufgezeichnet. Die Messung mit [6]-AP 12bp dsDNA wurde jeweils nur einmal unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt.

^(b) Δr entspricht der Differenz des berechneten Abstandes r in Ab- beziehungsweise Anwesenheit eines 12bp dsDNA-Fragments

Die Auswertung der FRET-Messungen legen den Schluss nahe, dass sich im Zuge der Interaktion mit Nukleinsäuren wie erwartet die kleine und große Schlaufe (Abbildung 4.10) voneinander distanzieren. Dies ist durch die signifikante Erniedrigung der Effizienz und der damit verbundenen Erhöhung der Distanz insbesondere bei den Positionen 16 und 204 ersichtlich. Die kleine Schlaufe bewegt sich um 1.5 Å und die große Schlaufe um 2.0 Å vom jeweiligen Akzeptor-Molekül weg. Dadurch vergrößert sich deren Abstand von 14 Å auf mindestens 17.5 Å. An dieser

Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass lediglich ein 12bp dsDNA-Fragment an eine der beiden Bindetaschen des homodimeren YbiBs bindet (4.1.1), jedes Protomer aber über ein FRET-System verfügt. Somit wird in der Summe nur die mittlere Änderung der FRET-Effizienz detektiert, weshalb man davon ausgehen kann, dass die Distanz zwischen kleiner und großer Schlaufe im Einzelfall sogar größer ist. Somit sollte die DNA-Bindetasche in der Lage sein, auch doppelsträngige DNA-Fragmente ohne größere sterische Probleme aufzunehmen. Die Messwerte zeigen zudem keine größeren Unterschiede bei der Verwendung von dsDNA-Fragmenten ohne und mit einer AP-site. Dieses Ergebnis stellt jedoch in gewisser Weise die Annahme in Frage, dass YbiB zusammen mit einer AP-site einen stabilen Komplex bildet. Wenn man jedoch davon ausgeht, dass durch die Veränderung der Nukleinsäurestruktur ebenfalls ein stabiler Komplex entstehen kann, muss diese Annahme nicht zwingenderweise verworfen werden. Anhand der Messwerte kann nicht ausgeschlossen werden, dass Nukleinsäuren ohne und mit einer AP-site in unterschiedlichen Konformationen an YbiB binden. So bewegt sich in Anwesenheit einer AP-site in der DNA-Helix die kleine Schlaufe etwa 0.4 Å weiter vom Akzeptor-Molekül weg, wohingegen sich die große Schlaufe genau um 0.4 Å weniger weit wegbewegt. Inwiefern diese Beobachtung nur zufälliger Natur ist oder tatsächlich auf unterschiedliche Konformationen der gebundenen Nukleinsäure hindeutet, muss durch weitere Experimente aufgeklärt werden. Des Weiteren kann anhand der Messwerte der restlichen Positionen eine Scharnierbewegung der α/β - und α -Domäne bei der DNA-Bindung nahezu ausgeschlossen werden. Interessant ist ebenfalls die gemessene Distanz zwischen Position 263 und dem Akzeptor-Molekül DACM. Laut der Kristallstruktur des Apoproteins müsste die Distanz etwa 35 Å statt der beobachteten 26 Å betragen. Da sich die Position 263 in einer relativ flexiblen Schlaufe befindet, wäre es denkbar, dass diese in Lösung eine andere Konformation als in der Kristallstruktur einnimmt. Aufgrund der gemessenen Distanz müsste die Schlaufe unmittelbar oberhalb der Nukleinsäurebindetasche verlaufen. Im Zuge der Nukleinsäurebindung ändert sich jedoch die beobachtete Distanz nur noch geringfügig.

4.1.4 Weiterführende Strukturaufklärung des YbiB-DNA-Komplexes unter Verwendung der nichtnatürlichen Aminosäure *para*-Benzoyl-L-phenylalanin

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines YbiB-Nukleinsäure-Komplexes würde es ermöglichen, die zahlreichen Wechselwirkungen im Zuge der Nukleinsäurebindung besser zu verstehen. So könnten unter Umständen wichtige Positionen identifiziert werden, die beispielsweise die negative Kooperativität zwischen den beiden Bindetaschen vermitteln. Eine Methode, um eine Komplexstruktur in atomarer Auflösung zu erhalten, stellt die Röntgenkristallographie dar. Für diese Art der Strukturanalyse ist es notwendig, im Vorfeld einen möglichst geordneten Protein-DNA-Kristall zu erzeugen. In vorangegangen Arbeiten wurde bereits versucht, YbiB im Komplex mit einzelsträngigen Nukleinsäuren zu kristallisieren. Es

konnten allerdings letztlich nur reine Proteinkristalle erzeugt werden (Schneider 2011). Vermutlich führt die transiente Interaktion mit Nukleinsäuren dazu, dass sich kein stabiler YbiB-DNA-Komplex etabliert und somit nicht die Komplexe sondern vielmehr nur die YbiB-Proteine kristallisieren. Aus diesem Grund wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit die Idee entwickelt, die Nukleinsäuren kovalent mittels der nichtnatürlichen Aminosäure *para*-Benzoyl-L-phenylalanin (*p*BPA) an das YbiB-Protein zu koppeln. Das *p*BPA kann in die Primärstruktur von Proteinen nach einem bereits etablierten Verfahren (Wang und Schultz 2001, siehe 3.3.3) eingefügt werden. Diese photoreaktive, nichtnatürliche Aminosäure kann durch UV-Licht angeregt werden, wodurch diese mit anderen organischen Verbindungen kovalent verknüpft werden kann (3.3.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effizienz der Quervernetzung und die Isolierung kovalenter YbiB-DNA-Komplexe optimiert. Letztlich konnten zwei unterschiedliche YbiB-DNA-Komplexe in ausreichender Menge hergestellt werden. Im Anschluss wurde versucht die isolierten Komplexe mittels Dampfdiffusion im *hanging drop*-Verfahren (3.3.8) zu kristallisieren.

Die Erzeugung und Isolierung der kovalenten YbiB-DNA-Komplexe ist schematisch in Abbildung 4.11 dargestellt. Im Wesentlichen wird eine YbiB-*p*BPA-Variante mit Nukleinsäuren gemischt und anschließend mit UV-Licht bestrahlt, wodurch teilweise kovalente YbiB-DNA-Komplexe entstehen. Diese werden mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC) und Größenausschlusschromatographie (SEC) aus dem Ansatz isoliert.

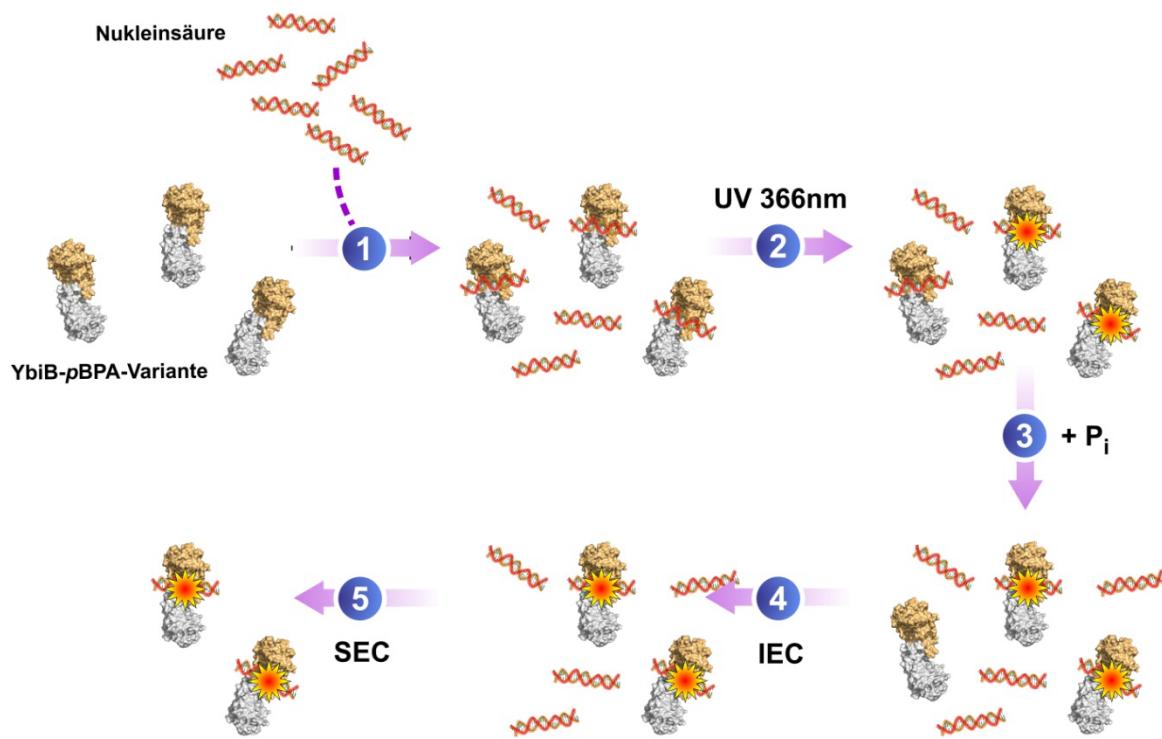


Abbildung 4.11: Erzeugung und Reinigung eines kovalenten YbiB-pBPA-DNA-Komplexes. (1) Eine YbiB-pBPA-Variante wird mit einem zweifachen molaren Überschuss Nukleinsäure gemischt und zunächst bei Raumtemperatur inkubiert. (2) Der Ansatz wird mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt, wodurch zu einem gewissen Teil kovalente YbiB-pBPA-DNA-Komplexe entstehen. Die kovalenten Komplexe müssen in den nächsten Schritten von den restlichen, nicht komplexierten Proteinen und Nukleinsäuren getrennt werden. (3) Zu diesem Zweck wird zunächst die Phosphationen-Konzentration (P_i) signifikant erhöht. Auf diese Weise lösen sich die nichtkovalenten YbiB-DNA-Komplexe auf. (4) So ist es möglich, die einzelnen Bestandteile anhand ihrer Nettoladung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC) zu trennen. (5) Im Anschluss werden überschüssige Nukleinsäuren mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) entfernt, wodurch sich lediglich kovalent verknüpfte YbiB-pBPA-DNA-Komplexe im Ansatz befinden sollten.

Als erstes wurde versucht, die Effizienz der Quervernetzungsreaktion durch Positionierung der nichtnatürlichen Aminosäure *p*BPA an unterschiedlichen Stellen im Bereich der DNA-Bindetasche zu verbessern. Hierbei wurde ebenfalls darauf geachtet, dass *p*BPA nicht in einem zu flexiblen Bereich der YbiB-Struktur platziert wurde. Dies könnte ansonsten in den anschließenden Kristallisationsexperimenten dazu führen, dass eine homogene Anordnung der kovalenten Komplexe in Form einer Einheitszelle erschwert oder sogar verhindert wird. Basierend auf den B-Faktoren der YbiB-Apostruktur (PDB: 4MUO) wurde *p*BPA an den Positionen 173, 178 oder 204 in die YbiB-Primärstruktur eingefügt. Erste Kopplungsexperimente zeigten, dass nur die Lokalisation an den Positionen 178 oder 204 zur Entstehung eines kovalenten YbiB-pBPA-DNA-Komplexes führt (Abbildung 4.12).

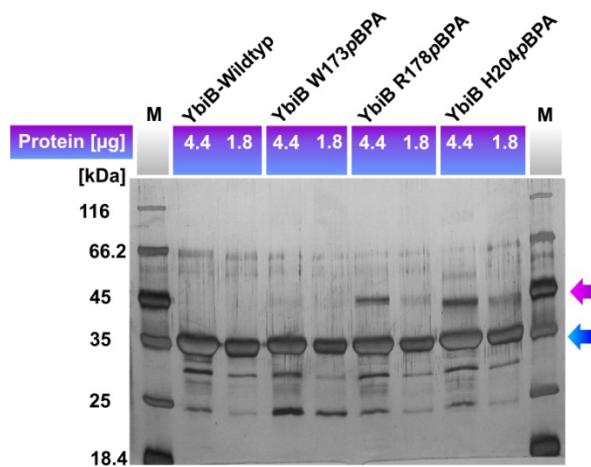


Abbildung 4.12: Einfluss der pBPA-Position auf die Kopplungseffizienz. Es wurde pBPA an verschiedenen Positionen im Bereich der DNA-Bindetasche eingefügt und deren Auswirkung auf die Kopplungseffizienz bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die YbiB-pBPA-Varianten (30 μM) zusammen mit einem 22bp dsDNA-Fragment (60 μM) inkubiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm teilweise miteinander verknüpft. Ohne weitere Reinigungsschritte wurden im Anschluss an die Bestrahlung unterschiedliche Mengen der Ansätze (4.4 und 1.8 μg Protein) auf einem 13.5%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteinbänder wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Neben der Bande des YbiB-pBPA-Protomers (blauer Pfeil) ist im Fall der Variante R178pBPA und H204pBPA die Bande des kovalenten Komplexes (magentaner Pfeil) zu erkennen. Als Negativkontrolle wurde der YbiB-Wildtyp ohne pBPA verwendet.

Die Position 178 ist nahezu genau im Zentrum der DNA-Bindetasche lokalisiert und aufgrund dessen in ihrer Flexibilität stark eingeschränkt. Die relativ gute Kopplungseffizienz in Kombination mit der stark eingeschränkten strukturellen Dynamik ließen Position 178 zunächst als optimalen Ankerpunkt zur Quervernetzung der YbiB-Struktur mit einer Nukleinsäure erscheinen. Nichtsdestotrotz musste die YbiB R178pBPA-Variante dennoch verworfen werden, da diese leider eine hohe Tendenz zur Aggregation aufweist. Dies wurde im Besonderen innerhalb der ersten Vorversuche zur Isolierung eines kovalenten YbiB pBPA(178)-DNA-Komplexes im analytischen Maßstab ersichtlich. Es wurde daher auf die Position 204 zurückgegriffen, die sich in einer kleinen Schlaufe am oberen Rand der DNA-Bindetasche befindet. Die Erzeugung verschiedener kovalenter YbiB-DNA-Komplexe wurde somit stets mit der YbiB H204pBPA-Variante durchgeführt. Insgesamt wurden zwei verschiedene Komplexe im größeren Maßstab hergestellt und gereinigt. In einem Fall wurde ein 20b poly(dT) Oligonukleotid und im anderen ein 22bp dsDNA-Fragment verwendet. Die Isolierung des kovalenten YbiB H204pBPA x 20b poly(dT)-Komplexes nach erfolgter Kopplungsreaktion ist in Abbildung 4.13 exemplarisch gezeigt.

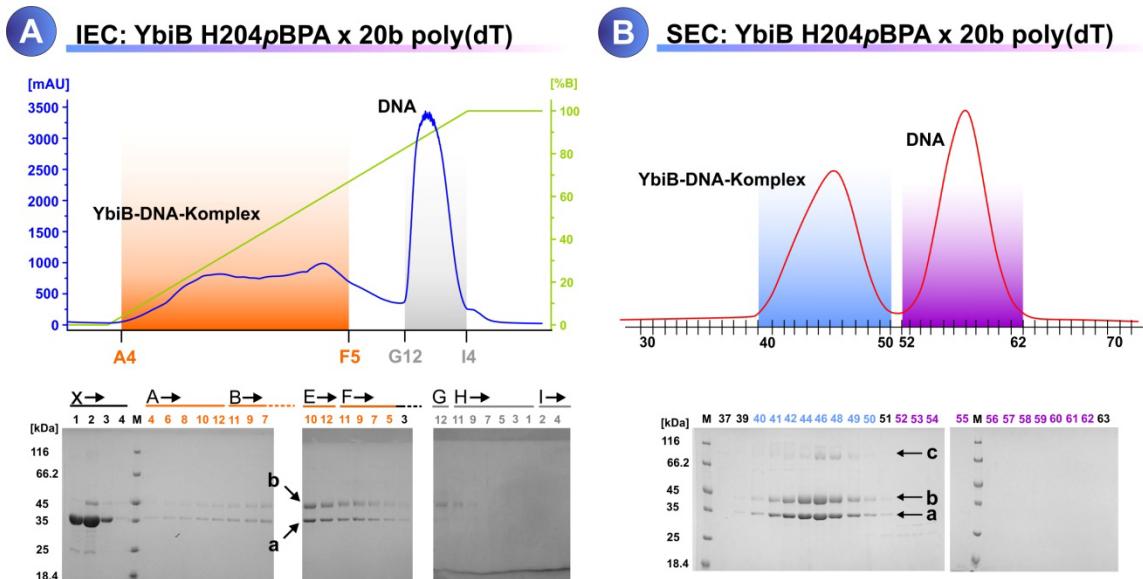


Abbildung 4.13: Isolierung des kovalenten YbiB H204pBPA x 20b poly(dT)-Komplexes. (A) Kovalente YbiB-DNA-Komplexe wurden zunächst mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC) von nichtgebundenen YbiB-Proteinen und überschüssigen Oligonukleotiden getrennt. Die einzelnen Komponenten wurden über einen NaCl-Gradienten voneinander getrennt und die Fraktionen die den kovalenten Komplex enthielten (A4 – F5) wurden vereinigt. Die Analyse mittels SDS-PAGE (unten) zeigt neben einer Bande des YbiB H204pBPA-Protomers (Pfeil a) auch eine Bande des Protomers mit gebundenem Oligonukleotid (Pfeil b). Die überschüssigen Oligonukleotide eluieren gegen Ende des Gradienten (G12 – I4). (B) Um restliche Oligonukleotide vollständig zu entfernen, wurden die nach der IEC vereinigten Fraktionen zusätzlich noch mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt. Das Elutionsprofil und das dazugehörige SDS-Gel des SEC-Laufs zeigen eine relativ homogene Präparation des kovalenten Komplexes. Auf dem Gel ist eine zusätzliche schwache Bande zu erkennen (Pfeil c), wobei es sich vermutlich um einen kovalenten Komplex handelt, bei dem zusätzlich beide YbiB-Protomere anhand des zweiten pBPA-Restes in der unbesetzten Bindetasche miteinander verknüpft wurden.

Die in der Literatur zu findende mittlere Kopplungseffizienz von 5-10% (Lee et al. 2009), konnte auch im Fall der kovalenten Verknüpfung von YbiB-pBPA-Varianten mit Nukleinsäuren beobachtet werden (Abbildung 4.12). Es ist somit notwendig eine kleine Fraktion der kovalenten YbiB-DNA-Komplexe von einer weitaus größeren Fraktion der ungebundenen YbiB-Proteine und überschüssigen Nukleinsäuren zu trennen. Da die ungebundenen YbiB-Proteine eine ausgeglichene Nettoladung besitzen, die kovalenten Komplexe jedoch leicht und die Nukleinsäuren deutlich negativ geladen sind, stellt die IEC eine effiziente Möglichkeit dar, diese drei Komponenten voneinander zu trennen. Im Verlauf der Trennung können zum einen ungebundene YbiB-Proteine vollständig und Nukleinsäuren teilweise von den kovalenten Komplexen abgetrennt werden (Abbildung 4.13, A). Im Anschluss werden noch verbliebene ungebundene Nukleinsäuren mittels SEC entfernt, wodurch man eine relativ reine Präparation des kovalenten Komplexes erreicht (Abbildung 4.13, B). Man beachte, dass wegen der negativen Kooperativität (vgl. Tabelle 4.2) nur eines der beiden Protomere des nativen YbiB-Dimers DNA bindet. Folglich werden in der denaturierenden SDS-PAGE zwei Banden in einer

1:1 Stöchiometrie sichtbar, die ein mit DNA quervernetztes Protomer und ein freies Protomer darstellen.

Es wurde schließlich versucht sowohl den gereinigten YbiB H204pBPA x 20b poly(dT)-Komplex, als auch den YbiB H204pBPA x 22bp dsDNA-Komplex unter verschiedenen Bedingungen zu kristallisieren. Letztlich konnte allerdings nur im Fall der Präparation des YbiB H204pBPA x 20b poly(dT)-Komplex ein entsprechender Kristall erzeugt werden, wobei hier zwei Optimierungs-runden notwendig waren (Abbildung 4.14).

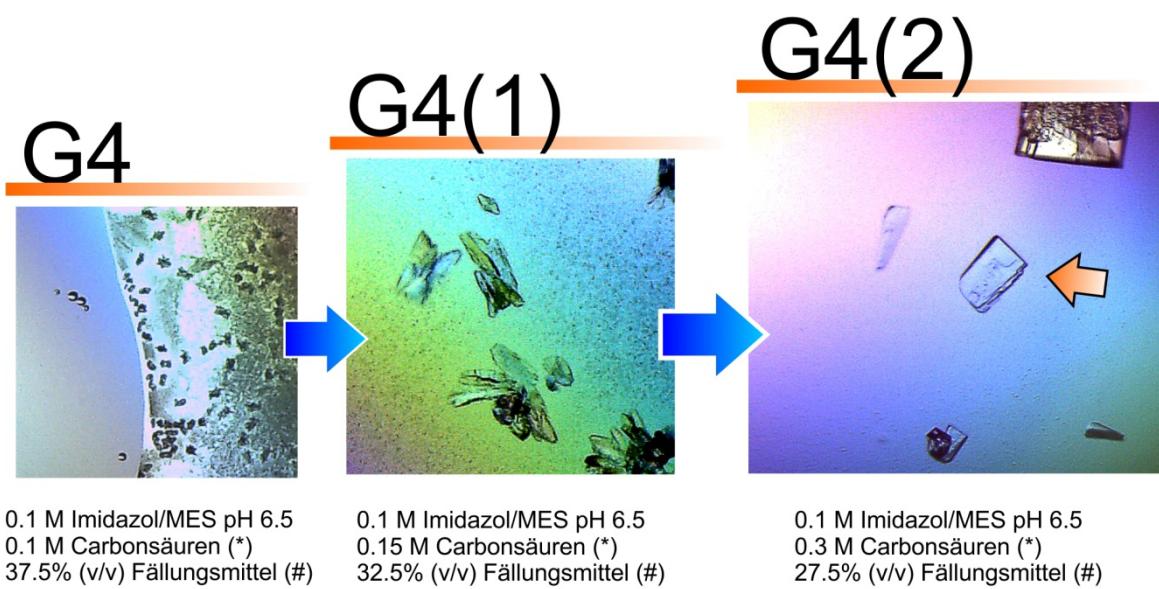


Abbildung 4.14: Optimierung der Kristallisationsbedingungen basierend auf dem Morpheus MD1-46 Kristallisations-Screen von Molekular Dimensions. Gezeigt ist die schrittweise Optimierung (G4, G4(1) und G4(2)) der Morpheus MD1-46 Bedingung G4, wodurch es möglich war mit der YbiB H204pBPA x 20b poly(dT)-Präparation einen entsprechend großen Proteinkristall (oranger Pfeil) zu erzeugen. (*) 1 M Carbonsäuren entsprechen 0.2 M Natrium-Formiat, 0.2 M Natrium-Citrat, 0.2 M Natrium-Oxamat, 0.2 M Ammonium-Acetat und 0.2 M Kalium-Natrium-Tartrat. (#) 75% (v/v) Fällungsmittel entsprechen 25% (v/v) MPD, 25% (v/v) PEG 1000 und 25% (v/v) PEG 3000.

Das Röntgenbeugungsmuster des Proteinkristalls wurde von Dr. Chitra Rajendran aufgenommen und ausgewertet. Unerwarteterweise handelt es sich leider bei der gelösten Proteinstruktur um die Apostruktur des YbiB-Wildtyps, wobei weder die nichtnatürliche Aminosäure pBPA noch ein Affinitätstag (*his₆-tag*) in der Struktur zu erkennen war. Aufgrund der homologen Expression der YbiB H204pBPA-Variante in *E. coli*-Zellen haben sich offensichtlich heterodimere YbiB-Dimere aus einem im Genom codierten wildtypischen und einem rekombinanten YbiB-Protomer gebildet. Im Verlauf der Kristallisation müssen sich die einzelnen Protomere untereinander ausgetauscht haben und lediglich der YbiB-Wildtyp war in der Lage einen geordneten Proteinkristall zu bilden. Erfreulicherweise sind in dieser neuen YbiB-Apostruktur fast alle

Aminosäuren inklusive Seitenketten mit einer durchschnittlichen Auflösung von 1.9 Å abgebildet (vollständige Kristall-Daten siehe Anhang 7.4). Insbesondere eine in der alten Apostruktur nicht aufgelöste, flexible Schlaufe ist in der neuen Struktur vorhanden (Abbildung 4.15). Nichtsdestotrotz wurden im Anschluss alle YbiB-*p*BPA-Varianten fortan stets in M15 Δ*ybiB* Zellen exprimiert.

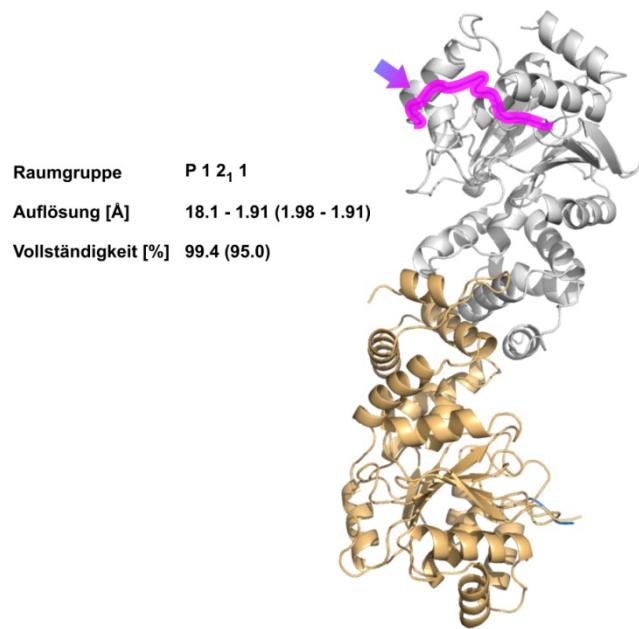


Abbildung 4.15: Neue YbiB-Apostruktur. Die Protomere der homodimeren YbiB-Struktur sind in Grau und Hellorange gezeigt. Im Gegensatz zur alten YbiB-Apostruktur ist in der neuen ebenfalls eine sehr flexible Schlaufe (Magenta) der α/β-Domäne aufgelöst.

Nachdem es nicht gelungen ist, eine Kristallstruktur von YbiB mit gebundener Nukleinsäure zu erhalten, wurde versucht mittels *p*BPA zumindest die potentielle Bindestelle weiter einzugrenzen. Zu diesem Zweck wurde *p*BPA an den Positionen 16, 21, 204, 248, 263 und 290 platziert, um mit einzelnen Varianten die Oberfläche von YbiB relativ gleichmäßig abzudecken. Unter identischen Bedingungen (3.3.4) wurde die jeweilige YbiB-*p*BPA-Variante mit einem 22bp dsDNA-Fragment gemischt und die Kopplungsreaktion durch Bestrahlung mit UV-Licht gestartet. Um selbst geringe Mengen des kovalenten Komplexes detektieren zu können, wurde zum Teil ³²P-markierte 22bp dsDNA verwendet. Die Kopplungsansätze wurden im Anschluss mittels Elektrophorese und Autoradiographie analysiert (Abbildung 4.16).

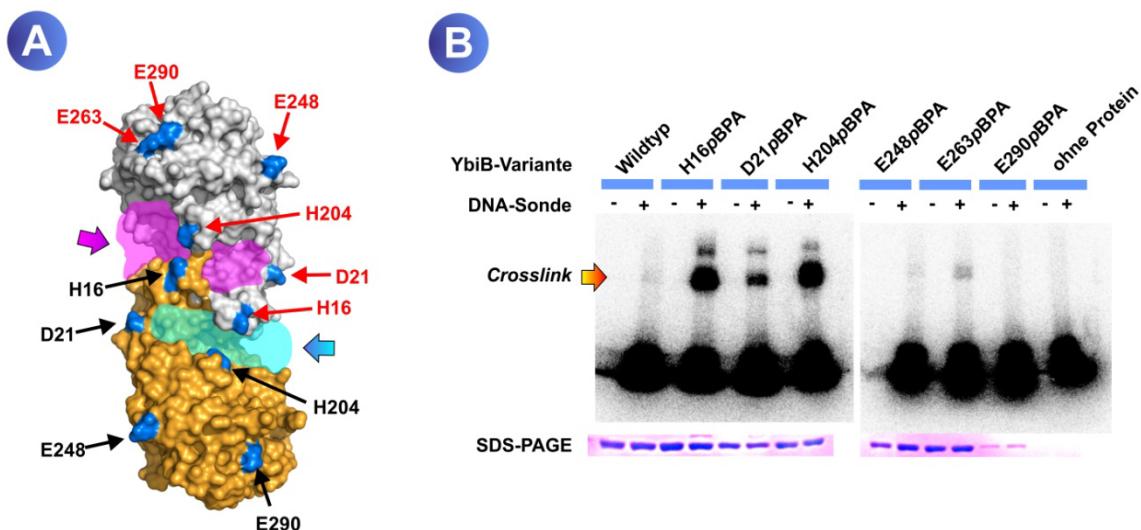


Abbildung 4.16: Eingrenzung der Nukleinsäurebindetasche mittels *pBPA*-vermittelter kovalenter Komplexbildung. (A) Die Oberflächen der beiden YbiB-Protomere sind in Grau und in Hellorange dargestellt und die beiden potentiellen Nukleinsäurebindetaschen sind in Magenta und Cyan eingefärbt. An den Positionen 16, 21, 204, 248, 263 und 290 (blau) wurde in jeweils unterschiedlichen YbiB-Varianten ein *pBPA*-Rest eingeführt. Die Positionen sind je nach Zugehörigkeit zu einem der beiden Protomere entweder in Rot oder in Schwarz beschriftet. (B) Die verschiedenen YbiB-*pBPA*-Varianten (30 µM) wurden mit einem 22bp dsDNA-Fragment (60 µM) kovalent verknüpft und direkt im Anschluss mittels Elektrophorese auf einem 13.5%-igen SDS-Gel getrennt. Da ein Teil der eingesetzten Nukleinsäuren mit ³²P-markiert wurde (1:1000 Anteil), konnten diese anschließend mittels Autoradiographie detektiert werden. Es wurden in allen Spuren (abgesehen von E290*pBPA*) nahezu identische Mengen der YbiB-*pBPA*-Varianten aufgetragen (siehe Ausschnitt SDS-PAGE). Aufgrund der Kopplungseffizienz von ca 5 - 10% konnte die Bande des mit einer Nukleinsäure verknüpften YbiB-Protomers lediglich mittels Autoradiographie eindeutig detektiert werden. In den Spuren der Varianten H16*pBPA*, D21*pBPA* und H204*pBPA* sind entsprechende Banden (*crosslink*) des kovalenten Komplexes zu erkennen. Als Negativkontrollen wurde entweder kein Protein oder der YbiB-Wildtyp verwendet.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass es nur möglich war, kovalente Komplexe in nennenswerten Mengen zu erzeugen, sofern sich der *pBPA*-Rest im Bereich der vorhergesagten Bindetasche befindet. Die Position 16 und 204 befinden sich in zwei Schlaufen, die sich im Verlauf der Nukleinsäurebindung verlagern und sich somit in räumlicher Nähe zur gebundenen Nukleinsäure befinden. Interessant ist allerdings, dass es möglich ist, einen kovalenten Komplex über Position 21 zu etablieren, da dieser sich eher an einer ungünstigen Stelle am Rand der Bindetasche befindet. Demzufolge muss sich die Nukleinsäure ebenfalls an diesen Bereich der YbiB-Struktur anlagern, was ebenfalls bedeutet, dass die Ausmaße der Nukleinsäurekontaktefläche geringfügig größer sind, als anfänglich vermutet. Im Fall der Variante E263*pBPA* ist ebenfalls eine leichte Bande im Größenbereich des kovalenten Komplexes zu erkennen. Diese Position befindet sich in einer sehr flexiblen Schlaufe und mittels FRET (4.1.3) wurde bereits beobachtet, dass diese Schlaufe im Gegensatz zur statischen Kristallstruktur vermutlich direkt über der gebundenen Nukleinsäure verläuft. Demzufolge wäre die Bildung eines kovalenten Komplexes zumindest theoretisch möglich, kann aber aufgrund der niedrigen

Intensität der Bande nicht mit Sicherheit bestätigt werden. An den beiden verbliebenen Positionen 248 und 290 scheint es zu keiner Quervernetzung mit Nukleinsäuren zu kommen. Daher kann man in Übereinstimmung mit der anfänglichen Hypothese davon ausgehen, dass die Nukleinsäure an eine der beiden identischen Bindetaschen (Abbildung 4.16, A) bindet und sich nicht an andere Bereiche der YbiB-Struktur anlagert. Der Versuch wurde zudem mit einem kürzeren 14bp dsDNA-Fragment wiederholt, wobei ein vergleichbares Resultat erzielt wurde (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang ist allerdings interessant, dass sich selbst unter Verwendung von relativ kurzen 14bp dsDNA-Fragmenten ein kovalenter Komplex an Position 21 gebildet hat. Vergleicht man die Intensität der Bande des kovalenten Komplexes für die Positionen 16, 21 und 204, so stellt man fest, dass die Intensität für die Positionen 16 und 204 deutlich höher ist als die der Position 21. Aufgrund dieses Unterschieds kann man vermuten, dass die Nukleinsäure im Zuge der Bindung nicht immer mit der Position 21 in direktem Kontakt steht. Diese Beobachtung steht zudem im Einklang mit der zuvor aufgestellten Hypothese (4.1.1 und 4.1.2), dass sich lediglich ein transienter Komplex mit intakten Nukleinsäuren ausbildet. Die Bindung des YbiB-Dimers erfolgt somit über die gesamte Länge der eingesetzten Nukleinsäure, wodurch sich in manchen Fällen die Nukleinsäure in räumlicher Nähe zur Position 21 befindet. Dies bedeutet allerdings ebenfalls, dass im Verlauf jeder mittels *p*BPA-vermittelten Kopplungsreaktion verschiedene kovalente YbiB-DNA-Komplexe entstehen, die die Nukleinsäure an teilweise deutlich unterschiedlichen Positionen gebunden haben. Diese Annahme würde erklären, weshalb es selbst nach einigen Versuchen nicht möglich war, einen kovalenten YbiB-DNA-Kristall zu erzeugen. Die in den Kristallisationsexperimenten eingesetzten kovalenten YbiB-DNA-Komplexe, sind vermutlich hinsichtlich der Position der Nukleinsäure in der Bindetasche zu inhomogen, als dass diese einen entsprechend großen und einheitlichen Protein-DNA-Kristall bilden könnten. Es wäre somit überlegenswert, die Art der Kopplung zu ändern (siehe Abschliessende Diskussion), um einen geordneten YbiB-DNA-Komplex zu erhalten.

4.2 AUFKLÄRUNG EINER POTENTIELLEN DNA-GLYKOSYLASEAKTIVITÄT

Zu Beginn dieser Dissertation wurde wie in 1.2 ausführlich beschrieben, aufgrund der Zugehörigkeit zur SOS-Antwort und der von TrpD- und NP-II-Enzymen katalysierten Reaktion der Bildung beziehungsweise Spaltung von N-glykosidischen Bindungen angenommen, dass es sich bei YbiB um eine neuartige DNA-Glykosylase handelt. Die Fähigkeit Nukleinsäuren mit einer relativ hohen Affinität zu binden, unterstützte diese Hypothese zusätzlich. Da die Anzahl bekannter DNA-Schäden oder gewollter DNA-Modifikationen relativ groß ist, wurden bereits im Vorfeld einige *in vivo* Experimente durchgeführt, um die Art des möglicherweise von YbiB erkannten Schadens etwas einzugrenzen (Schneider 2011, Kaiser 2012). Diese Vorgehensweise lieferte jedoch aufgrund der starken Redundanz der DNA-Reparaturmechanismen keine neuen Erkenntnisse, weshalb im Rahmen dieser Arbeit versucht wurde, eine mögliche DNA-

Glykosylaseaktivität *in vitro* zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst einzel- und doppelsträngige DNA-Fragmente über simple chemische oder molekularbiologische Reaktionen modifiziert. Diese modifizierten Nukleinsäuren wurden anschließend zusammen mit YbiB oder mit einer bereits charakterisierten DNA-Glykosylase als Referenz inkubiert und es wurde versucht, anhand der entstandenen Reaktionsprodukte eine DNA-Glykosylaseaktivität für bestimmte DNA-Modifikationen nachzuweisen. Die in den nachfolgenden Experimenten als Positivkontrollen verwendeten *E. coli*-Glykosylasen AlkA und MUG wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert, rekombinant exprimiert und gereinigt. Das *E. coli* FPG konnte käuflich erworben werden.

4.2.1 Untersuchung der Aktivität gegenüber methylierten Nukleobasen

Neben funktionell relevanten DNA-Modifikationen wie dem 5-Methyl-Cytosin (Riggs und Jones 1983) stellen ungewünschte DNA-Alkylierungen eine große Klasse von DNA-Schäden dar. Die Alkylierung von Nukleinsäuren erfolgt in den meisten Fällen durch exogene Alkylierungsreagenzien, die teilweise spezifische Alkylierungsmuster aufweisen (Beland und Poirier 1994). Da die meisten komplexeren Alkylierungsreagenzien wie Aflatoxine neben der initialen Modifizierung der Nukleobasen des Öfteren zu weitreichenderen DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen, wurde die Untersuchung einer möglichen DNA-Glykosylaseaktivität des YbiB-Proteins zunächst auf methylierte Nukleinsäuren beschränkt. Als Methylierungsreagenz wurde N-Methyl-N-Nitrosourea (NMU) verwendet, da dieses ein relativ breites Alkylierungsmuster aufweist, wodurch demzufolge eine große Anzahl unterschiedlich methylierter Nukleobasen erzeugt werden kann. Da jedoch selbst unter optimalen Bedingungen der Anteil an methylierten Basen nach der Inkubation mit NMU relativ gering sein sollte, wurde mit Tritium markiertes NMU im Methylierungsansatz (3.4.11) verwendet. Es war somit möglich selbst geringste Mengen methylierter Nukleobasen nach einer erfolgreichen DNA-Glykosylasereaktion anhand der Radioaktivität der übertragenen Methylgruppe nachzuweisen. Die methylierten Nukleinsäuren wurden zusammen mit YbiB oder mit der als Positivkontrolle dienenden DNA-Glykosylase AlkA inkubiert, anschließend mögliche Reaktionsprodukte isoliert und mittels HPLC-Analytik und Szintillationszähler analysiert (3.4.11). Dieses prinzipielle Vorgehen zur Identifizierung einer potentiellen DNA-Glykosylaseaktivität ist schematisch in Abbildung 4.17 dargestellt. Die Elutionsprofile der einzelnen Experimente sind in Abbildung 4.18 zusammengefasst.

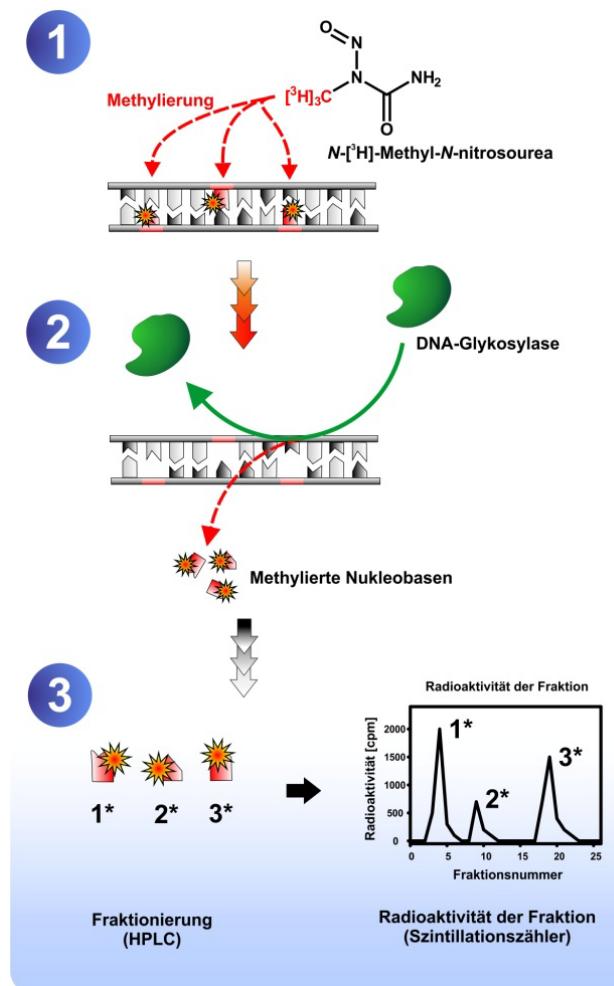


Abbildung 4.17: Prinzip der Identifizierung einer DNA-Glykosylaseaktivität im Kontext methylierter DNA-Schäden. Die mittels $N-[^3H]-Methyl-N\text{-Nitrosourea}$ radioaktiv methyierte Nukleinsäure (1) wird zusammen mit einer DNA-Glykosylase inkubiert (2). Im Zuge der DNA-Glykosylasereaktion werden die vom Enzym erkannten, geschädigten Nukleobasen aus der Nukleinsäure entfernt. Im Anschluss an die Reaktion, werden die freigesetzten Nukleobasen von den im Reaktionsansatz befindlichen Proteinen und Nukleinsäuren abgetrennt. (3) Die unterschiedlich radioaktiv methylierten Nukleobasen (1^* , 2^* und 3^*) werden zunächst mittels HPLC-Analytik fraktioniert und anschließend die Radioaktivität jeder Fraktion mittels Szintillationszähler bestimmt. Durch Auftragung der Radioaktivität gegen die Fraktionsnummer wird ein Elutionsprofil erzeugt, welches Aufschluss über das Vorhandensein einer DNA-Glykosylaseaktivität geben kann.

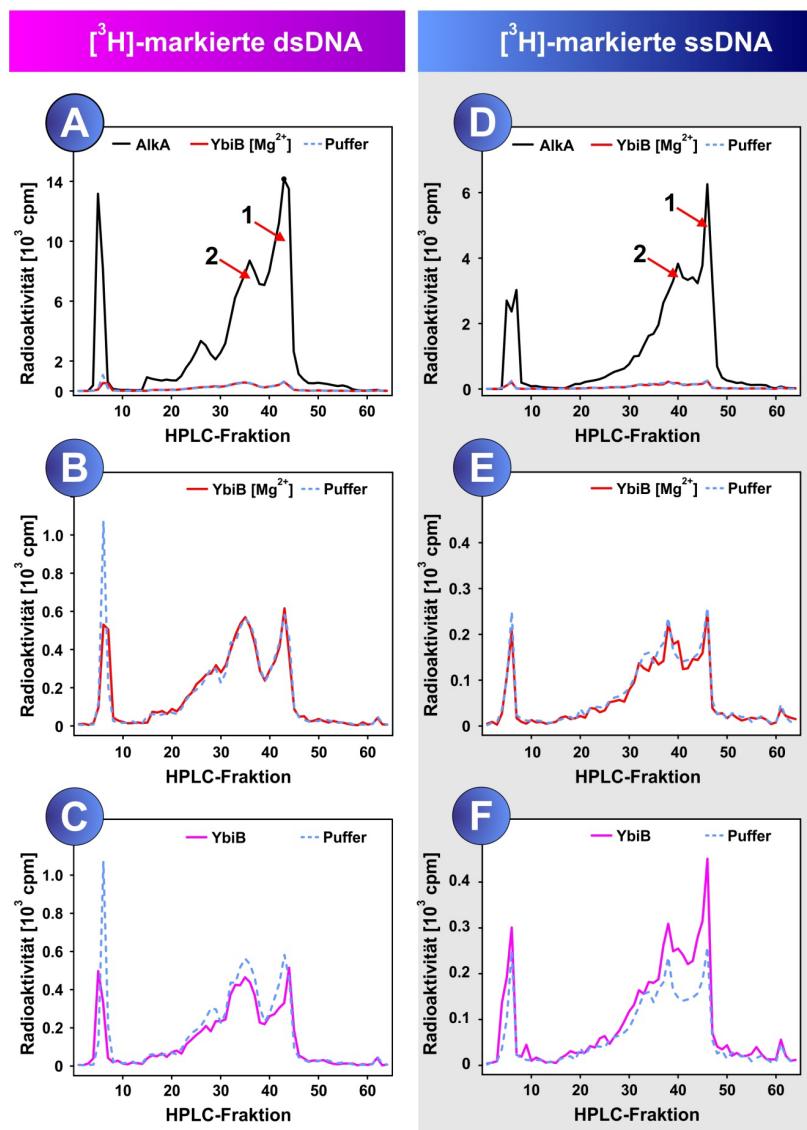


Abbildung 4.18: Elutionsprofile aller DNA-Glykosylase-Reaktionsansätze. Elutionsprofile der einzelnen DNA-Glykosylaseansätze, in denen entweder mittels N-[³H]-Methyl-N-Nitrosourea methylierte doppelsträngige (A-C) oder einzelsträngige (D-F) Heringssperma-DNA als Substrat vorgelegt wurde. Die radioaktiv methylierten Nukleinsäuren (500 000 - 750 000 cpm) wurden zusammen mit 30 µM YbiB-Wildtyp in An- oder Abwesenheit von 5 mM MgCl₂ für 5h bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym und als Positivkontrolle wurden 10 µM AlkA verwendet. Die Proteine und Nukleinsäuren wurden im Anschluss an die Inkubation durch Ultrafiltration entfernt, die Filtrate mittels HPLC-Analytik fraktioniert und die Radioaktivität der Fraktionen im Szintillationszähler bestimmt. Die Radioaktivität wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen und auf diese Weise für alle DNA-Glykosylaseansätze ein Elutionsprofil der möglicherweise entstandenen Reaktionsprodukte erzeugt. In (A) und (D) sind die überlagerten Elutionsprofile der Reaktionsansätze von AlkA, YbiB mit Mg²⁺-Ionen und der Negativkontrolle ohne Enzym sowohl für dsDNA, als auch für ssDNA gezeigt. Unter Verwendung entsprechender Referenzsubstanzen konnte der Peak 1 als 7-Methyl-Guanin und Peak 2 als 3-Methyl-Adenin identifiziert werden. In (B), (C), (E) und (F) sind die überlagerten Elutionsprofile des YbiB-Wildtyps mit oder ohne Mg²⁺-Ionen im Reaktionsansatz und der Negativkontrolle ohne Enzym dargestellt.

Da DNA-Glykosylasen wie die meisten DNA-modifizierenden Enzyme in der Regel Magnesium als Kofaktor verwenden, wurde die radioaktiv methylierte einzel- oder doppelsträngige DNA zusammen mit YbiB-Wildtyp sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Mg²⁺-Ionen inkubiert. Die Auswertung der entsprechenden Elutionsprofile zeigte allerdings für beide Inkubationsbedingungen keinen nennenswerten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Enzym (Abbildung 4.18). Im Gegensatz dazu kann man deutlich erkennen, dass die Positivkontrolle AlkA einige methylierte Nukleobasen aus der Nukleinsäure entfernt hat (Abbildung 4.18, A und D). Die DNA-Glykosylase AlkA aus *E. coli* ist mitunter für die Entfernung von methylierten Nukleobasen wie beispielsweise dem 7-Methyl-Guanin oder dem 3-Methyl-Adenin verantwortlich (Bjelland et al. 1993). Basierend auf den vorliegenden Elutionsprofilen kann eine DNA-Glykosylaseaktivität unter den hier gezeigten Bedingungen gegenüber methylierten Nukleobasen nahezu ausgeschlossen werden. Die Erkennung und Entfernung anderer mittels Alkylierung geschädigter Nukleobasen müsste durch weitere Experimente noch abgeklärt werden. Jedoch stellen Alkylierungen nicht die einzige Quelle für DNA-Schäden dar. Zudem war es nicht möglich, ohne größeren Aufwand andere radioaktiv markierte Alkylierungsreagenzien zu beschaffen, weshalb entschieden wurde, im weiteren Verlauf andere DNA-Schadensklassen zu untersuchen. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher untersucht, inwiefern oxidierte Nukleobasen als potentielle Substrate für den YbiB-Wildtyp in Frage kommen.

4.2.2 Untersuchung der Aktivität gegenüber oxidierten und mittels Methoxsalen quervernetzten Nukleobasen

Obwohl Sauerstoff für viele Organismen lebensnotwendig ist, stellt er dennoch für die Integrität des Genoms eine Gefahr in Form von radikalen Sauerstoffspezies (ROIs, *Reactive Oxygen Intermediates*) dar. Des Öfteren werden in metabolischen Nebenreaktionen schädliche Sauerstoffspezies freigesetzt, die in der Regel von anderen Enzymen wie der Superoxiddismutase oder der Katalase unschädlich gemacht werden. Nichtsdestotrotz reagieren diese reaktiven Sauerstoffspezies mit verschiedenen biologischen Makromolekülen wie beispielsweise der DNA. Dies führt für gewöhnlich zur Oxidation der Nukleobasen, was wiederum im Zuge der DNA-Replikation zu Basenfehlpaarungen und damit langfristig zum Verlust der Erbinformation führt. Demzufolge stellen oxidative DNA-Schäden neben den zuvor untersuchten Methylierungen eine weitere bedeutende Klasse von DNA-Schäden dar. Es wurde daher zunächst versucht, einzel- und doppelsträngige DNA nach der Methode von Udenfriend (3.2.18) so zu oxidieren, dass möglichst viele unterschiedlich oxidierte Nukleobasen entstehen. Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte mittels HPLC-Analytik und Absorptionspektroskopie untersucht, wobei selbst nach mehreren Versuchen kein Unterschied zwischen der vermeintlich oxidierten und ungeschädigten DNA festgestellt werden konnte. Vermutlich

werden verhältnismäßig wenige oxidierte Basen erzeugt, die aufgrund des Detektionslimits nicht mehr mittels Absorptionsspektroskopie detektiert werden können. Im Fall der methylierten Nukleobasen wurde aus diesem Grund auf radioaktive Markierungsmethoden zurückgegriffen, was jedoch im Kontext von Oxidationsreaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies nicht möglich ist. Da es zudem nicht möglich war, auf sensitivere Detektionssysteme wie elektrochemische Detektoren oder Massenspektrometrie auszuweichen, wurde für die Untersuchung oxiderter Basen eine andere Vorgehensweise gewählt.

Es wurden einige kommerziell erhältliche oxidierte Nukleobasen auf der Basis rationaler Beweggründe ausgewählt und anschließend sukzessive untersucht, ob YbiB gegenüber einem dieser DNA-Schäden eine DNA-Glykosylaseaktivität aufweist. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen oxidierten Nukleobasen in Form ihrer Desoxyribosetriphosphate mittels Primer-Verlängerungsreaktion (3.2.17) an bestimmten Positionen in einen DNA-Strang eingebaut und dieser gleichzeitig mit ^{32}P radioaktiv markiert. Auf diese Weise wurden einzel- und doppelsträngige radioaktiv markierte DNA-Fragmente erzeugt, die an einer definierten Position die jeweilige oxidierte Nukleobase trugen. Diese DNA-Fragmente wurden zusammen mit dem YbiB-Wildtyp und anderen DNA-Glykosylasen im Rahmen eines *Nicking Assays* (3.4.11) inkubiert. Dazu wurden die Gene der *E. coli*-Glykosylasen AlkA und MUG kloniert und rekombinant exprimiert, sowie die Enzyme gereinigt. *E. coli* FPG wurde käuflich erworben. Der *Nicking Assay* ist eine etablierte Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Glykosylasen. Die Vorgehensweise des *Nicking Assays* ist in Abbildung 4.19 schematisch gezeigt. Im Wesentlichen beobachtet man im Verlauf des *Nicking Assays*, dass nach der Inkubation mit einer passenden DNA-Glykosylase neben dem anfänglich eingesetzten DNA-Fragment zusätzlich ein kürzeres DNA-Fragment entsteht.

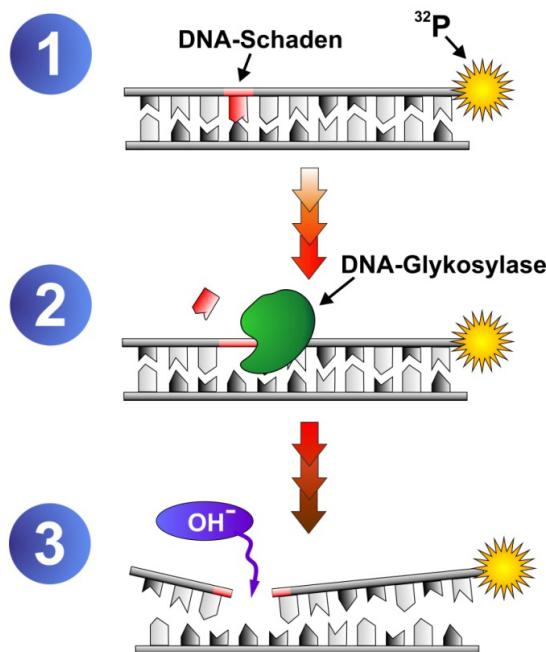


Abbildung 4.19: Prinzip des *Nicking Assays*. Gezeigt sind die einzelnen Schritte des *Nicking Assays* zur Detektion einer DNA-Glykosylaseaktivität. (1) Die potentiellen Substrate (Nukleobasenmodifikationen) befinden sich auf einem kurzen einzel- oder doppelsträngigen DNA-Fragment. Der DNA-Strang mit dem potentiellen Substrat ist zudem mit ^{32}P radioaktiv markiert, was eine spätere Detektion mittels Autoradiographie ermöglicht. (2) Sobald der DNA-Schaden von einer DNA-Glykosylase (grün) erkannt wird, wird die modifizierte Base aus dem DNA-Fragment entfernt und an deren Stelle entsteht eine abasische Position. (3) Die abasische Position wird zuletzt durch Inkubation unter alkalischen Bedingungen gespalten, was zu einem Einzelstrangbruch führt. Die Spaltprodukte können im Weiteren mittels Elektrophorese und Autoradiographie analysiert werden.

Aufgrund der Verwandtschaft zu den Nukleosidphosphorylasen der Klasse II (NP-II), die im Pyrimidin-Stoffwechsel eine bedeutende Rolle spielen, wurden die oxidierten Pyrimidinbasen 5-Formyl-Uracil, 5-Hydroxymethyl-Uracil, 5-Hydroxyl-Cytosin, 5-Hydroxymethyl-Cytosin und 5-Carboxy-Cytosin als potentielle Substrate ausgewählt. Das 5-Carboxy-Cytosin weist zusätzlich eine starke strukturelle Ähnlichkeit zur Anthranilsäure auf, welches von den verwandten TrpD-Enzymen umgesetzt wird. Des Weiteren wurde 8-Oxo-Guanin als mögliches Substrat von YbiB getestet, da dieser mutagene DNA-Schaden relativ häufig auftritt und dementsprechend in der Literatur gut beschrieben ist. Neben oxidierten Nukleobasen wurden mit dieser Methode zusätzlich mittels Methoxsalen modifizierte DNA-Fragmente als weitere potentielle Substrate untersucht. Das Psoralenderivat Methoxsalen ist in der Lage nach Anregung mit UV-Licht eine Kopplungsreaktion mit Thymin einzugehen. Im Verlauf der Kopplungsreaktion können neben einfachen Psoralen-Thymin-Monoaddukten auch Diaddukte ausbildet werden, sofern zwei Thymin-Reste räumlich nahe zusammenliegen. Auf diese Weise ist es möglich, die beiden DNA-Stränge über die Basenabfolge AT oder TA kovalent miteinander zu verknüpfen (Cimino et al. 1985). Die Ergebnisse der *Nicking Assays* aller untersuchten DNA-Schäden sind in Abbildung 4.20 zusammengefasst.

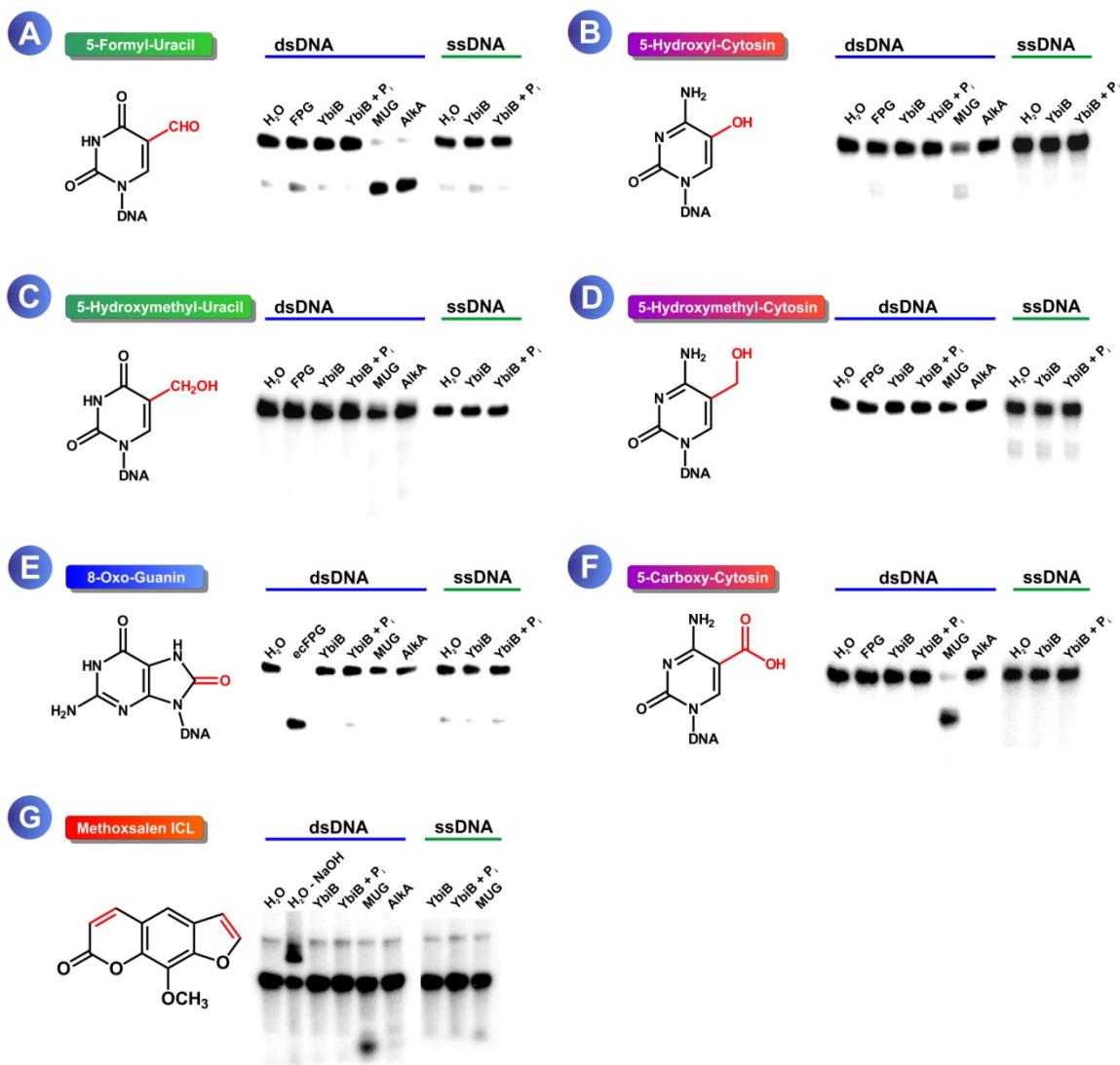


Abbildung 4.20: Zusammenfassung aller mittels *Nicking Assay* untersuchten DNA-Schäden. (A-G) Die Strukturformeln und die mittels Autoradiographie ausgewerteten 20%-igen Polyacrylamid-Harnstoffgele zu jedem untersuchten DNA-Schaden sind abgebildet. In den Strukturformeln sind die oxidierten, funktionellen Gruppen oder im Fall des Psoralenderivats Methoxsalen die reaktiven Doppelbindungen in rot dargestellt. Jeder DNA-Schaden wurde sowohl im Kontext einzelsträngiger (ssDNA), als auch doppelsträngiger (dsDNA) DNA untersucht. Bei der oberen Bande der denaturierenden Harnstoffgele handelt es sich stets um die Substratbande (siehe jeweils 1. Spur H₂O: Negativkontrolle ohne Enzym), wohingegen es sich bei der unteren Bande um das Produkt der DNA-Glykosylasereaktion handelt. Im Fall des Psoralenderivats Methoxsalen (G) kann ohne Alkali-Behandlung (Spur H₂O – NaOH) noch eine weitere höhere Bande beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um die mittels Methoxsalen kovalent verknüpften DNA-Stränge des doppelsträngigen DNA-Fragments. Da diese Art der Quervernetzung im Alkalischen nicht stabil ist, verschwindet diese Bande aufgrund der experimentellen Vorgehensweise des *Nicking Assays* und ist deshalb nicht in den anderen Spuren zu sehen. Als Positivkontrollen wurden jeweils die DNA-Glykosylasen FPG, AlkA und MUG aus *E. coli* verwendet. In allen Reaktionsansätzen wurden 4 nM geschädigte ssDNA oder dsDNA zusammen mit 1 μM Protein (YbiB, AlkA, MUG oder FPG) gemischt und bei 37 °C für 3h inkubiert. Aufgrund der Verwandtschaft zu den NP-II-Enzymen wurden zusätzliche YbiB-Ansätze mit 2 mM Phosphationen (Spuren YbiB + P_i) angesetzt.

Nach der quantitativen Auswertung aller denaturierender Polyacrylamid-Harnstoffgele der *Nicking Assays* konnte für alle DNA-Schäden keine entsprechende Produktbande nach der Inkubation mit dem YbiB-Wildtyp beobachtet werden. In einigen Fällen sind vermeintlich schwache Banden zu erkennen (Abbildung 4.20, (1), (5)), die allerdings in der Regel auch bei der Negativkontrolle ohne Enzym (H_2O) auftreten und nur eine zum Hintergrund minimal höhere Signalintensität aufweisen. Aufgrund der Verwandtschaft zu den NP-II-Enzymen wurde je DNA-Schaden ein zusätzlicher Reaktionsansatz mit 2 mM Phosphationen (P_i) angesetzt, da man im Vorfeld nicht mit Sicherheit sagen konnte, ob ein aktiviertes Wassermolekül oder ein Phosphation als Nukleophil verwendet wird, um die beschädigte Nukleobase aus dem DNA-Strang zu entfernen. Es konnte allerdings auch unter dieser Inkubationsbedingung für alle ausgewählten DNA-Schäden keine entsprechende DNA-Glykosylaseaktivität von YbiB beobachtet werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann eine DNA-Glykosylaseaktivität von YbiB bezüglich 5-Formyl-Uracil, 5-Hydroxymethyl-Uracil, 5-Hydroxyl-Cytosin, 5-Hydroxymethyl-Cytosin, 5-Carboxy-Cytosin, 8-Oxo-Guanin und mittels Methoxsalen geschädigten Nukleobasen nahezu ausgeschlossen werden. Da DNA-Glykosylaseaktivitäten zumindest bei den Positivkontrollen beobachtet werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die *Nicking Assays* auf experimenteller Ebene korrekt durchgeführt wurden. Die *Mismatch Uracil Glycosylase* (MUG) zeigt beispielsweise eine ausgeprägte Aktivität gegenüber 5-Formyl-Uracil (Liu et al. 2003) und 5-Carboxy-Cytosin (Hashimoto et al. 2012) und eine schwache gegenüber 5-Hydroxyl-Cytosin (O'Neill et al. 2003). Interessanterweise erscheint auch im Kontext der mittels Methoxsalen geschädigten DNA eine Produktbande in der Spur der MUG, wobei MUG eigentlich nur in der Lage sein sollte, das Monoaddukt aus dem DNA-Strang zu entfernen. Das eigentlich hauptsächlich für die Reparatur methylierter Nukleobasen zuständige AlkA-Enzym kann zudem 5-Formyl-Uracil und 5-Hydroxymethyl-Uracil (Bjelland et al. 1994) aus der DNA entfernen. Die Aktivität gegenüber 5-Hydroxymethyl-Uracil konnte allerdings im Rahmen des hier durchgeföhrten *Nicking Assays* nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die 5-Hydroxymethyl-Uracil Konzentration (4 nM) im Reaktionsansatz im Vergleich zum K_m -Wert von AlkA (4 μM) zu gering war und daher die Inkubationszeit nicht ausreichte, um eine entsprechend detektierbare Menge Substrat umzusetzen. Das Substratspektrum von FPG umfasst das stark mutagene 8-Oxo-Guanin (Tchou et al. 1994), 5-Formyl-Uracil (Zhang et al. 2000) und 5-Hydroxyl-Cytosin (D'Ham et al. 1999). Die Aktivität gegenüber 5-Hydroxyl-Cytosin konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, was vermutlich wie im Fall des Hydroxylmethyl-Uracils bei AlkA an dessen schlechten K_D -Wert (4.7 μM) und der damit zu kurzen Inkubationszeit liegen dürfte. Es konnte in der Literatur keine *E. coli*-Glykosylase gefunden werden, die 5-Hydroxymethyl-Cytosin als Substrat akzeptiert. Folglich konnte für diese spezielle DNA-Modifikation keine Positivkontrolle durchgeföhrt werden.

Obwohl die einzelnen DNA-Glykosylasen gewisse Substrate bevorzugen, wie beispielsweise FPG 8-Oxo-Guanin, AlkA 3-Methyl-Adenin oder MUG Uracil, kann oft ein und derselbe DNA-Schaden durch mehrere Enzyme repariert werden. Im Kontext der *Nicking Assays* wird dies insbesondere

anhand des Substrates 5-Formyl-Uracil (Abbildung 4.20, A) deutlich. Dieses wird mehr oder weniger von allen drei DNA-Glykosylasen (FPG, AlkA und MUG) umgesetzt. Diese Redundanz der verschiedenen Reparatursysteme gewährleistet die Integrität des Genoms, selbst wenn einige Reparatursysteme ausfallen. Die Überlappung der Substratspezifität einiger DNA-Glykosylasen ist zwar für einen lebenden Organismus von äußerster Wichtigkeit, erschwert jedoch aus wissenschaftlicher Sicht die Untersuchung entsprechender DNA-Reparatursysteme. Demzufolge gestaltet sich die Identifizierung neuartiger DNA-Reparaturenzyme ohne weitere Vorkenntnisse als schwierig. Des Öfteren sind hierfür lange und aufwendige Testreihen notwendig, in denen verschiedene DNA-Schäden als potentielle Substrate getestet werden. Die in dieser Arbeit ausgewählten und untersuchten DNA-Schäden stellen daher nur eine kleine Gruppe der potentiell möglichen DNA-Modifikationen dar. Somit müssten weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt werden, um die Hypothese endgültig zu verwerfen, dass es sich bei YbiB um eine DNA-Glykosylase handelt.

4.3 IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER NUKLEOTID-PYROPHOSPHATASE-AKTIVITÄT

Die meisten DNA-Reparaturenzyme wie die DNA-Glykosylasen des BER (*Base Excision Repair*) werden erst aktiv, sobald sich ein entsprechender DNA-Schaden in der DNA-Helix etabliert hat. Erstaunlicherweise sind jedoch wie eingangs ausführlicher beschrieben (1.3) viele der mittels BER oder NER (*Nucleotid Excision Repair*) entfernten Basen bereits vor ihrer Aufnahme in den DNA-Strang beschädigt. Aus diesem Grund existieren Enzyme wie MutT, die fehlerhafte Nukleotide aus dem Nukleotid-Reservoir entfernen und so verhindern, dass diese im Zuge der DNA-Replikation ins Genom integriert werden. Da die verwandten TrpD- und NP-II-Enzyme kleine organische Moleküle umsetzen, die eine gewisse Ähnlichkeit zu Nukleosiden beziehungsweise Nukleotiden aufweisen, sollte in den nachfolgenden Experimenten geklärt werden, inwiefern modifizierte Nukleoside und Nukleotide als Substrate für YbiB in Frage kommen.

4.3.1 Aktivität gegenüber oxidierten Nukleotiden und Nukleosiden

Die Verwandtschaft zu den NP-II-Enzymen führte zur Annahme, dass YbiB in der Lage sein könnte beschädigte Nukleobasen von Nukleosiden oder Nukleotiden abzuspalten. So könnte durch den Angriff eines aktivierte Wassermoleküls oder eines Phosphations an der C1-Position des Zuckerrests die N-glykosidische Bindung gespalten werden, wodurch zum einen eine modifizierte Nukleobase und zum andern ein freier Zuckerrest entsteht. Da sich die

spektroskopischen Eigenschaften der Edukte und Produkte kaum voneinander unterscheiden, wurde der Umsatz entsprechender Nukleoside und Nukleotide mittels HPLC-Analytik (3.4.10) verfolgt. Das unterschiedliche Laufverhalten der Edukte und Produkte führt im HPLC-Elutionsprofil zur Verschiebung des Edukt-Peaks hin zum Produkt-Peak (Abbildung 4.21).

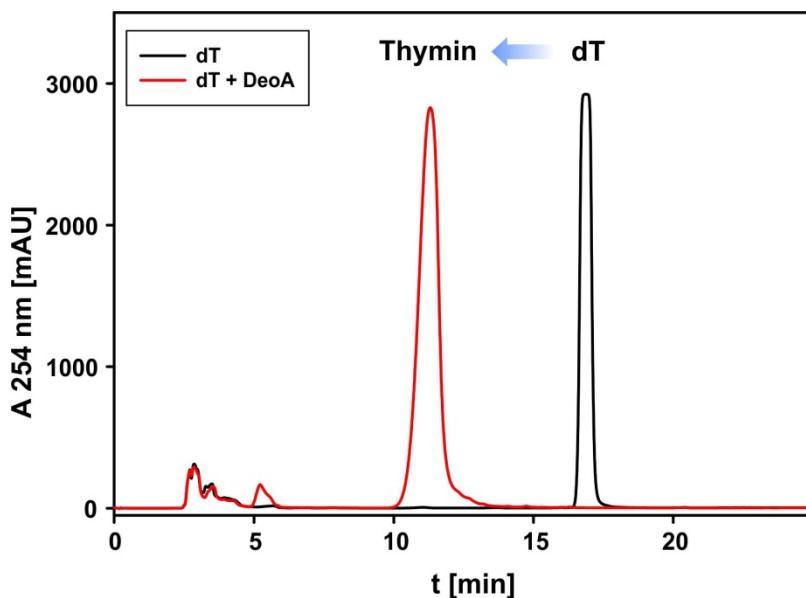


Abbildung 4.21: HPLC-Analytik der phosphorolytischen Spaltung von Thymidin durch DeoA. Als Positivkontrolle für die HPLC-Analytik wurde der Umsatz von Thymidin durch die Nukleosidphosphorylase DeoA untersucht. Das Enzym DeoA setzt phosphorolytisch Thymidin (dT) zu Thymin und 1-Phosphat-Desoxyribose um.

Obwohl mittels HPLC-Analytik auch ein möglicher Umsatz von ungeschädigten Nukleosiden/Nukleotiden durch das YbiB-Protein untersucht wurde, konnte man aufgrund seiner Zugehörigkeit zur SOS-Antwort bereits davon ausgehen, dass YbiB vermutlich nur geschädigte Nukleoside/Nukleotide als Substrate akzeptiert. Als erstes wurden oxidierte Nukleoside/Nukleotide hergestellt und gereinigt (3.2.18). Der Erfolg der Oxidationsreaktion wurde durch das Auftreten zusätzlicher Peaks in den HPLC-Elutionsprofilen bestätigt. Die intakten oder oxidierten Nukleoside/Nukleotide wurden zusammen mit dem YbiB-Wildtyp inkubiert und im Anschluss mögliche Reaktionsprodukte mittels HPLC-Analytik analysiert. In Abbildung 4.22 sind exemplarisch einige der HPLC-Elutionsprofile gezeigt. Die Ergebnisse aller HPLC-Läufe sind in Abbildung 4.23 als Grafik zusammengefasst.

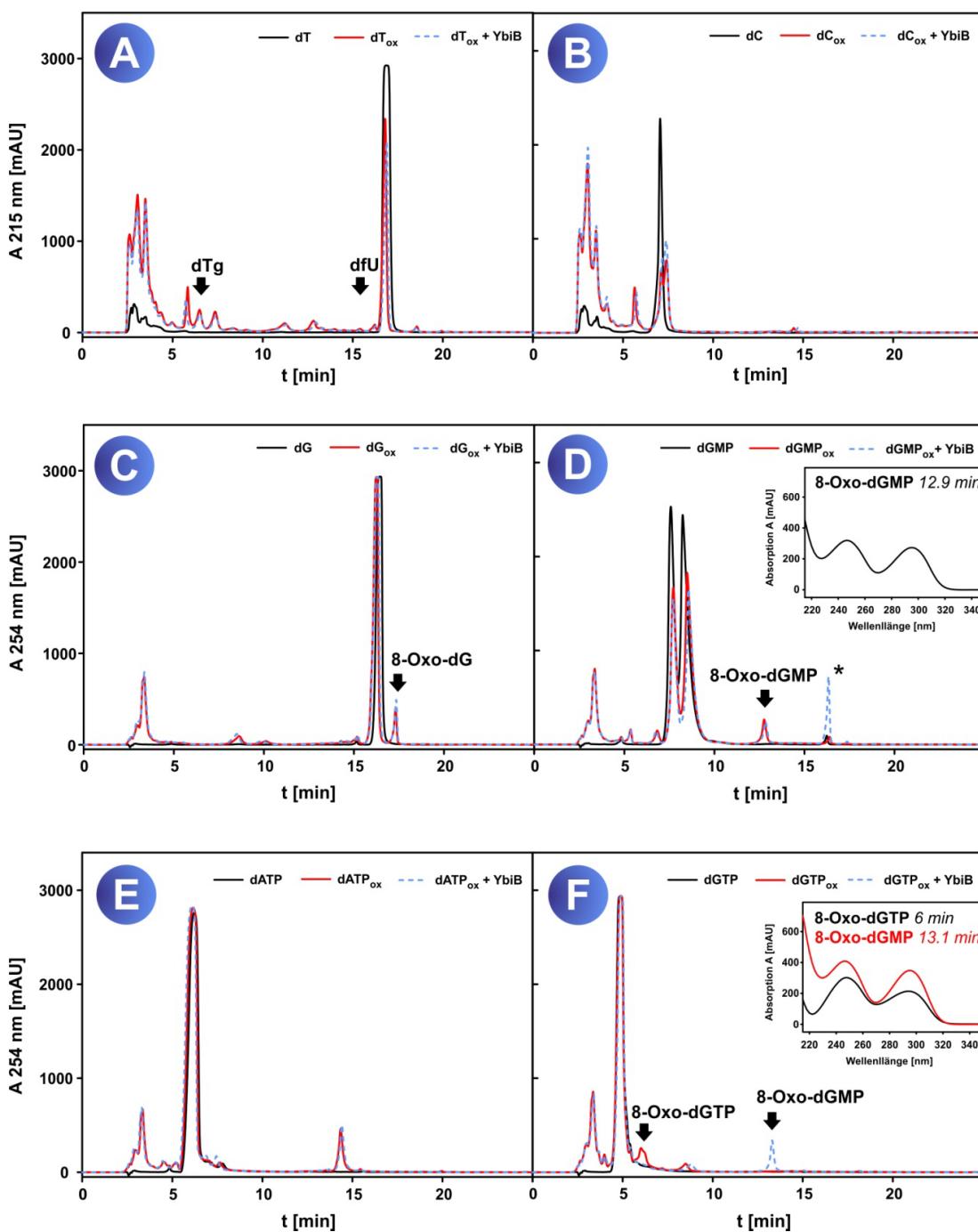


Abbildung 4.22: Ausgewählte HPLC-Elutionsprofile der mit YbiB-Wildtyp inkubierten Nukleoside und Nukleotide. (A-F) Dargestellt sind jeweils die überlagerten HPLC-Elutionsprofile der Nukleoside/Nukleotide vor (schwarze Linie) und nach der Oxidationsreaktion (rote Linie), sowie der oxidierten Nukleoside/Nukleotide nach Inkubation mit YbiB (blaue gestrichelte Linie). Die Elution der einzelnen Bestandteile wurde mittels Absorptionsspektroskopie bei 254 oder 215 nm verfolgt. Der Hauptpeak im Elutionsprofil des ungeschädigten Nukleosids/Nukleotids (schwarze Kurve) entspricht jeweils dem eingesetzten Nukleosid/Nukleotid. Das ungeschädigte dGMP (D) eluiert als einziges in Form eines Doppelpeaks. Einige weitere Peaks konnten aufgrund ihres markanten UV-Absorptionsspektrums gewissen oxidierten Reaktionsprodukten zugeordnet werden (A, dTg = Thymidinglycol, dfU = 5-Formyl-Uridin; C, 8-Oxo-dG = 8-Oxo-Guanosin; D & F, 8-Oxo-dGMP = 8-Oxo-Guanosinmonophosphat; F 8-Oxo-dGTP = 8-Oxo-Guanosintriphosphat). Das charakteristische Absorptionsspektrum von 8-Oxo-Guanin-Derivaten ist in (D) und (F) exemplarisch gezeigt, die zugehörigen Elutionszeiten sind angegeben. Bei dem in (D) mit (*)

markierten Peak handelt es sich um eine Guanosin-Verunreinigung, die vermutlich im Zuge der Probenvorbereitung für die HPLC in den Ansatz gelangt ist. Die Verunreinigung wurde anhand ihres Laufverhaltens und ihres Absorptionsspektrums als Guanosin identifiziert. In jedem Reaktionsansatz wurden 250 – 1000 µM Substrat (Nukleosid/Nukleotid) zusammen mit 5 µM YbiB über Nacht bei 37 °C inkubiert.

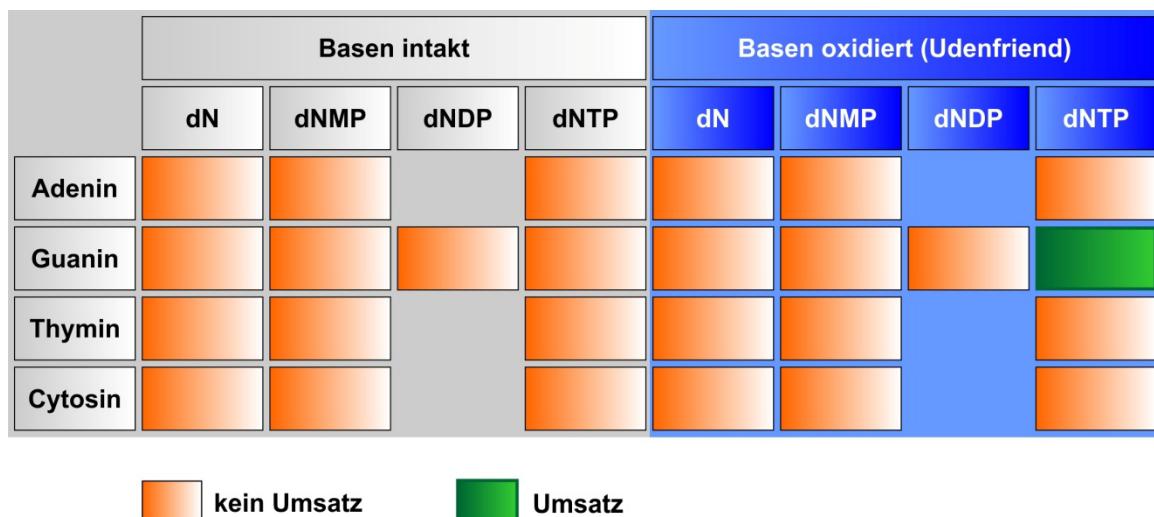


Abbildung 4.23: Graphische Zusammenfassung aller mittels HPLC-Analytik untersuchter Reaktionsansätze der verschiedenen Nukleoside/Nukleotide nach Inkubation mit YbiB-Wildtyp. Die Reaktionsansätze sind reihenweise nach der Art der am Zuckerrest befindlichen Nukleobase (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin) und spaltenweise nach Nukleosid (dN) beziehungsweise Nukleotidart (dNMP, dNDP und dNTP) geordnet. Des Weiteren wird zwischen intakten (grau hinterlegt) und mittels Udenfriend-Oxidation geschädigten (blau hinterlegt) Nukleosiden/Nukleotiden unterschieden. Das Auftreten zusätzlicher Peaks nach der Inkubation des jeweiligen Edukts mit dem YbiB-Wildtyp wird als grüner Kasten angezeigt, ist dies nicht der Fall, wird dies symbolisch durch einen orangen Kasten dargestellt.

Die Auswertung der HPLC-Elutionsprofile zeigte, dass YbiB für fast alle untersuchten Nukleoside/Nukleotide keine Aktivität zeigt. Lediglich sobald oxidiertes dGTP als Substrat eingesetzt wurde, konnte ein zusätzlicher Peak beobachtet werden (Abbildung 4.22, F). Die nähere Analyse des Peaks und insbesondere dessen markantes Absorptionsspektrum lieferte den Hinweis, dass es sich entweder um freies oder an einen Zuckerrest gekoppeltes 8-Oxo-Guanin handeln musste (Jayanth et al. 2009). Interessanterweise zeigte der Peak ein zum 8-Oxo-dGMP nahezu identisches Laufverhalten (Abbildung 4.22, D und F). Dies war der erstmalige Hinweis darauf, dass YbiB in der Lage ist, 8-Oxo-dGTP in 8-Oxo-dGMP umzusetzen. Folglich besitzt das YbiB-Protein keine Nukleosidphosphorylase-Aktivität, sondern eine Phosphatase-Aktivität. Diese Reaktion unterscheidet sich deutlich von den verwandten TrpD- und NP-II-Enzymen, die ihrerseits entweder die Bildung oder Spaltung N-glykosidischer Bindungen katalysieren. Zusätzlich entspricht der beobachtete Umsatz von 8-Oxo-dGTP vor allem der enzymatischen Funktion von MutT oder von MutT-ähnlichen Enzymen. Um daher sicher zu stellen, dass es sich bei dem mehrfach reproduzierten Umsatz von 8-Oxo-dGTP durch YbiB nicht um ein Artefakt in Form einer MutT-Verunreinigung handelt, wurden verschiedene

Kontrollexperimente durchgeführt, und zudem YbiB fortan in M15 Δ mutT-Zellen exprimiert. So wurde beispielsweise oxidativ geschädigtes dGTP zusammen mit dem neu gereinigten YbiB-Wildtyp, DeoA und MutT inkubiert (Abbildung 4.24).

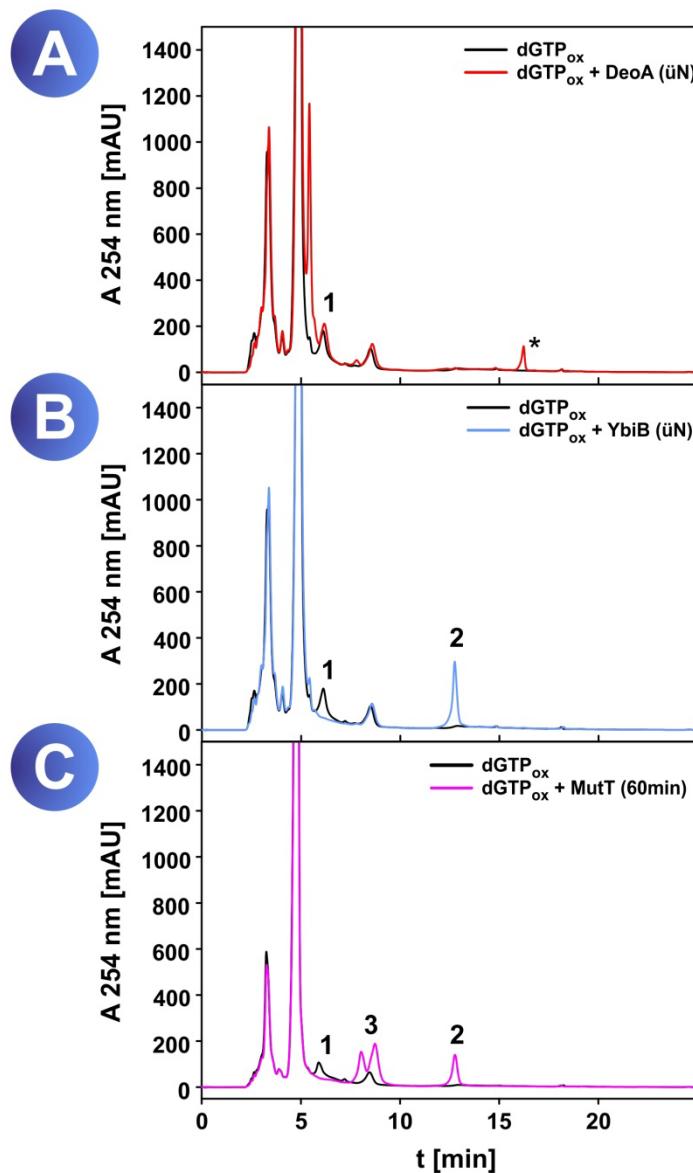


Abbildung 4.24: HPLC-Elutionsprofile von oxidativ geschädigtem dGTP nach Inkubation mit YbiB, DeoA und MutT. Dargestellt sind die HPLC-Elutionsprofile von oxidativ geschädigtem dGTP nach Inkubation mit DeoA (A, rote Linie), YbiB-Wildtyp (B, blaue Linie) und MutT (C, magenta Linie). Als Referenz diente jeweils ein Ansatz ohne Enzym (schwarze Linie). Die Elution wurde mittels Absorptionsmessung bei 254 nm verfolgt. Der Edukt-Peak des 8-Oxo-dGTPs (1) verschwindet nach Inkubation mit YbiB-Wildtyp (B) oder MutT (C) und der Produkt-Peak des 8-Oxo-dGMPs (2) erscheint. Bei dem in MutT (C) zusätzlich erscheinenden Doppel-Peak (3) handelt es sich aufgrund seines Laufverhaltens und Absorptionsspektrums um dGMP, dass durch den Umsatz von dGTP entsteht. Bei dem mit (*) markierten Peak (A) handelt es sich um eine Guanosin-Verunreinigung, die vermutlich im Zuge der Probenvorbereitung für die HPLC in den Ansatz gelangt ist. Die Verunreinigung wurde anhand ihres Laufverhaltens und ihres Absorptionsspektrums als Guanosin identifiziert. In jedem Reaktionsansatz wurden 500 μ M oxidiertes dGTP zusammen mit 5 μ M YbiB-Wildtyp, DeoA oder MutT bei 37 °C für 60 Minuten (MutT) oder üN (YbiB-Wildtyp, DeoA) inkubiert.

Das in einem Δ mutT-Stamm exprimierte und anschließend gereinigte YbiB weist immer noch die zuvor beobachtete Phosphatase-Aktivität auf, was gegen eine MutT-Verunreinigung spricht. Zusätzlich würde sich eine MutT-Verunreinigung in der Proteinpräparation dadurch bemerkbar machen, dass angesichts der relativ hohen Aktivität des MutT-Enzyms gegenüber allen Nukleosidtriphosphaten (Ito et al. 2005) der dGMP Doppel-Peaks erscheinen müsste (Abbildung 4.24, C). Da dies jedoch nicht der Fall ist und zudem das auf vergleichbare Art und Weise gereinigte DeoA diese spezielle Phosphatase-Aktivität nicht zeigt (Abbildung 4.24, A), kann man unter Vorbehalt bis auf Weiteres davon ausgehen, dass YbiB in der Tat diese enzymatische Aktivität besitzt. Interessanterweise akzeptiert YbiB im Gegensatz zu MutT unter den experimentellen Bedingungen nur das 8-Oxo-dGTP und nicht auch das 8-Oxo-dGDP in detektierbarem Umfang als Substrat (Abbildung 4.25). Basierend auf dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei YbiB vermutlich um eine Nukleotidpyrophosphatase handelt. Diese spezielle Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins wurde wie in den folgenden Abschnitten beschrieben weiter charakterisiert.

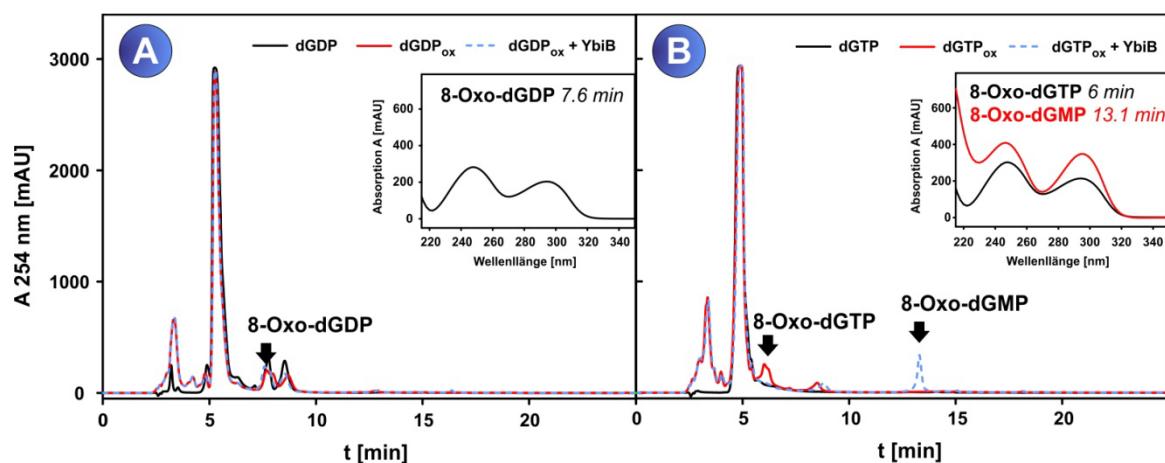


Abbildung 4.25: Inkubation von oxidiertem dGDP und dGTP mit YbiB-Wildtyp. Dargestellt sind die überlagerten HPLC-Elutionsprofile von dGDP (A) und dGTP (B) vor (schwarze Linie) und nach der Oxidationsreaktion (rote Linie), sowie von oxidierten dGDP und dGTP nach Inkubation mit dem YbiB-Wildtyp (blaue gestrichelte Linie). Die Elution der einzelnen Bestandteile wurde mittels Absorptionsmessung bei 254 nm verfolgt. 8-Oxo-dGDP und 8-Oxo-dGTP wurden anhand ihrer Absorptionspektren (Elutionszeiten gezeigt) identifiziert. Je Reaktionsansatz wurden 500 μ M oxidiertes dGDP oder dGTP zusammen mit 5 μ M YibB-Wildtyp bei 37 °C üN inkubiert.

4.3.2 Charakterisierung der Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Wildtyps

Die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins gegenüber dem 8-Oxo-dGTP erscheint aus Sicht der biologischen Funktion sehr ähnlich zur Funktion des MutT-Proteins. Das MutT-Protein gehört zu einer Subfamilie der Nudix-Hydrolasen. Bei den Nudix-Proteinen handelt

es sich um sogenannte Diphosphatasen mit einem relativ weitgefassten Substratspektrum. So werden nicht nur Nukleotide wie im Fall des MutTs, sondern ebenfalls NADH, ADP-Glukose oder Thiaminpyrophosphat durch Nudix-Proteine umgesetzt (McLennan 2006). Des Weiteren benötigen die Nudix-Hydrolasen Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor, um das angreifende Wassermolekül zu aktivieren. Im Fall des MutT-Proteins führt die Promiskuität dazu, dass neben dem 8-Oxo-dGTP ebenso die vier kanonischen Nukleosidtriphosphate als Substrat akzeptiert werden (Abbildung 4.26, A).

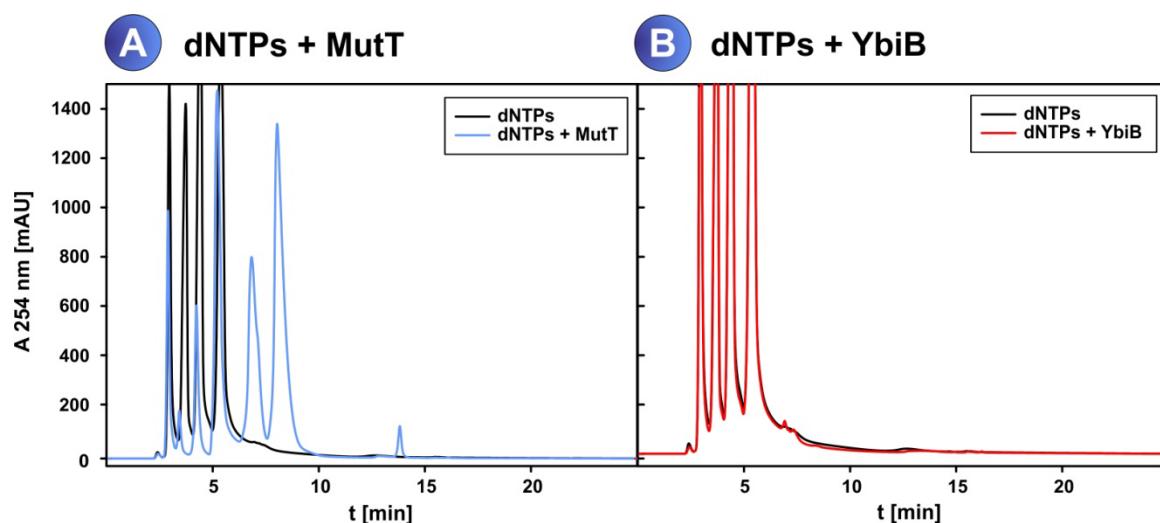


Abbildung 4.26: Promiskuität des *E. coli* MutT-Proteins gegenüber Nukleosidtriphosphaten. Dargestellt sind die überlagerten HPLC-Elutionsprofile der vier kanonischen dNTPs vor (schwarze Linie) und nach der Inkubation mit MutT (A, blaue Linie) oder YbiB (B, rote Linie). Die Elution der einzelnen Bestandteile wurde mittels Absorptionsmessung bei 254 nm verfolgt. Die vier kanonischen Nukleosidtriphosphate (1 mM je dNTP) wurden gemeinsam mit MutT (5 μ M) oder YbiB (5 μ M) $\ddot{u}N$ bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM KP pH 7.5 inkubiert.

In Anlehnung an die ausgeprägte Promiskuität der Nudix-Proteine, wird ebenso für das YbiB vorerst angenommen, dass dieses neben dem 8-Oxo-dGTP noch weitere Substrate umsetzen kann. Da YbiB im Gegensatz zu MutT keine generelle Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität aufweist (Abbildung 4.26, B), wurde das Substratspektrum des YbiB-Proteins dadurch weiter abgetastet, indem YbiB zusammen mit rational ausgewählten, modifizierten Nukleosidtriphosphaten inkubiert wurde. Als potentielle Substrate wurden zum einen zu 8-Oxo-dGTP strukturell sehr ähnliche Nukleoside wie das 8-Oxo-dATP oder zum anderen wie bereits bei der Untersuchung einer möglichen DNA-Glykosylaseaktivität modifizierte Pyrimidin-Nukleotide ausgewählt. Die ausgewählten und letztlich auch getesteten Nukleotide sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

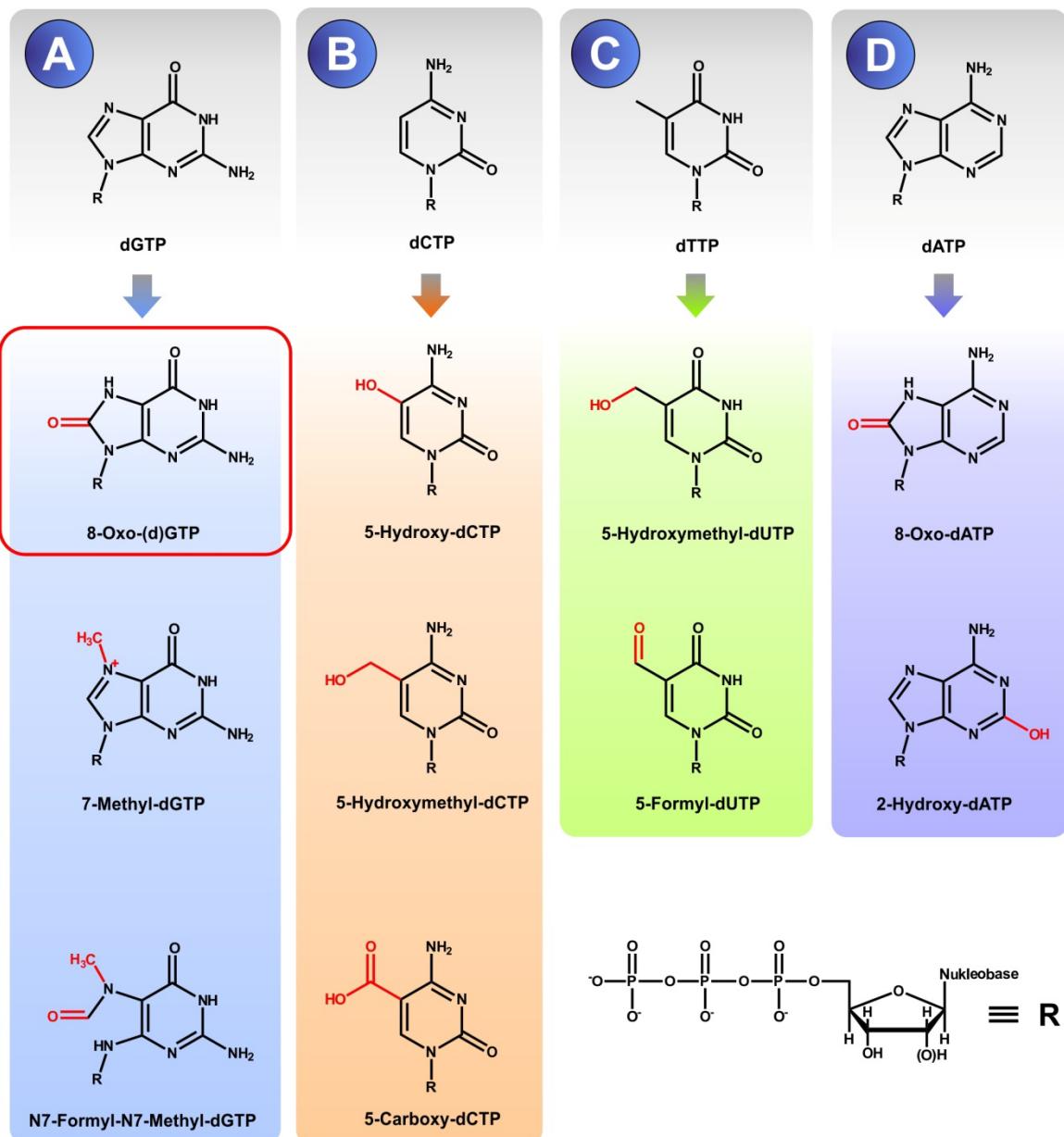


Abbildung 4.27: Getestete potentielle Substrate von YbiB. Die untersuchten modifizierten Nukleotide sind spaltenweise hinsichtlich ihrer Ausgangsstruktur (A = dGTP, B = dCTP, C = dTTP und D = dATP) angeordnet. Modifizierte Bereiche sind in den Strukturen in rot dargestellt. Mit Ausnahme des 8-Oxo-GTPs handelt es sich ausschließlich um 2'-Desoxynukleosidtriphosphate. Lediglich 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP (rot umrandet) wurden von YbiB umgesetzt. In allen Reaktionsansätzen wurden 50 µM der jeweiligen Reinsubstanz zusammen mit 5 µM YbiB-Wildtyp über Nacht bei 37 °C inkubiert und mögliche Produkte anschließend mittels HPLC-Analytik nachgewiesen.

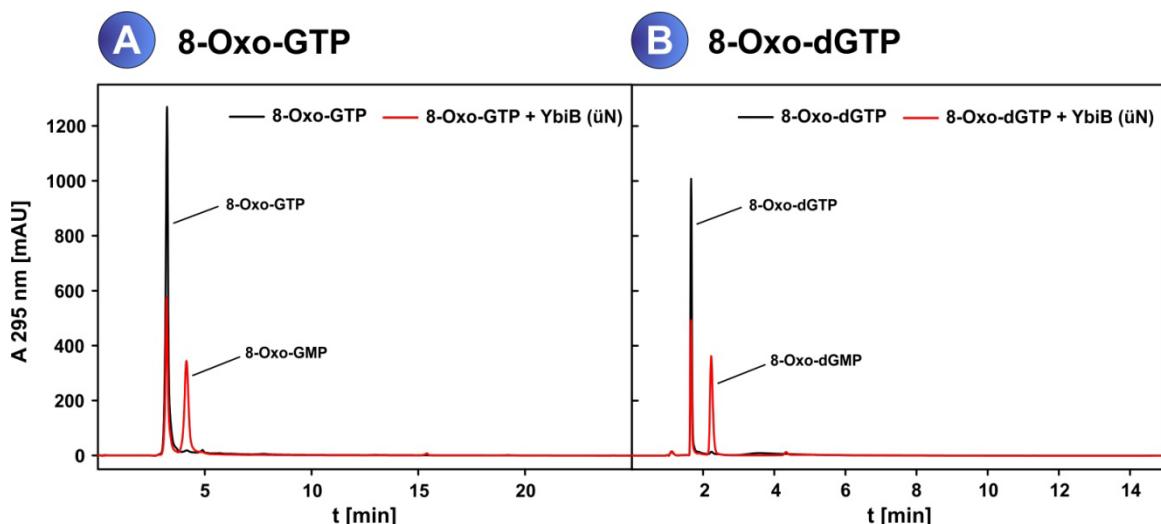


Abbildung 4.28: Umsatz der Reinsubstanzen 8-Oxo-GTP und 8-Oxo-dGTP durch YbiB. Zu sehen sind die HPLC-Elutionsprofile der Reinsubstanzen 8-Oxo-GTP (A) und 8-Oxo-dGTP (B) vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) der Inkubation mit YbiB-Wildtyp. Es ist zu erkennen, dass beide Substrate in ihre entsprechenden Nukleosidmonophosphate umgesetzt werden (Markierung). Die Elution wurde bei 295 nm beobachtet. Im Reaktionsansatz wurden 50 μ M 8-Oxo-GTP oder 8-Oxo-dGTP zusammen mit 5 μ M YbiB-Wildtyp über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Untersuchung führte zum Ergebnis, dass YbiB von den getesteten weiteren Nukleosidtriphosphaten unter den gewählten Bedingungen nur 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP als Substrate akzeptiert (Abbildung 4.28). Da bereits bei einigen anderen Nudix-Hydrolysen beobachtet wurde, dass diese nur sehr begrenzt zwischen Ribosenukleotiden und Desoxyribosenukleotiden unterscheiden können (Ito et al. 2005), war es nicht allzu überraschend, dass YbiB folglich ebenso das 8-Oxo-GTP umsetzen kann. Angesichts der Tatsache, dass weitere basenmodifizierte Nukleotide nicht ohne größeren Aufwand hergestellt oder beschafft werden konnten, wurde versucht zumindest die Aktivität gegenüber dem 8-Oxo-dGTP weiter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden zum einen die Spezifität bezüglich des Kofaktors Mg^{2+} und die pH-Abhängigkeit der enzymatisch katalysierten Spaltung des 8-Oxo-dGTPs am β -Phosphat untersucht. So wurde der Umsatz von 8-Oxo-dGTP unter Anwesenheit von Mg^{2+} und Mn^{2+} (Abbildung 4.29), sowie Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} (Daten nicht gezeigt) getestet. Interessanterweise wurde das Substrat nur unter Anwesenheit von Mg^{2+} umgesetzt. Im Fall des MutT und anderer Nudix-Hydrolasen kann beobachtet werden, dass diese ebenfalls Mn^{2+} verwenden können, um den katalytischen Mechanismus aufrechtzuerhalten (Frick et al. 1994).

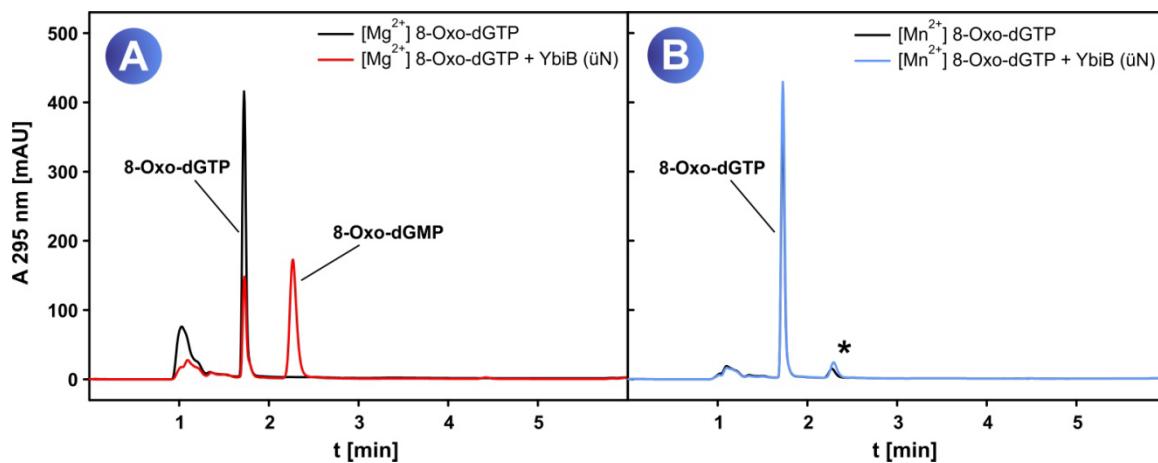


Abbildung 4.29: Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins bei Anwesenheit verschiedener divalenter Kationen. Die HPLC-Elutionsprofile von 8-Oxo-dGTP vor und nach Inkubation mit YbiB-Wildtyp in Anwesenheit von Mg^{2+} (A) oder Mn^{2+} (B). Bei dem in (B) mit (*) markierten Peak handelt es sich in beiden HPLC-Elutionsprofilen um eine Guanosin-Verunreinigung. Die Guanosin-Verunreinigung wurde anhand ihres Absorptionsspektrums identifiziert. Die Elution der Substrate und Produkte wurde durch Absorptionsmessung bei 295 nm verfolgt. In den Reaktionsansätzen wurden 30 μM 8-Oxo-dGTP, 5 μM YbiB-Wildtyp und 2 mM Mg^{2+} oder Mn^{2+} über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion vom pH-Wert des Mediums untersucht, indem der Umsatz des 8-Oxo-dGTPs bei verschiedenen pH-Werten verfolgt wurde (Abbildung 4.30). Ausgehend von diesem pH-Profil kann man sagen, dass die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins ein pH-Optimum zwischen 8.0 und 8.2 aufweist. Da für die Abspaltung des β -Phosphats mit großer Wahrscheinlichkeit ein Wassermolekül aktiviert werden muss, erscheint es durchaus plausibel, dass das pH-Optimum im alkalischen Bereich vorzufinden ist. Vergleichbare pH-Optima wurden ebenfalls bei anderen Nudix-Hydrolasen beobachtet (Iwai et al. 2004).

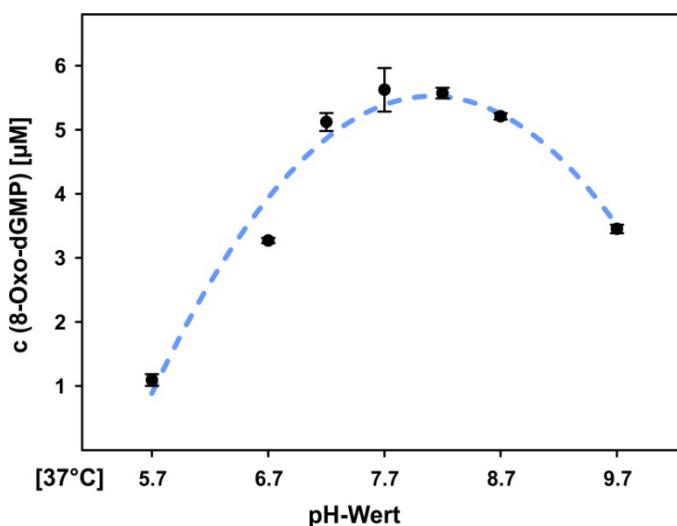


Abbildung 4.30: Die pH-Abhängigkeit der YbiB-Wildtyp Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität. Die Menge des in einem definierten Zeitintervall gebildeten Produkts 8-Oxo-dGMP ist gegen den pH-Wert des Reaktionsansatzes aufgetragen. Dazu wurden 50 μM 8-Oxo-dGTP zusammen mit 20 μM YbiB-Wildtyp bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach 1 h durch die Zugabe von 10 mM EDTA abgestoppt. Die gezeigten Messwerte wurden alle im Duplikat und abgesehen vom pH-Wert unter identischen Reaktionsbedingungen gemessen. Zudem wurde darauf geachtet, dass die eingesetzte Substratkonzentration deutlich ober dem K_M -Wert (vgl. Abbildung 4.31) lag und zum Zeitpunkt der Produktbestimmung nicht mehr als 10% der anfänglichen Substratmenge umgesetzt waren. An die Werte wurde eine Parabelfunktion angepasst (blau gestrichelte Linie) und über deren erste Ableitung das pH-Optimum der Reaktion bestimmt. Die pH-Werte der verwendeten Tris/HCl-Puffer wurden zunächst bei 25 °C eingestellt und die tatsächlichen pH-Bedingungen der enzymatischen Reaktion bei 37 °C über die bekannte Temperaturabhängigkeit der Säurekonstante (K_S) nachträglich bestimmt.

Nachdem sowohl keine weiteren Substrate als 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP identifiziert werden konnten, und nachdem die Auswirkungen unterschiedlicher Reaktionsbedingungen auf die enzymatische Aktivität untersucht waren, wurden erste kinetische Parameter für das Substrat 8-Oxo-dGTP bestimmt. Hierzu wurde wie bei einer Michaelis-Menten-Kinetik üblich, die Geschwindigkeit der Produktbildung in Abhängigkeit zur vorgelegten Substratmenge bestimmt. Die einzelnen Umsatzkurven wurden mittels Stoppkinetik und anschließender HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte erzeugt. Aus den Anfangssteigungen der Umsatzkurven wurde die initiale Produktbildungsgeschwindigkeit (v_i) bestimmt und diese gegen die vorgelegte Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 4.31). Die Auswertung der Sättigungskurve ergab, dass der YbiB-Wildtyp gegenüber 8-Oxo-dGTP einen K_M -Wert von 2.9 μM aufweist und dieses Substrat unter den vorliegenden Bedingungen mit einer Wechselzahl (k_{cat}) von $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ umsetzt.

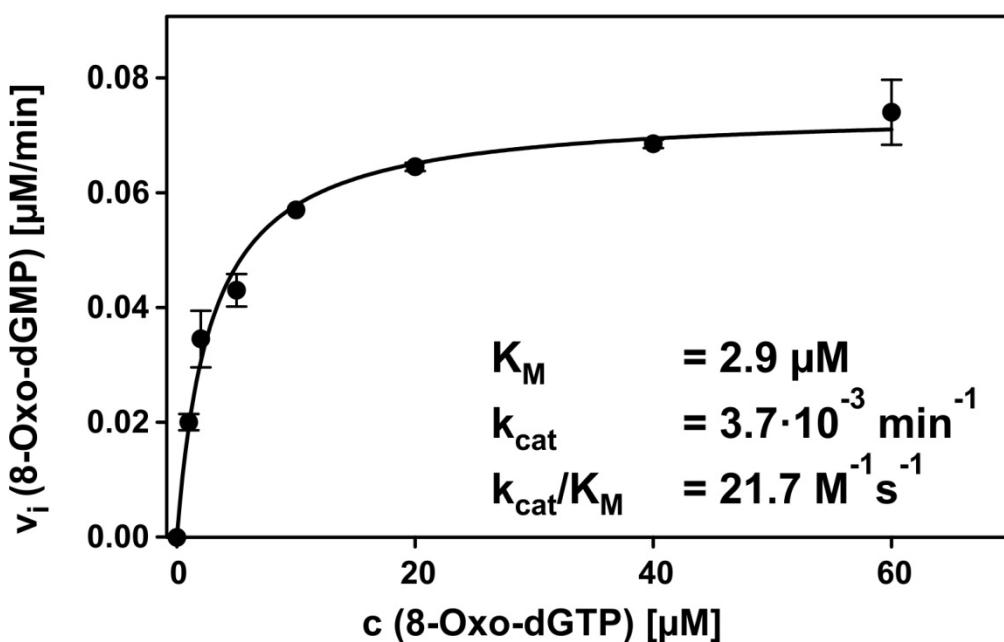


Abbildung 4.31: Michaelis-Menten-Kurve von YbiB-Wildtyp bezüglich des Substrates 8-Oxo-dGTP.

Zwischen 1 - 60 μM 8-Oxo-dGTP und 20 μM YbiB-Wildtyp Protein wurden in 40 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl und 2 mM KP pH7.5 bei 37 °C inkubiert. Zu mehreren Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt und das gebildete 8-Oxo-dGMP in den Ansätzen mittels HPLC quantifiziert. Die daraus im Duplikat ermittelte Produktbildungsgeschwindigkeit (v_i) wurde gegen die vorgelegte 8-Oxo-dGTP Konzentration aufgetragen. An die Messwerte wurde eine hyperbolische Funktion angepasst (schwarze Linie) und auf diese Weise ein K_M -Wert von 2.9 μM und ein k_{cat} -Wert von $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ für das Substrat 8-Oxo-dGTP bestimmt.

Der für 8-Oxo-dGTP beobachtete K_M -Wert ist vergleichbar zu dem des MutT-Proteins aus *E. coli*, welcher sich je nach Literaturquelle zwischen 0.1 - 0.5 μM bewegt (Maki und Sekiguchi 1992, Ito et al. 2005), oder zu einem humanen MutT-Protein was einen K_M -Wert von 12.5 μM besitzt (Mo et al. 1992). Jedoch erscheint der bestimmte k_{cat} -Wert von $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ im Vergleich zum k_{cat} -Wert des *E. coli* MutT-Proteins (300 min^{-1}) (Ito et al. 2005) oder zu denen anderer MutT-Proteine sehr niedrig zu sein. Angesichts des niedrigen k_{cat} -Wertes kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass 8-Oxo-dGTP oder 8-Oxo-GTP die einzigen Substrate sind, die von YbiB umgesetzt werden. Da allerdings selbst strukturell sehr ähnliche Moleküle wie das 8-Oxo-dATP nicht als Substrat akzeptiert werden, kann auf rationale Weise keine weitere Aussage über potentielle Substrate getroffen werden. Demzufolge kann nur durch die Untersuchung weiterer modifizierter Nukleotide geklärt werden, inwiefern noch andere Nukleosidtriphosphate existieren, die Teil des Substratspektrums des YbiB-Proteins sind. Andererseits kann die nähere Betrachtung der katalytischen Effizienz den schlechten k_{cat} -Wert wieder etwas relativieren. Die katalytische Effizienz des YbiB-Proteins ($k_{cat}/K_M = 21.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) erscheint zwar niedrig, aber dennoch sind in der Literatur andere Nudix-Hydrolasen mit ähnlichen Werten zu finden, wie das humane NUDT5 ($k_{cat}/K_M = 433.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber 2-Hydroxyl-dADP) (Kamiya et al. 2009) oder

das MutT2 von *Mycobacterium tuberculosis* ($k_{cat}/K_M = 250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber 8-Oxo-dGTP) (Sang und Varshney 2013). In diesen Fällen ergibt sich somit hinsichtlich der katalytischen Effizienz lediglich ein Unterschied um den Faktor 12 oder 20, was entweder im Fall des NUDT5 auf einen relativ schlechten K_M -Wert oder im Fall des MutT2 auf einen ebenso niedrigen k_{cat} -Wert zurückzuführen ist. In der Tat besitzen viele Nudix-Hydrolasen eine relativ schlechte Affinität für ihre Substrate, wodurch deren katalytische Effizienz in der Regel nur um zwei Größenordnungen besser ist, als die des YbiB-Proteins. Nichtsdestotrotz muss immer noch geklärt werden, ob es neben 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP noch weitere Nukleotide gibt, die von YbiB unter Umständen sogar mit einer besseren katalytischen Effizienz umgesetzt werden.

4.3.3 Untersuchung der Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Wildtyps *in vivo*

Zusätzlich zu *in vitro*-Experimenten, sollte die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins ebenso in einem zellulären Kontext untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, inwieweit die Expression des YbiB-Proteins einen biologischen Vorteil für den Mikroorganismus *Escherichia coli* darstellt. Im Fall der Nudix-Hydrolase MutT wird dies unter anderem durch eine verringerte Mutationsfrequenz deutlich (Tajiri et al. 1995, Fowler et al. 2003). Die Entfernung mutagener Nukleotide aus dem Nukleotid-Reservoir durch MutT sorgt dafür, dass sich im Verlauf der DNA-Replikation deutlich weniger Punktmutationen etablieren können, was sich dementsprechend positiv auf die Mutationsfrequenz auswirkt. In Analogie zu MutT, sollte auf vergleichbare Weise die Expression des YbiB-Proteins in einem entsprechenden *E. coli*-Stamm mit dessen Mutationsfrequenz korreliert werden. Die Bestimmung der Mutationsfrequenz sollte hier ebenso wie bei MutT durch die Quantifizierung des Auftretens spontaner rifampicinresistenter Zellen erfolgen. Das Antibiotikum Rifampicin interagiert mit der β -Untereinheit der RNA-Polymerase und inhibiert dadurch vollständig die Transkription aller mRNAs in der Zelle. Obwohl die Wirkung des Rifampicins sehr potent erscheint, kann bereits eine einzige Punktmutation in der β -Untereinheit der RNA-Polymerase ausreichen, um eine vollständige Resistenz auszubilden (Jin und Gross 1988). Folglich besteht ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen der Mutationsfrequenz und der Anzahl rifampicinresistenter Zellen. Im nachfolgenden *in vivo*-Experiment wurde untersucht, inwieweit die Expression eines plasmidkodierten YbiB-Proteins in der Lage ist, die Mutationsrate eines BW25113 ΔmutT -Deletionsstammes zu verringern. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 4.32 schematisch dargestellt. Im Wesentlichen wird ein *ybiB* in den Arabinose-induzierbaren Expressionsvektor pBAD kloniert, ein BW25113 ΔmutT -Deletionsstamm mit dem pBAD *ybiB* Plasmid transformiert und anschließend durch Zugabe von L-Arabinose die Expression von YbiB gestartet. Da der Expressionvektor pBAD über einen strikt regulierbaren Promoter verfügt, kann auf diesem Weg eine basale Expression des *ybiB*-Gens in Abwesenheit des Induktors L-Arabinose

verhindert werden. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird ein Teil der Kultur auf verschiedenen Selektionsagarplatten ausplattiert und dadurch sowohl die Lebendzellzahl, als auch die Anzahl rifampicinresistenter Zellen bestimmt. Als Referenz wurde mit dem Transformationsansatz eine zweite identische Kultur angesetzt und diese parallel ohne L-Arabinose angezogen. Das Experiment wurde in identischer Weise auch mit dem leeren pBAD-Vektor durchgeführt. Die Mutationsfrequenz ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl beobachteter rifampicinresistenter Zellen zur Lebendzellzahl der jeweiligen Kultur.

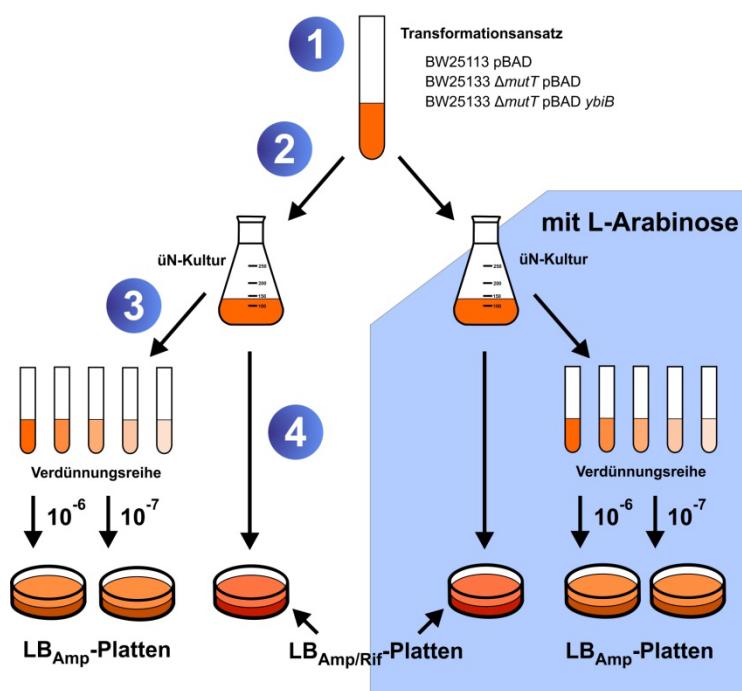


Abbildung 4.32: Schematisches Vorgehen zur Bestimmung der Mutationsfrequenz. (1) Frisch hergestellte elektrokompetente BW25113 oder BW25113 Δ mutT-Zellen werden mit einem pBAD oder pBAD ybiB Plasmid transformiert. (2) Anschließend wird jeder Transformationsansatz zu gleichen Teilen dazu verwendet, um damit zwei neue Kulturen anzuimpfen. Beide Kulturen unterscheiden sich nur dadurch, dass eine Kultur in Abwesenheit und die andere in Anwesenheit (blauer Hintergrund) von 0.02 % (w/v) L-Arabinose üN angezogen wird. Die Anwesenheit von L-Arabinose führt zur Aktivierung des pBAD-Expressionssystems und somit zur Expression des YbiB-Proteins. Im Anschluss an die Inkubation werden die Kulturen in verschiedenen Verdünnungen (10^{-6} und 10^{-7}) auf LB_{Amp}-Platten (3) oder unverdünnt auf LB_{Amp/Rif}-Platten (4) ausplattiert. Die Lebendzellzahl und die Anzahl rifampicinresistenter Zellen wird durch das Auszählen der auf den LB_{Amp}- und LB_{Amp/Rif}-Platten gewachsenen Kolonien bestimmt.

Tabelle 4.7: Bestimmung der Mutationsfrequenz (f) in An- und Abwesenheit von YbiB.

Kultur ^(a)	pBAD + X ^(b)	L-Ara [w/v]	Rif ^R ^(c)	Lebendzellzahl ^(d) [10 ⁸]	f ^(e) [Rif ^R / 10 ⁸]	F ^(f) [Rif ^R / 10 ⁸]
BW25113 Δ6/1	ybiB	0.02%	20	2.48	8.1	6.9 ± 3.4
BW25113 Δ6/4			16	1.22	13.1	
BW25113 Δ6/5			6	1.14	5.3	
BW25113 Δ8/1			12	2.04	5.9	
BW25113 Δ8/2			14	2.46	5.7	
BW25113 Δ8/3			5	1.48	3.4	
BW25113 Δ6/1	ybiB	---	187	2.26	82.7	48.4 ± 22.7
BW25113 Δ6/4			122	1.94	62.9	
BW25113 Δ6/5			143	3.74	38.2	
BW25113 Δ8/1			159	2.88	55.2	
BW25113 Δ8/2			60	2.36	25.5	
BW25113 Δ8/3			69	2.66	25.9	
BW25113 Δ6/4	---	0.02%	75	1.02	74.3	57.0 ± 21.0
BW25113 Δ6/5			12	0.44	27.3	
BW25113 Δ8/1			30	0.52	57.7	
BW25113 Δ8/2			60	0.88	69.0	
BW25113 Δ6/4	---	---	114	2.66	42.9	36.9 ± 10.2
BW25113 Δ6/5			46	1.96	23.5	
BW25113 Δ8/1			122	3.52	34.7	
BW25113 Δ8/2			148	3.18	46.5	
BW25113 wt/1	---	0.2%	0	1.94	0	0 ± 0
BW25113 wt/2			0	2.25	0	
BW25113 wt/3			0	2.46	0	
BW25113 wt/4			0	2.62	0	
BW25113 wt/1	---	---	3	1.94	1.5	0.4 ± 0.8
BW25113 wt/2			0	2.24	0	
BW25113 wt/3			0	2.46	0	
BW25113 wt/4			0	2.62	0	

^(a) Von zwei verschiedenen, unabhängigen BW25113 ΔmutT-Stämmen (Δ6 und Δ8) wurden zunächst 5 üN-Kulturen (x/1-5) angeimpft und nur jene, die am nächsten Tag eine OD₆₀₀ zwischen 0.4 – 0.6 aufwiesen, elektrokompetent gemacht. Ebenso wurde mit dem BW25113-Wildtypstamm (wt) verfahren.

^(b) Die elektrokompetenten Zellen wurden entweder mit einem leeren pBAD (---) oder einem pBAD ybiB Plasmid (ybiB) transformiert.

^(c) Anzahl der rifampicinresistenter (Rif^R) Zellen in 200 µl üN-Kultur

^(d) Mittlere Lebendzellzahl beider Verdünnungen (10⁻⁶ und 10⁻⁷) in 200 µl üN-Kultur

^(e) Mutationsfrequenz f, Anzahl resistenter Zellen je 10⁸ Zellen

^(f) Mittlere Mutationsfrequenz F mit Standardabweichung

Die Daten der *in vivo*-Experimente sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Die Auswertung der *in vivo*-Daten zeigte, dass weniger resistente Zellen auftreten, sobald ybiB in den Kulturen exprimiert wird. Im konkreten Fall konnten in den verschiedenen Kontrollkulturen ohne

Expression von *ybiB* 37 bis 57 resistente Zellen je 10^8 Zellen beobachtet werden, wohingegen sich in *ybiB* exprimierenden Kulturen nur 7 resistente Zellen entwickelt haben (Abbildung 4.33). In Anbetracht des hier vorliegenden experimentellen Prinzips bedeutet dies, dass YbiB augenscheinlich die Etablierung von Punktmutationen im Genom reduziert. Inwiefern dies allein auf die Entfernung von 8-Oxo-dGTP durch YbiB zurückzuführen ist, kann durch dieses Experiment nicht beantwortet werden. Jedoch ergibt sich beim mit pBAD *ybiB* transformierten Stamm durch die Induktion mit Arabinose im Mittel eine Verringerung der Mutationsfrequenz um den Faktor 7.3, was sich deutlich vom Faktor 0.7 der Negativkontrollen (leerer pBAD-Vektor) unterscheidet. Allerdings scheint YbiB nicht in der Lage zu sein, die Deletion des *mutT*-Gens vollständig zu komplementieren. Dies wird deutlich, wenn man die quasi bei 0 liegende Mutationsfrequenz des BW25113-Wildtypstammes betrachtet. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der hohen Substratspezifität des YbiB-Proteins liegen. Das MutT-Protein besitzt ein relativ breites Substratspektrum, wodurch nicht nur die Menge an 8-Oxo-dGTP, sondern auch die Menge anderer mutagener Nukleotide verringert wird, die während des Experiments ebenso entstehen können. Nichtsdestotrotz lassen die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente die Schlussfolgerung zu, dass YbiB an der Unterdrückung bestimmter DNA-Schäden beteiligt ist, die über kurz oder lang zu Punktmutationen führen.

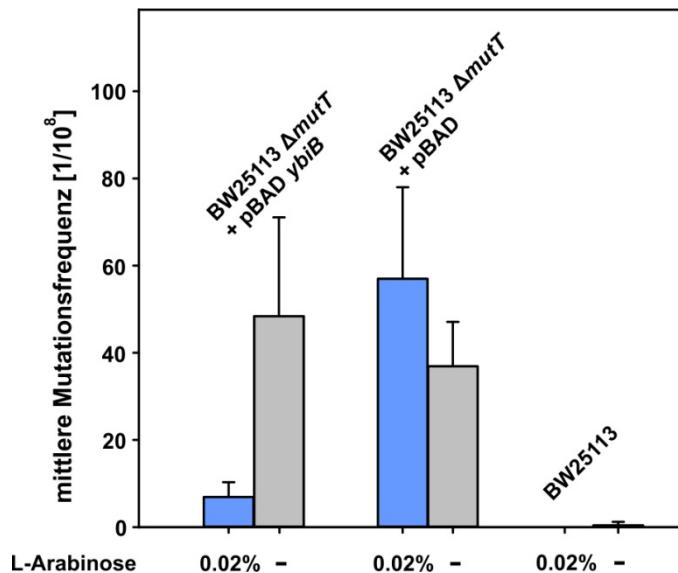


Abbildung 4.33: Mittlere Mutationsfrequenzen der *in vivo*-Experimente. Die mittleren Mutationsfrequenzen aller *E. coli*-Kulturen (vgl. Tabelle 4.7) sind als Balkendiagramm mit Fehlerbalken dargestellt.

4.3.4 Bindung verschiedener Nukleotide an YbiB

Die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins ist, was den Substratumsatz betrifft, auf das 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-GTP beschränkt, wodurch sich ein relativ enges Substratspektrum ergibt. Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob andere Nukleotide zumindest von YbiB gebunden werden und ob sich die Nukleotide auffällig anhand ihrer Affinitäten zu YbiB voneinander unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Bindung der vier kanonischen Nukleotide dATP, dGTP, dTTP und dCTP untersucht. Zunächst wurde die Bindung der Nukleotide an den YbiB-Wildtyp mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) beobachtet. Das YbiB-Protein wurde in der Messzelle vorgelegt und die jeweiligen Nukleotide schrittweise zutitriert (3.4.13). Die im Verlauf der Titration aufgetretenen Wärmeänderungen (ΔH) wurden in einem Thermogramm aufgetragen und mit einem gerätespezifischen Analyseprogramm ausgewertet.

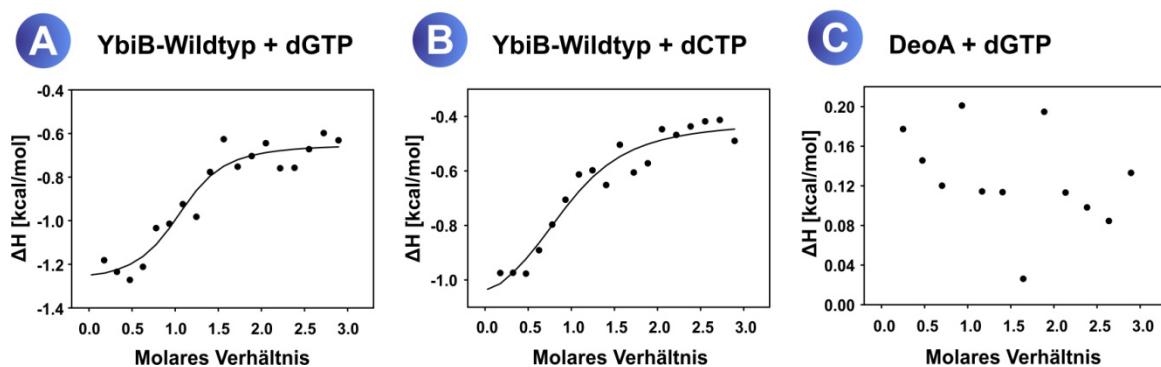


Abbildung 4.34: Thermogramme der Bindung von dGTP und dCTP an den YbiB-Wildtyp. Die Bindung von dGTP (A) und dCTP (B) an den YbiB-Wildtyp wurde mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) verfolgt. Als Negativkontrolle wurde in der Messzelle die Nukleosidphosphorylase DeoA (C) vorgelegt und dGTP zutitriert. In der Messzelle wurden jeweils 100 μ M Protein vorgelegt und schrittweise je 2 μ l einer 1.5 mM dGTP- oder dCTP-Lösung zutitriert. Die bei jedem Titrationsschritt aufgenommene Wärmeänderung (ΔH) wurde gegen das molare Verhältnis von Nukleotid zu Protein aufgetragen. Eine sigmoidale Bindungskurve wurde mit Hilfe eines gerätespezifischen Analyseprogramms an die Messpunkte angepasst und somit der K_D -Wert und die Stöchiometrie der Bindung bestimmt.

Tabelle 4.8: Mittels ITC bestimmten Stöchiometrien (N), K_D -Werte und ΔH s.

Nukleotid	Messung	Stöchiometrie (N) ^a	K_D -Wert [μ M]	ΔH [kcal/mol]
dGTP	1. Messung	1.05	6.7	-0.639
	2. Messung	1.45	6.3	-0.692
	Mittelwert $\pm \sigma^{(b)}$	1.25 \pm 0.28	6.5 \pm 0.3	-0.666 \pm 0.037
dCTP	1. Messung	0.945	20.5	-0.755
	2. Messung	1.36	58.2	-1.13
	Mittelwert $\pm \sigma^{(b)}$	1.15 \pm 0.29	39.4 \pm 26.7	-0.943 \pm 0.265

^a Die Stöchiometrie ist auf ein YbiB-Protomer bezogen

^b Standardabweichung σ

Die Thermogramme (Abbildung 4.34) und die daraus abgeleiteten Werte (Tabelle 4.8) zeigen, dass die Nukleotide dGTP und dCTP von YbiB gebunden werden. Die Nukleotide dATP und dTTP konnten nicht näher quantifiziert werden, da die Wärmeänderungen im Verlauf der Titration zu gering waren (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Bindungskurven um Messartefakte handelt, wurde als Kontrolle das NP-II-Enzyme DeoA in der Messzelle vorgelegt und dGTP zutitriert (Abbildung 4.34, C). Es konnte allerdings selbst nach mehreren Versuchen keine vermeintliche Bindung zwischen DeoA und dGTP gemessen werden. Demnach sind die zuvor gemessenen Bindungskurven mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Interaktion mit YbiB zurückzuführen. Der für dGTP bestimmte K_D -Wert von 6.5 μM erscheint plausibel, da es sich bei dGTP gewissermaßen um ein Substratanalogon von 8-Oxo-dGTP handelt und für dieses ein K_M -Wert von 2.9 μM gemessen wurde. Der für dCTP abgeleitete K_D -Wert von 39.4 μM befindet sich ebenfalls in einem realistischen Bereich. Interessant ist allerdings, dass in beiden Fällen eine 1:1 Bindungsstöchiometrie beobachtet wird. Demzufolge können beide YbiB-Protomere simultan ein Nukleotid binden, was im Fall der Interaktion mit Nukleinsäuren nicht möglich ist (Kaiser 2012). Um dieser Beobachtung weiter nachzugehen, wurde der Einfluss der Nukleotide auf das Nukleinsäurebindeverhalten des YbiB-Proteins genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurde mittels Fluoreszenzpolarisation (vgl. Abbildung 4.7) sowohl die Bindung, als auch die Verdrängung eines 12bp dsDNA-Fragments in Ab- und Anwesenheit eines der vier kanonischen Nukleotide verfolgt (Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Apparente K_D -Werte der Bindung von YbiB-Wildtyp an ein 12bp dsDNA-Fragment in Ab- und Anwesenheit eines der vier kanonischen dNTPs.

Anwesendes dNTP	---	dGTP	dCTP	dATP	dTTP
K_{Dapp} -Wert ^a [nM]	207 ± 8 ^b	1205 ± 38	684 ± 15	629 ± 15	471 ± 10

^a Die K_{Dapp} -Werte wurden mittels Fluoreszenzpolarisation (3.4.9) bestimmt. Es wurden 50 nM der Chromis 500N markierten 12bp dsDNA-Sonde vorgelegt und schrittweise YbiB-Wildtyp in Ab- oder Anwesenheit von 5 μM eines dNTPs zu titriert. Die Daten (vgl. Anhang 7.6) wurden mit DynaFit4 und einem 1:1 Bindungsmodell ausgewertet.

^b Da kein dNTP im Ansatz vorgelegt wurde, handelt es sich hier um den tatsächlichen K_D -Wert der Bindung.

Die Auswertung der einzelnen Experimente legt nahe, dass sich die Anwesenheit von dNTPs signifikant auf das Nukleinsäurebindeverhalten auswirkt. So beobachtet man eine apparetive Verschlechterung des K_D -Wertes der Bindung von YbiB an die 12bp dsDNA-Sonde, sofern eine der vier kanonischen dNTPs im Ansatz vorhanden ist. Da in diesen Fällen die vermeintliche Verschlechterung des K_D -Wertes durch die kompetitive Bindung der dNTPs an das YbiB-Protein hervorgerufen wird, kann in diesen Fällen nur von apparenten K_D -Werten gesprochen werden. Die Anwesenheit des Substratanalogons dGTP führt zum größten Unterschied zwischen dem beobachteten und tatsächlichen K_D -Wert der Bindung von YbiB an die 12bp dsDNA-Sonde,

wodurch sich dieser um den Faktor 6 auf 1.2 μM verschlechtert. Die anderen dNTPs führen nur zu einer Erhöhung des apparenten K_D -Wertes um den Faktor 2 bis 3. Zusätzlich wurde die Verdrängung der 12bp dsDNA-Sonde aus dem YbiB-DNA-Komplex durch Zugabe von dNTPs beobachtet. Die kompetitive Bindung der dNTPs führt letztlich zur Freisetzung der 12bp dsDNA-Sonde aus dem Komplex, was zu einer erhöhten Rotationsdiffusion der Sonde und demzufolge zu einer Verringerung des verfolgten Fluoreszenzpolarisationssignals führt (Abbildung 4.35).

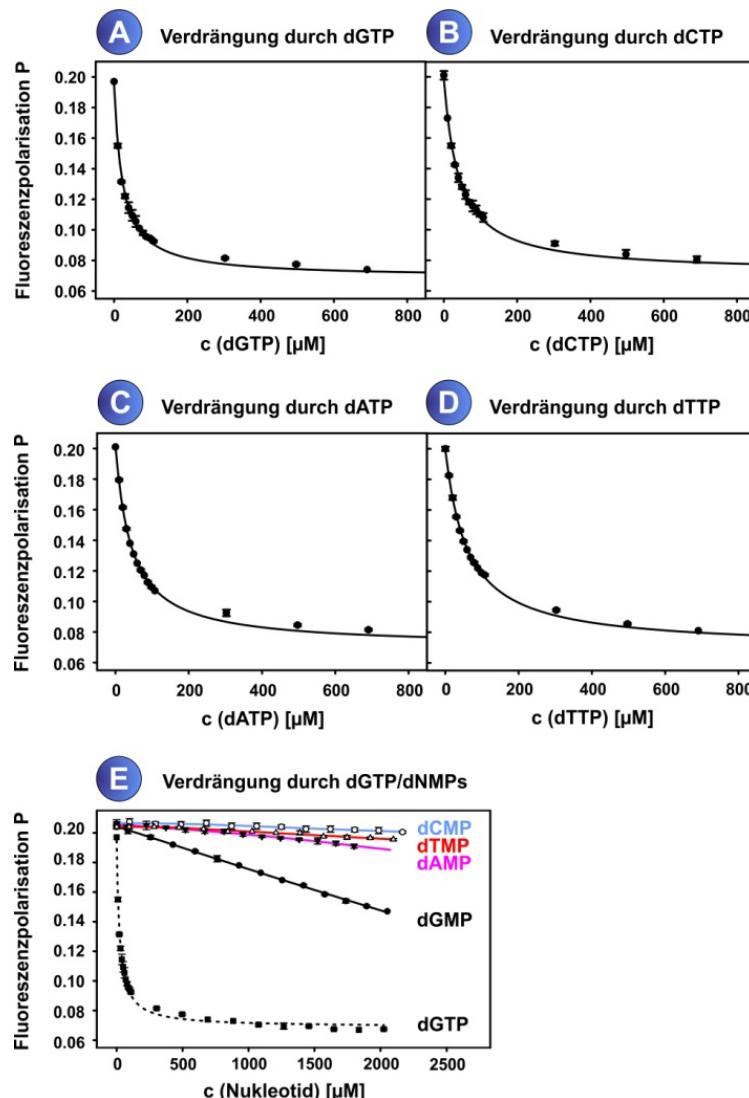


Abbildung 4.35: Kompetitive Bindungsexperimente mit dNTPs und dNMPs. In einer Küvette wurden 50 nM 12bp dsDNA-Sonde (Chromis 500N markiert) und 5 μM YbiB-Wildtyp vorgelegt und anschließend schrittweise dNTPs oder dNMPs zutitriert (A-E). Die kompetitive Verdrängung der 12bp dsDNA-Sonde aus dem YbiB-DNA-Komplex durch die Nukleotide wurde mittels Fluoreszenzpolarisation (3.4.7) verfolgt. Die Messwerte wurden mit Hilfe einer kubischen Gleichung (schwarze Linie) ausgewertet, wodurch es möglich war K_D -Werte sowohl für die Bindung des 12bp dsDNA-Fragmentes, als auch für die verschiedenen dNTPs zu bestimmen (Tabelle 4.10). Die Zugabe von dNMPs führte zu keiner vollständigen Verdrängung des DNA-Fragments, weshalb für diese keine K_D -Werte berechnet werden konnten. Deren Titrationskurven und die des dGTPs sind gemeinsam in Abbildung (E) zusammengefasst.

Tabelle 4.10: Mittels kompetitiver Bindungsexperimente bestimmte K_D -Werte

	K_{D1} (dsDNA-Sonde) [nM]	K_{D2} (dNTP) [μ M]
dGTP	270 ± 42	4.6 ± 1.2
dCTP	297 ± 43	6.7 ± 1.6
dATP	279 ± 29	6.5 ± 1.5
dTTP	258 ± 39	7.9 ± 0.8

Angegeben sind die Mittelwerte samt Standardabweichung der im Duplikat bestimmten K_{D1} - und K_{D2} -Werte, welche die Affinität gegenüber der DNA-Sonde (K_{D1}) oder den dNTPs (K_{D2}) beschreiben.

Die Ergebnisse der kompetitiven Bindungsexperimente zeigen, dass die vier kanonischen dNTPs in der Lage sind die 12bp dsDNA-Sonde aus dem YbiB-DNA-Komplex zu verdrängen. Um die molekularen Vorgänge in diesen Verdrängungsexperimenten zumindest ansatzweise besser beschreiben zu können, wurde versucht die Bindung der dNTPs an den YbiB-DNA-Komplex zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurde eine kubische Funktion (Gleichung 3.17) an die Messwerte angepasst und darüber sowohl der K_D -Wert für die 12bp dsDNA-Sonde (K_{D1}), als auch der K_D -Wert bezüglich des zutrierten dNTPs (K_{D2}) berechnet (Tabelle 4.10). Die bestimmten K_{D1} -Werte der Nukleinsäurebindung sind alle vergleichbar zu den zuvor mittels Fluoreszenztitration (Tabelle 4.3) und Fluoreszenzpolarisation (Tabelle 4.9) bestimmten K_D -Werten von 114 und 207 nM für 12bp dsDNA-Sonden. Demzufolge handelt es sich somit wahrscheinlich um einen rein kompetitiven Bindungsmechanismus, da die Zugabe der dNTPs nicht die Affinität von YbiB gegenüber der 12bp dsDNA-Sonde in größerem Maße verändert. Folglich dürften beide Liganden um ein und dieselbe Bindestelle am YbiB-Protein konkurrieren.

Im Gegensatz dazu kann bei den ermittelten K_{D2} -Werten nicht zweifelsfrei festgestellt werden, inwiefern diese Werte die tatsächliche Affinität von YbiB gegenüber den verwendeten dNTPs beschreiben. Hierbei stellt vor allem die unterschiedliche Bindungsstöchiometrie beider Liganden (DNA-YbiB-Protomer = 1:2 vgl. Tabelle 4.3; dNTP-YbiB-Protomer = 1:1 vgl. Tabelle 4.8) eine Unsicherheit dar, da somit tatsächlich nur die Bindung eines der beiden dNTP-Moleküle an das YbiB-Dimer verfolgt werden kann. Zudem ist nicht klar, wie sich die negative Kooperativität der Nukleinsäurebindung auch auf die Bindung der dNTPs auswirkt.

Nichtsdestotrotz kann in allen hier beschriebenen Experimenten beobachtet werden, dass YbiB eine leichte Präferenz gegenüber dGTP aufweist, was vermutlich auf der strukturellen Ähnlichkeit zum Substrat 8-Oxo-dGTP beruht. Diese Präferenz gegenüber der Nukleobase Guanin wird ein weiteres Mal anhand der Interaktion mit dNMPs deutlich. Bei den analog durchgeföhrten Bindungsexperimenten mit dNMPs konnten zwei weitere interessante Beobachtungen bezüglich der Bindung von Nukleotiden gemacht werden. Die Anwesenheit von teilweise sehr hohen Konzentrationen (2.5 mM) der dNMPs beeinflusst die Bindung der Nukleinsäure an das YbiB-Protein nicht sonderlich (Abbildung 4.35, E). Die Interaktion zwischen dem YbiB-Protein und den dNTPs scheint somit maßgeblich über die Phosphatgruppen zu

erfolgen, was allerdings für Nukleotidpyrophosphatasen nicht ungewöhnlich ist. Allerdings konnte eine gewisse Affinität für das dGMP beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass dGTP und dGMP aufgrund ihrer bereits zuvor erwähnten Ähnlichkeit zum Substrat 8-Oxo-dGTP unter Umständen nicht nur ausschließlich über die Phosphatgruppen gebunden werden, sondern das gegebenenfalls auch Teile der Nukleobase an der Bindung beteiligt sind.

Im Allgemeinen deuten die *in vitro*-Experimente darauf hin, dass sich die Bindung von Nukleinsäuren und dNTPs nicht vollständig ausschließen. Diese Annahme ist insbesondere im Hinblick auf die biologische Funktion interessant, da in der *E. coli*-Zelle das YbiB-Protein sowohl mit Nukleinsäuren, als auch mit dNTPs interagieren könnte. Angesichts intrazellulärer dNTP-Konzentrationen von 68 µM dATP, 85 µM dGTP, 102 µM dTTP und 544 µM dCTP (Das und Loeb 1984) müsste man anhand der *in vitro*-Daten davon ausgehen, dass sich kein YbiB-DNA-Komplex *in vivo* ausbilden kann. Allerdings muss auch bedacht werden, dass in den *in vitro*-Experimenten erst ab einem deutlichen Überschuss der dNTPs (Faktor 1000) keine Interaktion mehr zwischen der 12bp dsDNA-Sonde und dem YbiB-Protein nachgewiesen werden kann. Nimmt man nun im Folgenden an, dass sich das gesamte 4.6 Mb große *E. coli*-Genom aus einer entsprechenden Anzahl an 12bp großen Bindestellen zusammensetzt, würde man eine intrazelluläre 12bp dsDNA-Konzentration von etwa 650 µM erhalten. Unter dieser Annahme wäre es somit auch *in vivo* möglich, dass YbiB sowohl dNTPs, als auch Nukleinsäuren bindet. Die Interaktion mit dNTPs ist vermutlich auf die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität zurückzuführen, wohingegen die Rolle der Nukleinsäurebindung hinsichtlich der biologischen Funktion, basierend auf dem momentanen Erkenntnisstand, nicht erklärt werden kann.

5. ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Nukleinsäurebindung, als auch die biologische Funktion des YbiB-Proteins weiter aufgeklärt. Bei oberflächlicher Betrachtung scheinen die beiden für YbiB nachgewiesenen funktionellen Eigenschaften, die Nukleinsäure-Bindung einerseits und die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität andererseits, im Widerspruch zu stehen. In Abschnitt 4.3.4 wurde jedoch bereits kurz darauf eingegangen, dass es grundsätzlich möglich ist, dass YbiB *in vivo* gleichzeitig sowohl Nukleinsäuren, als auch dNTPs binden kann. Es wäre somit denkbar, dass die Nukleinsäurebindung nicht unmittelbar für die Funktion von YbiB nötig ist, sondern einen regulatorischen Effekt auf die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität ausübt. Aus diesem Grund werden im Folgenden die in dieser Arbeit gezeigten Daten bezüglich Nukleinsäurebindung und Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität im übergeordneten Kontext der SOS-Antwort diskutiert.

Die weiterführenden Untersuchungen bezüglich der Interaktion mit Nukleinsäuren zeigten, dass einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren mit identischer Stöchiometrie und nahezu gleicher Affinität gebunden werden. Die Bindung von Nukleinsäuren wird vermutlich durch ionische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäureseitenketten und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäure vermittelt. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde beobachtet, dass sich die Nukleinsäurebindung mit steigender Ionenstärke des Lösungsmittels verschlechtert. Des Weiteren lieferten die Ergebnisse des *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) die Erkenntnis, dass zwar mehrere YbiB-Dimere kooperativ an eine Nukleinsäure binden, dies aber nur zu transienten YbiB-DNA-Komplexen führt. Dieses transiente und auf ionischen Wechselwirkungen beruhende Bindeverhalten ist allerdings bei vielen DNA-modifizierenden Proteinen wie DNA-Glykosylasen zu beobachten. Diese als DNA-*hopping* bezeichnete eindimensionale Diffusion ist im Vergleich zur Brownschen Molekularbewegung schneller, wodurch DNA-Reparaturenzyme das Genom deutlich effizienter nach Fehlern durchsuchen können (Hedglin und O'Brien 2010). Die Entdeckung eines Fehlers führt in den meisten Fällen zu konformationellen Veränderungen der Protein- und DNA-Struktur, wodurch entweder der DNA-Schaden für andere DNA-Reparaturenzyme markiert wird (Sharma et al. 2013) oder der DNA-Schaden im aktiven Zentrum einer DNA-Glykosylase richtig koordiniert wird (Parikh et al. 2000). Interessanterweise wird bei vielen DNA-Glykosylasen beobachtet, dass diese eine relativ hohe Affinität gegenüber der gebildeten abasischen Position (AP-site) aufweisen (Morgan et al. 2011), weshalb in diesen Fällen die Produktfreisetzung den ratenlimitierenden Schritt der Reaktion darstellt (O'Neill et al. 2003). Diese Art der Produktinhibition dient im Wesentlichen dem Schutz der labilen AP-site, bis diese von anderen DNA-Reparaturenzymen weiter prozessiert wird. Demzufolge führt dieser Schutzmechanismus bei den meisten DNA-Glykosylasen zu einem veränderten Nukleinsäurebindeverhalten, sobald eine AP-site vorhanden

ist. Vergleichbare Beobachtungen konnten auch im Zusammenhang mit dem YbiB-Wildtyp gemacht werden, wobei dies nicht auf eine höhere Affinität gegenüber der AP-site zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisationsmessungen deuten vielmehr darauf hin, dass in Abhängigkeit der Position der AP-site die Bindung eines weiteren YbiB-Dimers erschwert wird ($K_{D2} > 4 \cdot K_{D1}$). So scheint sich ein stabiler YbiB-DNA-Komplex im Bereich der AP-site auszubilden, was je nach Position der AP-site zu einem mehr oder weniger stark ausgeprägten negativ kooperativen Bindeverhalten führt (vgl. Tabelle 4.5). Ein vergleichbarer Mechanismus wurde bei der DNA-Glykosylase MUG beobachtet, allerdings kommt es in diesem Fall in Anwesenheit einer AP-site zu einem positiv kooperativen Bindeverhalten, wodurch zwei MUG-Proteine im Bereich der AP-site binden und diese dadurch vermutlich stabilisieren (Grippon et al. 2011). Die Untersuchung der strukturellen Dynamik des homodimeren YbiB-Proteins mittels FRET zeigte, dass sich im Zuge der Nukleinsäurebindung lediglich zwei Schlaufen im Bereich der Bindetasche nennenswert verlagern. Unglücklicherweise konnte im Rahmen dieser Versuche kein Unterschied in der Konformation des YbiB-Proteins bezüglich der Bindung einer Nukleinsäure ohne und mit AP-site festgestellt werden. Lediglich die relativen Positionen der beiden Schlaufen im Bereich der Bindetasche haben sich leicht verschoben. Es wäre somit zumindest theoretisch denkbar, dass das YbiB-Dimer nicht seine eigene Struktur sonder die der gebundenen Nukleinsäure mit AP-site verändert. Bei einigen Restriktionsendonukleasen der Klasse II wurde bereits beobachtet, dass die Interaktion mit ihrer Zielsequenz zu einer deutlichen strukturellen Veränderung der gebundenen Nukleinsäure führt (Horton et al. 2006).

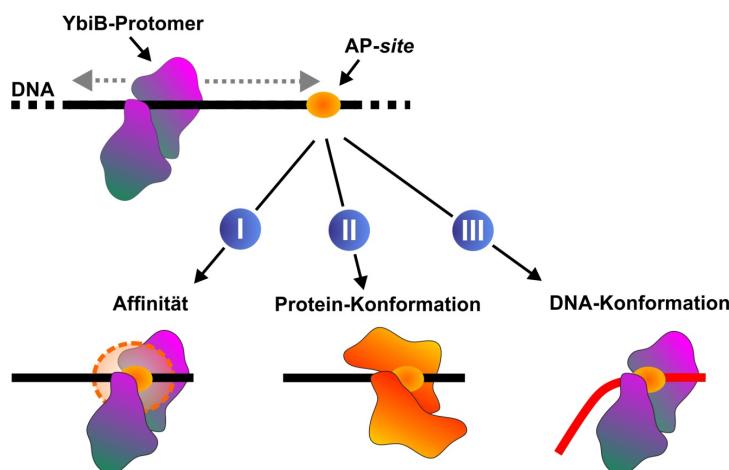


Abbildung 5.1: Verschiedene Modelle der Bindung von YbiB-Wildtyp an eine abasische Position. Die Bindung von DNA-Reparaturproteinen an ungeschädigte DNA-Bereiche ist im Sinne des DNA-hoppings eher transiente Natur, was es diesen Proteinen gestattet sich relativ schnell entlang der DNA-Helix zu bewegen. Sobald das Reparaturprotein auf einen entsprechenden DNA-Schaden wie eine abasische Position (AP-site) trifft, können mehrere unterschiedliche Ereignisse eintreten. (I) Das Protein weist eine hohe intrinsische Affinität gegenüber dem Schaden auf, wodurch sich am Ort des DNA-Schadens ein stabiler Protein-DNA-Komplex bildet. Die Interaktion mit dem DNA-Schaden kann zudem zu strukturellen Änderungen des Proteins (II) oder der DNA (III) führen, wodurch entweder das Protein oder die DNA in eine für die Katalyse relevante Konformation überführt wird. Diese Konformationsänderungen können die Bindungsgeometrie im Bereich des DNA-Schadens entscheidend beeinflussen, was die Bindung weiterer Proteine unter Umständen sterisch beeinträchtigt.

Was für diesen Bindungsmodus (Abbildung 5.1, (III)) sprechen würde, ist die Beobachtung, dass weder die monomere YbiB-Variante L40E I51E, noch die Anwesenheit der AP-site in einzelsträngiger DNA die negative Kooperativität hervorrufen. Allerdings sind weitere experimentelle Daten notwendig um diese Annahme entweder zu bestätigen oder zu verwerfen. Im Wesentlichen muss in den nächsten Schritten ergänzend die konformationelle Dynamik der gebundenen Nukleinsäure untersucht werden, was entweder mittels FRET oder SAS (*Small-Angle Scattering*) erfolgen sollte. Zudem könnte man testen, inwiefern kleine Baseninsertionen (*bulges*) oder Haarnadelschleifen (*hairpin loops*) einen vergleichbaren Effekt hervorrufen. Dies könnte die Frage klären, ob der Effekt allein auf der veränderten DNA-Struktur beruht oder ob noch andere Faktoren dabei eine Rolle spielen. Am elegantesten jedoch könnte die Fragestellung anhand verschiedener YbiB-DNA-Komplexstrukturen beantwortet werden. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, YbiB im Komplex mit gebundener DNA zu kristallisieren. Der Ansatz die Nukleinsäure kovalent über die nichtnatürliche Aminosäure *para*-Benzoyl-L-phenylalanin zu koppeln lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Eine mögliche Ursache hierfür liegt vermutlich in der sequenzunspezifischen Kopplungsreaktion, wodurch der kovalente Verknüpfungspunkt auf der Nukleinsäure nicht klar definiert ist. Es entstehen somit viele verschiedene kovalente YbiB-DNA-Komplexe, die sich alle durch die Position der Nukleinsäure in der Bindetasche voneinander unterscheiden, was die Bildung einer Einheitszelle im Verlauf der Kristallisation erschwert. Folglich ist diese Methode der Kopplung nur dann geeignet, sobald sich ein definierter Protein-DNA-Komplex ausbildet, wie beispielsweise bei der Interaktion eines Transkriptionsfaktor mit seiner Erkennungssequenz (Lee et al. 2009). Demzufolge muss die Art der kovalenten Kopplung geändert werden, um erfolgreich einen kovalenten YbiB-DNA-Komplex zu kristallisieren. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Kopplung mittels Disulfidbrücke dar, wobei eine Thiol-Gruppe von der DNA und die andere vom Protein bereitgestellt werden. Dieses Verfahren wurde bereits dazu verwendet, die Bindung einer DNA-Glykosylase an unbeschädigte DNA zu untersuchen (Banerjee et al. 2005). Im optimalen Fall könnte man auf diese Weise ebenfalls eine YbiB-Struktur im Komplex mit einer AP-site lösen und somit den zuvor beschriebenen Effekt auf die Nukleinsäurebindung erklären.

Das ungewöhnliche Bindeverhalten in Anwesenheit einer AP-site steht zudem im Einklang mit der anfänglichen Arbeitshypothese, dass es sich beim YbiB-Protein um eine DNA-Glykosylase handelt. Die Reaktivität des YbiB-Proteins gegenüber unterschiedlich methylierten oder oxidierten Nukleobasen wurde in dieser Arbeit eingehender untersucht, wobei keine entsprechende DNA-Glykosylaseaktivität beobachtet werden konnte. Insbesondere für methylierte Nukleobasen kann vermutlich eine enzymatische Aktivität nahezu ausgeschlossen werden, da das eingesetzte Methylierungsreagenz N-Methyl-N-Nitrosourea ein relativ breites Methylierungsspektrum aufweist (Beland und Poirier 1994) und somit vermutlich viele verschiedene methylierte Nukleobasen im Reaktionsansatz vorlagen. Neben Methylierungen können in lebenden Zellen aber noch andere Formen der Alkylierung auftreten. So kann beispielsweise die Wirkungsweise einiger Antibiotika wie Mitomycin C (Iyer und Szybalski 1964)

oder Aflatoxin B1 (Bedard und Massey 2006) darauf zurückgeführt werden, dass diese massive DNA-Schäden in Form von alkylierten Nukleobasen hervorrufen. Somit kann man nicht mit absoluter Sicherheit sagen, ob nicht doch eine mittels Alkylierung geschädigte Nukleobase existiert, die von YbiB spezifisch erkannt wird. Gleichermaßen gilt insbesondere für oxidierte Nukleobasen, da in dieser Arbeit nur eine begrenzte Auswahl an möglichen oxidierten DNA-Schäden als Substrat getestet wurde. Die Untersuchung oxiderter Nukleobasen gestaltete sich vergleichsweise schwierig, da zum einen die erzeugte Menge der oxidierten Basen zu gering für spektroskopische Detektionsmethoden war und zum anderen es nicht möglich war auf radioaktive Markierungsmethoden auszuweichen. Aus diesem Grund wurden wie bereits erwähnt nur einige wenige oxidierte Nukleobasen mittels *Nicking Assay* getestet. Um die Daten bezüglich oxiderter Nukleobasen zu vervollständigen, müsste man andere Detektionssysteme wie Massenspektrometrie oder elektrochemische Detektoren verwenden. Des Weiteren muss zusätzlich angemerkt werden, dass sich alle untersuchten DNA-Schäden hinsichtlich ihrer Basenpaarung stets im korrekten Basenpaarungs-Kontext befunden haben. Die mutagene Wirkung von DNA-Schäden wird allerdings erst durch die DNA-Replikation wirksam, weil beispielsweise 8-Oxo-Guanin nicht nur mit Cytosin, sondern auch mit Adenin eine stabile Basenpaarung ausbilden kann (vgl. auch Abbildung 5.2). Folglich kann ein DNA-Schaden erst nach einem DNA-Replikationszyklus zu einer dauerhaften Mutation führen. Interessanterweise wurde bei einigen DNA-Glykosylasen beobachtet, dass diese nur dann die geschädigte Nukleobase aus dem Genom entfernen, sofern sich diese nicht im richtigen Kontext befinden. So entfernt MUG beispielsweise nur 5-Hydroxymethyl-Uracil (HmU) aus einer G•HmU- nicht aber aus einer A•HmU-Basenpaarung (Baker et al. 2002). Zudem existieren für die Reparatur von 8-Oxo-Guanin die zwei DNA-Glykosylasen MutY und MutM, die je nachdem, ob 8-Oxo-Guanin mit Cytosin oder Adenin gepaart ist, aktiv werden (Tajiri et al. 1995). Aufgrund dieser Komplexität, welche von den DNA-Glykosylasen an den Tag gelegt wird, und aufgrund der großen Anzahl möglicher DNA-Schäden, die teilweise nur mit größerem Aufwand hergestellt oder detektiert werden können, kann auf Basis der gegenwärtigen Daten eine DNA-Glykosylaseaktivität des YbiB-Proteins weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck müssten weitere DNA-Schäden in unterschiedlichen Basenpaarungen und mit sensitiveren Detektionssystemen als potentielle Substrate von YbiB untersucht werden. Jedoch erscheint dies angesichts der in dieser Arbeit identifizierten Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins vorerst nicht sinnvoll, weshalb man die DNA-Glykosylase Hypothese zunächst nicht weiter verfolgen sollte.

Neben der DNA-Glykosylase-Hypothese wurde zusätzlich die Annahme aufgestellt, dass es sich bei YbiB in Analogie zu den NP-II-Enzymen um eine Nukleosidphosphorylase handeln könnte. So wurde zunächst angenommen, dass YbiB womöglich geschädigte Nukleotide aus dem Nukleotid-Reservoir entfernt, indem YbiB die N-glykosidische Bindung zwischen der Nukleobase und dem Zuckerrest spaltet. Somit wurden einige oxidierte Nukleoside und Nukleotide hergestellt und diese als potentielle Substrate getestet. Erstaunlicherweise konnte zum einen 8-Oxo-dGTP als

Substrat von YbiB identifiziert werden und zum anderen wurde beobachtet, dass der Umsatz dieses Substrats nicht durch die Spaltung der N-glykosidischen Bindung, sondern durch die Spaltung der Bindung zwischen dem α - und β -Phosphats des Nukleotids stattfindet. Folglich besitzt das YbiB-Protein eine Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität, wodurch sich YbiB auch hinsichtlich der katalysierten Reaktion deutlich von den verwandten TrpD- und NP-II-Enzymen unterscheidet. Obwohl dieses Ergebnis nicht mit den vorherigen Theorien vereinbar ist, erscheint dennoch die Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität gegenüber 8-Oxo-dGTP im Kontext der SOS-Antwort plausibel zu sein. Da Guanin aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials (Steenken und Jovanovic 1997) relativ leicht oxidiert wird, tritt 8-Oxo-Guanin im Genom relativ häufig auf (2-3 8-Oxo-Guanine pro 10^6 Guaninbasen) (Nakabeppe 2014). Das 8-Oxo-Guanin ist ein relativ mutagener DNA-Schaden, da dieser nicht nur mit Cytosin, sondern ebenfalls auch mit Adenin eine Basenpaarung eingeht, was zu $A \cdot T \rightarrow C \cdot G$ oder $G \cdot C \rightarrow T \cdot A$ Transversionen führt (Tajiri et al. 1995)(Abbildung 5.2). Interessanterweise wird die Hälfte des im Genom befindlichen 8-Oxo-Guanins im Zuge der DNA-Replikation durch DNA-Polymerasen eingeführt, die statt dGTP 8-Oxo-dGTP verwenden (Kamiya et al. 2009).

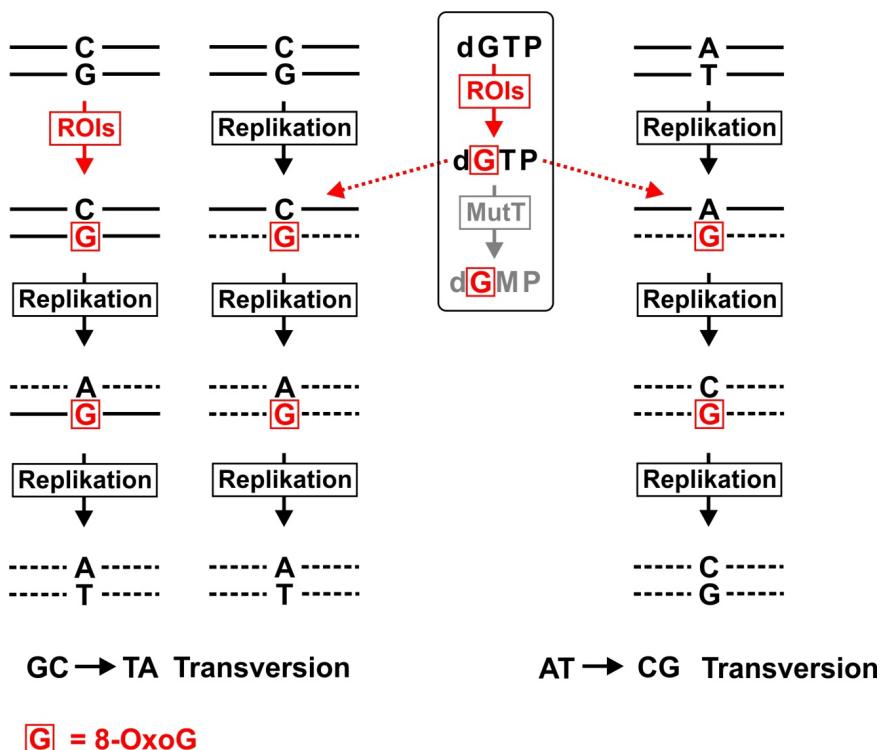


Abbildung 5.2: Mutagene Wirkung der oxidierten Guanin-Variante 8-Oxo-Guanin. Die Purinbase Guanin kann durch reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs) sowohl im Kontext der DNA, als auch in Form von dGTP zu 8-Oxo-Guanin (8-OxoG) oxidiert werden. Das 8-Oxo-Guanin ist in der Lage, nicht nur mit Cytosin, sondern auch mit Adenin eine stabile Basenpaarung einzugehen, was im Verlauf der DNA-Replikation zu $G \cdot C \rightarrow T \cdot A$ oder $A \cdot T \rightarrow C \cdot G$ Transversionen führen kann. Das MutT-Enzym sorgt durch den Umsatz von 8-Oxo-dGTP zu 8-Oxo-dGMP zumindest dafür, dass weitestgehend kein 8-Oxo-Guanin in Form von fehlerhaften Nukleotiden in die DNA-Helix gelangt. Abbildung adaptiert nach Tajiri et al. (1995).

Da die Nukleobasen der Nukleotide im Vergleich zu denen der DNA-Helix deutlich schlechter abgeschirmt werden, ist der Anteil geschädigter Nukleotide im Nukleotid-Reservoir relativ hoch. So liegen beispielsweise etwa 10% des dGTP-Nukleotid-Reservoirs in Ratten-Mitochondrien als 8-Oxo-dGTP vor (Pursell et al. 2008). Neben dem 8-Oxo-dGTP existieren noch etliche weitere geschädigte Nukleotide, die ein mehr oder weniger hohes Mutationspotential besitzen. Folglich müssen diese geschädigten Nukleotide aus dem Nukleotid-Reservoir möglichst effizient entfernt werden. Diese Aufgabe wird von einer speziellen Klasse von Nudix-Hydrolasen, zu denen auch das *E. coli* Protein MutT gehört, übernommen (McLennan 2006). Diese Enzyme sorgen dafür, dass geschädigte Nukleosiddi- und triphosphate aus dem Nukleotid-Reservoir entfernt werden, indem die Bindung zwischen dem α - und β -Phosphat des Nukleotids gespalten wird. Folglich wird verhindert, dass diese in Form von Nukleosidtriphosphaten von DNA-Polymerasen verwendet werden können. Das YbiB-Protein katalysiert somit eine vergleichbare Reaktion, wobei YbiB nach bisherigen Erkenntnissen deutlich spezifischer ist, als die zuvor erwähnten Nudix-Hydrolasen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten lediglich 8-Oxo-GTP und 8-Oxo-dGTP als Substrat für YbiB identifiziert werden. Vergleicht man allerdings die Effizienz des YbiB-Proteins mit dem des MutT-Proteins für das 8-Oxo-dGTP, so muss man leider feststellen, dass YbiB nur eine sehr geringe katalytische Effizienz von $21.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ hat, während das MutT eine katalytische Effizienz von $50 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Ito et al. 2005) besitzt. Angesichts der niedrigen katalytischen Effizienz stellt sich die Frage, inwiefern es sich bei 8-Oxo-dGTP oder 8-Oxo-GTP tatsächlich um die *in vivo*-Substrate von YbiB handelt. Insbesondere, da *E. coli* mit MutT bereits ein äußerst effizientes Enzym besitzt, dass in der Lage ist, 8-Oxo-dGTP aus dem Nukleotid-Reservoir zu entfernen. Eine mögliche Begründung für die Existenz des YbiB-Proteins könnte in seiner strikten Substratspezifität liegen. Das YbiB-Protein akzeptiert nur 8-Oxo-dGTP oder dessen Ribosevariante 8-Oxo-GTP als Substrat, wohingegen MutT oder andere Nudix-Hydrolasen wie YebD oder YnjG selbst ungeschädigte Nukleosidtriphosphate umsetzen (vgl. Abbildung 4.26, McLennan 2006). Aufgrund der relativ breiten Substratspektren dieser Nudix-Hydrolasen, konnte letztendlich im Fall des YbiB-Proteins ausgeschlossen werden, dass die beobachtete 8-Oxo-dGTP Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität auf eine verunreinigte YbiB-Proteinpräparation mit beispielsweise MutT- oder RibA-Proteinen (Kobayashi et al. 1998) zurückzuführen ist. Folglich bietet im Hinblick auf die biologische Funktion diese hohe Substratspezifität den Vorteil, dass das restliche, intakte Nukleotid-Reservoir nicht weiter beeinträchtigt wird. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn durch exogene Umwelteinflüsse vermehrt die genomische DNA und das Nukleotid-Reservoir geschädigt werden. Das gehäufte Auftreten entsprechender Schäden führt in der Regel dazu, dass bestimmte Reparaturenzyme verstärkt exprimiert werden. Würde dies auch für das MutT-Protein zutreffen, so würde man zwar zum einen entsprechend geschädigte Nukleotide schneller aus dem Nukleotid-Reservoir entfernen können, allerdings würde dies aber auch gleichzeitig zu einem verstärkten Umsatz der intakten Nukleosidtriphosphate führen, die eigentlich für die Reparatur entsprechender DNA-Schäden benötigt werden. Bei MutT und ähnlichen Proteinen handelt es sich somit um ein sogenanntes zweischneidiges Schwert, weshalb es für den Organismus nicht zwangsläufig sinnvoll ist, diese in

übermäßigen Mengen herzustellen. In der Tat wird die Menge an MutT-Protein in der Zelle nahezu konstant gehalten, seine Regulation erfolgt unabhängig von der SOS-Antwort (Schmidt et al. 1991). Vielmehr ist das Expressionslevel von MutT sogar ausgesprochen niedrig. So zeigt eine Studie des *E. coli*-Proteoms (Taniguchi et al. 2010), dass sich unter normalen Bedingungen in einer *E. coli*-Zelle im Schnitt etwa 52 YbiB-Proteine aber nur 4 MutT-Proteine befinden. Zudem ist von YbiB bekannt, dass die Aktivierung der SOS-Antwort zu einer bis zu fünffach stärkeren Expression des YbiB-Proteins führt (Van Dyk et al. 2001, Schneider et al. 2015). Somit könnten also unter induzierten Bedingungen etwa 65x mehr YbiB-Moleküle in der Zelle sein als MutT-Moleküle, was die schlechten Umsatzraten von YbiB zumindest teilweise kompensieren könnte.

Der fakultativ anaerobe Mikroorganismus *Escherichia coli* besäße mit YbiB somit ein regulierbares Werkzeug, um größere Mengen 8-Oxo-dGTP unschädlich zu machen, ohne dabei andere DNA-Reparatursysteme zu beeinflussen. Im Hinblick auf einige SOS-Reparatursysteme wie die DNA-Polymerase DinB ist dies auch zwingend erforderlich. Diese spezielle DNA-Polymerase wird im Rahmen der SOS-Antwort aktiviert, um möglichst schnell einzelsträngige DNA Bereiche, die durch NER oder Einzelstrangbrüche entstanden sind, wieder aufzufüllen. Die Priorität liegt hierbei allerdings auf der Schnelligkeit und nicht der Genauigkeit der DNA-Polymerasereaktion, weshalb beispielsweise nicht nur dGTP, sondern auch 8-Oxo-dGTP in den neuen DNA-Strang eingebaut wird (Foti et al. 2012). Demzufolge müssen für einen reibungslosen Ablauf der SOS-Antwort nicht nur die geschädigten Nukleotide entfernt werden, sondern auch das intakte Nukleotid-Reservoir erhalten bleiben. Zudem muss ebenso berücksichtigt werden, dass durch die Aktivierung der SOS-Antwort das Protein SulA vermehrt exprimiert wird, wodurch der Zellzyklus von *E. coli* gestoppt wird, um die replikationsbedingte Etablierung von Mutationen zu unterbinden (Huisman et al. 1984). Es besteht somit aus zeitlicher Sicht kein Zwang und damit eventuell kein evolutionärer Selektionsdruck, dass das YbiB-Protein seine Substrate möglichst schnell umsetzt, was unter Umständen die schlechte katalytische Effizienz erklären könnte. Interessanterweise kann genau diese spezielle Korrelation zwischen dem Zellzyklus und der katalytischen Effizienz für das MutT-Enzym anhand zweier Mycobakterienstämme, die jeweils unterschiedliche Wachstumsraten aufweisen, beobachtet werden. In diesem expliziten Fall zeigt sich, dass das MutT-Protein des langsam wachsenden Mycobakterienstammes eine um den Faktor 14 niedrigere katalytische Effizienz von $250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber 8-Oxo-dGTP aufweist, wohingegen das MutT-Protein des schneller wachsenden Stammes gegenüber dem gleichen Substrat eine katalytische Effizienz von $3483 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ besitzt (Sang und Varshney 2013). Basierend auf dieser Beobachtung ist es somit durchaus plausibel, dass im Rahmen der Evolution bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit gegebenenfalls kein nennenswerter Selektionsdruck vorlag, weshalb in einigen Fällen DNA-Reparaturenzyme einen vergleichsweise schlechten k_{cat} -Wert besitzen.

Es kann allerdings derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass es neben 8-Oxo-GTP und 8-Oxo-dGTP noch andere Substrate gibt, die von YbiB eventuell besser umgesetzt werden. So wurde beispielsweise aus der Klasse der alkylierten Nukleotide bis jetzt nur das 7-Methyl-dGTP

getestet. Demzufolge stellen alklyierte Nukleotide eine weitere große Klasse potentieller Substrate dar, die bislang kaum untersucht wurden. Die Herstellung von alklyierten Nukleotiden gestaltet sich jedoch deutlich schwieriger, da die meisten Alkylierungsreagenzien bevorzugt mit den Phosphatgruppen reagieren und nicht mit den Nukleobasen (Conrad et al. 1986). Zudem können die meisten methylierten Nukleotide nicht lange gelagert werden, was mit ein Grund sein könnte, weshalb diese nicht ohne weiteres kommerziell erhältlich sind. Aus diesem Grund wird im Moment eine neue Strategie zur Erzeugung dieser modifizierten Nukleotide getestet (derzeit laufende Masterarbeit Sabrina Thalhauser). Hierbei werden zuerst Nukleoside alklyiert und anschließend schrittweise an der 5'-Hydroxylgruppe enzymatisch phosphoryliert, wodurch man letztlich alklyierte Nukleosidtriphosphate erhalten sollte. Dies wird hoffentlich ermöglichen, auch diese Klasse an Nukleotidschäden zumindest teilweise nach weiteren Substraten abzusuchen. Allerdings besteht auch hier generell die Gefahr, dass einige Substrate durch das Raster fallen, falls diese nicht in ausreichender Menge für spektroskopische Detektionsmethoden hergestellt werden können. Folglich wäre es auch in diesem Zusammenhang besser, auf andere Detektionssysteme wie Massenspektrometrie oder elektrochemische Detektoren auszuweichen.

Neben *in vitro*-Untersuchungen könnte man auch mittels *in vivo*-Experimenten unterstützend die Anzahl möglicher Substrate weiter einschränken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die Deletion des *mutT*-Gens durch die Expression eines plasmidkodierten *ybiB*-Gens teilweise komplementiert wurde. Man könnte sich deshalb in diesem Zusammenhang überlegen, dieses Experiment in anderen *E. coli* BW25113-Stämmen erneut durchzuführen, in denen statt des *mutT*-Gens andere Nudix-Hydrolasen wie YebD oder YnjG (McLennan 2006) oder Kombinationen davon deletiert sind. Im besten Fall könnte man durch Korrelation des beobachteten Ausmaßes der Komplementation und der jeweiligen Substratspektren der entfernten Nudix-Hydrolasen weitere Informationen über mögliche Substrate von YbiB erhalten.

Angesichts der niedrigen Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins taucht im Kontext der *in vivo*-Experimente die Frage auf, ob die enzymatische Aktivität intrazellulär durch die Interaktion mit einem Aktivator unter Umständen erhöht wird. Als Aktivatoren wären sowohl kleine Moleküle, als auch größere Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren denkbar. Mögliche Aktivatoren könnten gegebenenfalls durch entsprechende *pull down assays* identifiziert werden. Ohne weitere Experimente kann über die Existenz eines solchen Aktivators nur gemutmaßt werden, wobei es basierend auf den bisherigen Beobachtungen nicht abwegig erscheint, dass YbiB unter Umständen durch Nukleinsäuren aktiviert wird. Es wurden bereits erste *in vitro*-Experimente in Anwesenheit von einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmenten durchgeführt, jedoch konnte keine signifikante Verbesserung der Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität gegenüber 8-Oxo-dGTP gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann es sein, dass andere Faktoren wie beispielsweise AP-sites, andere DNA-Schäden, Haarnadelstrukturen (*hairpins*) oder doch andere Proteine für die Aktivierung notwendig sind. Ein relativ bekanntes und in der Literatur gut beschriebenes Beispiel hierfür ist das RecA-Protein.

Erst durch die Bindung an einzelsträngige DNA wird die Proteaseaktivität von RecA aktiviert (Little et al. 1980), wodurch letztlich die SOS-Antwort initiiert wird (1.3).

Im Fall anderer Nudix-Hydrolasen wie beispielsweise RppH aus *E. coli* konnte eine interessante biologische Funktion entdeckt werden, für die sowohl eine Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität, als auch die Fähigkeit zur Nukleinsäurebindung notwendig sind (Deana et al. 2008, Song et al. 2013). Die Funktion der Nudix-Hydrolase RppH beruht dabei auf der Dephosphorylierung der 5'-Enden von mRNAs, wodurch diese schneller durch RNase E abgebaut werden (Abbildung 5.3).

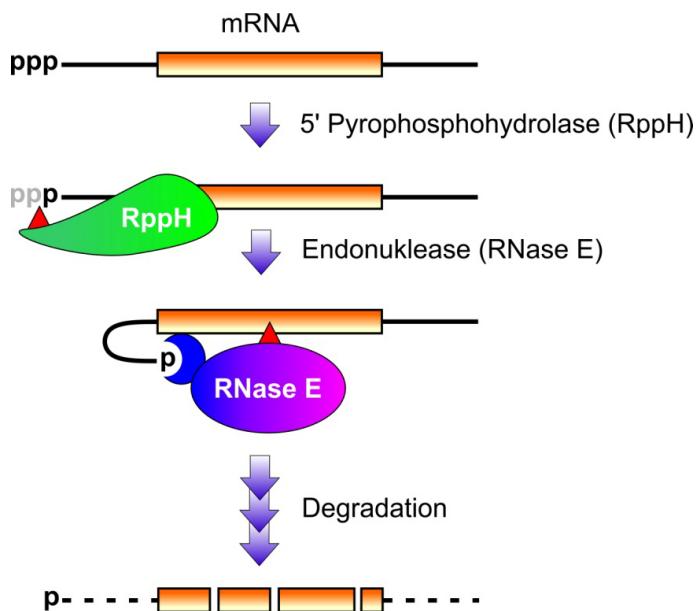


Abbildung 5.3: RppH induzierte mRNA-Degradation in *Escherichia coli*. Im Gegensatz zu Eukaryonten gestaltet sich die Regulation der mRNA-Degradation in Prokaryonten relativ einfach. Obwohl die mRNAs aufgrund ihrer geringen Stabilität leicht von Endonukleasen gespalten und damit abgebaut werden können, kann dieser Vorgang gezielt beschleunigt werden. Hierzu entfernt die Nudix-Hydrolase RppH das γ- und β-Phosphat am 5'-Ende der mRNA. Das einfach phosphorylierte 5'-Ende wird von der Endonuklease RNase E erkannt, woraufhin die mRNA verdaut wird. Die beiden Spaltprodukte werden von anderen Endo- und Exonukleasen erkannt, was zur schrittweisen Degradation der mRNA führt.

Diese enzymatisch katalysierte Reaktion wurde zuerst in Eukaryonten entdeckt, was angesichts der dort vorherrschenden strikten Regulierung der mRNA Menge im Cytosol (5'-Capping, Polyadenylierung, Export aus dem Nukleus, RNA-Interferenz und Degradation) auch sinnvoll erscheint. Warum *E. coli* und vermutlich auch andere Prokaryonten ebenfalls eine Nudix-Hydrolase besitzen, mit der sie die mRNA Menge regulieren können, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sich *in vivo* die Konzentration einiger mRNAs signifikant, aber mit noch unbekannter Konsequenz erhöht, sofern *rppH* deletiert wurde (Deana et al. 2008). Nichtsdestotrotz sind diese speziellen Nudix-Hydrolasen ein gutes Beispiel dafür, dass die im ersten Moment ungewöhnliche Kombination mehrerer funktioneller

Eigenschaften bei einem Protein am Ende doch zu einer vernünftigen biologischen Funktion führen kann. Folglich sollte man auch bei YbiB nicht nur in einer bestimmten Klasse von Substanzen nach weiteren potentiellen Substraten suchen, sondern sollte auch andere, ungewöhnliche Substrate in Betracht ziehen. So könnte man auch in Analogie zu RppH einen möglichen Umsatz der 5'-Phosphatgruppen in RNA- oder DNA-Fragmenten untersuchen, um gegebenenfalls neue Substanzenklassen als mögliche Substrate für YbiB zu erschließen.

Unabhängig von der Suche nach weiteren potentiellen Substraten wäre es auch noch interessant zu klären, warum 8-Oxo-dGTP, nicht aber dGTP umgesetzt wird. Einige im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte kompetitive Bindungsexperimente zeigten, dass alle kanonischen Nukleosidtriphosphate von YbiB gebunden werden, die entsprechenden Monophosphate aber nicht. Man kann somit schlussfolgern, dass die Interaktion mit den Nukleosidtriphosphaten vermutlich hauptsächlich über deren Phosphatgruppen stattfindet. Dennoch konnte aber auch beobachtet werden, dass dGMP zumindest teilweise von YbiB gebunden wurde. Dies bedeutet, dass neben der Phosphatgruppe vermutlich noch andere funktionelle Gruppen des Liganden an der Bindung beteiligt sind, wodurch vermutlich auch die hohe Substratspezifität des YbiB-Proteins festgelegt wird. Momentan wird versucht, den YbiB-Wildtyp zusammen mit dGTP oder dCTP zu kristallisieren (derzeit laufende Masterarbeit Sabrina Thalhauser), um die Ursache der Substratspezifität zu klären. Ergänzend könnte man auf bioinformatische Methoden wie Moleküldynamik-Simulationen oder *Molecular Docking* zurückgreifen, um gegebenenfalls Unterschiede in der Bindung von 8-Oxo-dGTP und dGTP zu identifizieren.

Abschließend kann man sagen, dass sowohl die Nukleinsäurebindung, als auch die beobachtete Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität des YbiB-Proteins noch einige Fragen aufwerfen. So ist immer noch unklar, welche Rolle die Nukleinsäurebindung im Rahmen der biologischen Funktion des YbiB-Proteins spielt und warum beispielsweise die Anwesenheit einer AP-site diese Nukleinsäurebindung modulieren kann. In diesem Zusammenhang ist auch der Befund interessant, dass beispielsweise eine monomere YbiB-Variante (L40E I51E) weder ein besonderes Nukleinsäurebindeverhalten in Anwesenheit einer AP-site, noch eine Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität gegenüber 8-Oxo-dGTP (Werner 2016) aufweist. Unter Umständen bedeutet dies, dass nur ein dimeres YbiB-Protein in der Lage ist, die entsprechende biologische Funktion zu erfüllen. All diese Fragen können hoffentlich durch weitere zukünftige Experimente, die teilweise in diesem Abschnitt bereits angesprochen wurden, beantwortet werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**(17): 3389-3402.
- Andrabi, M., K. Mizuguchi and S. Ahmad** (2014). Conformational changes in DNA-binding proteins: relationships with precomplex features and contributions to specificity and stability. *Proteins.* **82**(5): 841-857.
- Bachmann, B. J.** (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol Rev.* **54**(2): 130-197.
- Baker, D., P. Liu, A. Burdzy and L. C. Sowers** (2002). Characterization of the substrate specificity of a human 5-hydroxymethyluracil glycosylase activity. *Chem Res Toxicol.* **15**(1): 33-39.
- Banerjee, A., W. Yang, M. Karplus and G. L. Verdine** (2005). Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature.* **434**(7033): 612-618.
- Bedard, L. L. and T. E. Massey** (2006). Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett.* **241**(2): 174-183.
- Beland, F. A. and M. C. Poirier** (1994). DNA Adducts and Their Consequences. *John Wiley & Sons Ltd.*: 29 - 55.
- Bjelland, S., N. K. Birkeland, T. Benneche, G. Volden and E. Seeberg** (1994). DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **269**(48): 30489-30495.
- Bjelland, S., M. Bjoras and E. Seeberg** (1993). Excision of 3-methylguanine from alkylated DNA by 3-methyladenine DNA glycosylase I of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**(9): 2045-2049.
- 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.
- Bugreeva, I. P., D. V. Bugreev and G. A. Nevinsky** (2005). Formation of nucleoprotein RecA filament on single-stranded DNA. Analysis by stepwise increase in ligand complexity. *FEBS J.* **272**(11): 2734-2745.

- Carvunis, A. R., T. Rolland, I. Wapinski, M. A. Calderwood, M. A. Yildirim, N. Simonis, B. Charlotteaux, C. A. Hidalgo, J. Barbette, B. Santhanam, G. A. Brar, J. S. Weissman, A. Regev, N. Thierry-Mieg, M. E. Cusick and M. Vidal** (2012). Proto-genes and *de novo* gene birth. *Nature*. **487**(7407): 370-374.
- Chen, R. F.** (1967). Fluorescence of dansyl amino acids in organic solvents and protein solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **120**(3): 609-620.
- Chen, R. F.** (1972). Measurements of absolute values in biochemical fluorescence spectroscopy. *Physics and Chemistry*. **76A**(6): 593.
- 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**(17): 11020-11024.
- Chothia, C. and A. M. Lesk** (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*. **5**(4): 823-826.
- Cimino, G. D., H. B. Gamper, S. T. Isaacs and J. E. Hearst** (1985). Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annu Rev Biochem*. **54**: 1151-1193.
- Conrad, J., N. Muller and G. Eisenbrand** (1986). Studies on the stability of trialkyl phosphates and di-(2'deoxythymidine) phosphotriesters in alkaline and neutral solution. A model study for hydrolysis of phosphotriesters in DNA and on the influence of a beta hydroxyethyl ester group. *Chem Biol Interact*. **60**(1): 57-65.
- D'Ham, C., A. Romieu, M. Jaquinod, D. Gasparutto and J. Cadet** (1999). Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry*. **38**(11): 3335-3344.
- Das, S. K. and L. A. Loeb** (1984). UV irradiation alters deoxynucleoside triphosphate pools in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. **131**(3-4): 97-100.
- 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**(12): 6640-6645.
- Deana, A., H. Celesnik and J. G. Belasco** (2008). The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature*. **451**(7176): 355-358.

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**(6674): 353-358.

Dorman, G. and G. D. Prestwich (1994). Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry*. **33**(19): 5661-5673.

Eisinger, J. (1969). A variable temperature, U.V. luminescence spectrograph for small samples. *Photochem Photobiol*. **9**(3): 247-258.

Farber, G. K. and G. A. Petsko (1990). The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci*. **15**(6): 228-234.

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**(6): 1560-1572.

Foley, T. L. and M. D. Burkart (2009). A homogeneous resonance energy transfer assay for phosphopantetheinyl transferase. *Anal Biochem*. **394**(1): 39-47.

Foti, J. J., B. Devadoss, J. A. Winkler, J. J. Collins and G. C. Walker (2012). Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*. **336**(6079): 315-319.

Fowler, R. G., S. J. White, C. Koyama, S. C. Moore, R. L. Dunn and R. M. Schaaper (2003). Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. *DNA Repair*. **2**(2): 159-173.

Frick, D. N., D. J. Weber, J. R. Gillespie, M. J. Bessman and A. S. Mildvan (1994). Dual divalent cation requirement of the MutT dGTPase. Kinetic and magnetic resonance studies of the metal and substrate complexes. *J Biol Chem*. **269**(3): 1794-1803.

Friedberg, E. C., G. C. Walker, w. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz and T. Ellenberger (2006). DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press*.

Fukui, K. (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *Journal Nucleic Acids*.

Gripon, S., Q. Zhao, T. Robinson, J. J. Marshall, R. J. O'Neill, H. Manning, G. Kennedy, C. Dunsby, M. Neil, S. E. Halford, P. M. French and G. S. Baldwin (2011). Differential modes of DNA binding by mismatch uracil DNA glycosylase from *Escherichia coli*: implications for abasic lesion processing and enzyme communication in the base excision repair pathway. *Nucleic Acids Res*. **39**(7): 2593-2603.

- Hashimoto, H., S. Hong, A. S. Bhagwat, X. Zhang and X. Cheng** (2012). Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res.* **40**(20): 10203-10214.
- Hedglin, M. and P. J. O'Brien** (2010). Hopping enables a DNA repair glycosylase to search both strands and bypass a bound protein. *ACS Chem Biol.* **5**(4): 427-436.
- Hellman, L. M. and M. G. Fried** (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc.* **2**(8): 1849-1861.
- Hendrich, B., U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny and A. Bird** (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature.* **401**(6750): 301-304.
- 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**(1): 28-32.
- Hill, A. V.** (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology.* **40**: 4-7.
- Holinski, A.** (2011). Monomerisierung und Charakterisierung zweier evolutionär verwandter homodimerer Proteine durch Proteindesign, Masterarbeit, Universität Regensburg.
- Horii, T., T. Ogawa, T. Nakatani, T. Hase, H. Matsubara and H. Ogawa** (1981). Regulation of SOS functions - Purification of *Escherichia coli* LexA Protein and Determination of Its Specific Site Cleaved by the RecA Protein. *Cell.* **27**(3): 515-522.
- Horton, J. R., X. Zhang, R. Maunus, Z. Yang, G. G. Wilson, R. J. Roberts and X. Cheng** (2006). DNA nicking by HinP1I endonuclease: bending, base flipping and minor groove expansion. *Nucleic Acids Res.* **34**(3): 939-948.
- Huisman, O., R. D'Ari and S. Gottesman** (1984). Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**(14): 4490-4494.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**(1): 23-28.

- Ito, R., H. Hayakawa, M. Sekiguchi and T. Ishibashi** (2005). Multiple enzyme activities of *Escherichia coli* MutT protein for sanitization of DNA and RNA precursor pools. *Biochemistry*. **44**(17): 6670-6674.
- Iwai, T., S. Kuramitsu and R. Masui** (2004). The Nudix hydrolase Ndx1 from *Thermus thermophilus* HB8 is a diadenosine hexaphosphate hydrolase with a novel activity. *J Biol Chem*. **279**(21): 21732-21739.
- Iyer, V. N. and W. Szybalski** (1964). Mitomycins and Porfiromycin: Chemical Mechanism of Activation and Cross-Linking of DNA. *Science*. **145**(3627): 55-58.
- Jayanth, N., S. Ramachandran and M. Puranik** (2009). Solution structure of the DNA damage lesion 8-oxoguanosine from ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *J Phys Chem A*. **113**(8): 1459-1471.
- Jin, D. J. and C. A. Gross** (1988). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol*. **202**(1): 45-58.
- Kaiser, W.** (2012). Versuch zur Funktionsaufklärung eines neuartigen nukleinsäurebindenden Proteins, Masterarbeit, Universität Regensburg.
- Kamiya, H., M. Hori, T. Arimori, M. Sekiguchi, Y. Yamagata and H. Harashima** (2009). NUDT5 hydrolyzes oxidized deoxyribonucleoside diphosphates with broad substrate specificity. *DNA Repair*. **8**(10): 1250-1254.
- Kanazhevskaya, L. Y., V. V. Koval, D. O. Zharkov, P. R. Strauss and O. S. Fedorova** (2010). Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair. *Biochemistry*. **49**(30): 6451-6461.
- Kankainen, M., T. Ojala and L. Holm** (2012). BLANNOTATOR: enhanced homology-based function prediction of bacterial proteins. *BMC Bioinformatics*. **13**: 33.
- Kasai, H. and S. Nishimura** (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res*. **12**(4): 2137-2145.
- 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**(23): 10695-10700.
- Khalturin, K., G. Hemmrich, S. Fraune, R. Augustin and T. C. Bosch** (2009). More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? *Trends Genet*. **25**(9): 404-413.

- Kisker, C., J. Kuper and B. Van Houten** (2013). Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**(3): a012591.
- Kobayashi, M., Y. Ohara-Nemoto, M. Kaneko, H. Hayakawa, M. Sekiguchi and K. Yamamoto** (1998). Potential of *Escherichia coli* GTP cyclohydrolase II for hydrolyzing 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem.* **273**(41): 26394-26399.
- Kreuzer, K. N.** (2013). DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**(11): a012674.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(5259): 680-685.
- Lee, H. S., R. D. Dimla and P. G. Schultz** (2009). Protein-DNA photo-crosslinking with a genetically encoded benzophenone-containing amino acid. *Bioorg Med Chem Lett.* **19**(17): 5222-5224.
- Lewis, E. A. and K. P. Murphy** (2005). Isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol.* **305**: 1-16.
- Lindahl, T., B. Demple and P. Robins** (1982). Suicide inactivation of the *E. coli* O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *EMBO J.* **1**(11): 1359-1363.
- Little, J. W.** (1982). Control of the SOS regulatory system by the level of RecA protease. *Biochimie.* **64**(8-9): 585-589.
- Little, J. W., S. H. Edmiston, L. Z. Pacelli and D. W. Mount** (1980). Cleavage of the *Escherichia coli* lexA protein by the recA protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**(6): 3225-3229.
- Liu, J., C. A. Castaneda, B. J. Wilkins, D. Fushman and T. A. Cropp** (2010). Condensed *E. coli* cultures for highly efficient production of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorg Med Chem Lett.* **20**(19): 5613-5616.
- Liu, P., A. Burdzy and L. C. Sowers** (2003). Repair of the mutagenic DNA oxidation product, 5-formyluracil. *DNA Repair.* **2**(2): 199-210.
- Lohman, T. M. and M. E. Ferrari** (1994). *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annu Rev Biochem.* **63**: 527-570.
- Ma, B. G., L. Chen, H. F. Ji, Z. H. Chen, F. R. Yang, L. Wang, G. Qu, Y. Y. Jiang, C. Ji and H. Y. Zhang** (2008). Characters of very ancient proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **366**(3): 607-611.

- Machida, M., N. Ushijima, T. Takahashi and Y. Kanaoka** (1977). A Novel Fluorescent Thiol Reagent : Syntheses and Electronic Spectra of N-(7-Dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)-maleimide (DACM-3) and the Related Compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **25**(6): 1289-1294.
- Mahaputra Wijaya, I. M., T. Iwata, J. Yamamoto, K. Hitomi, S. Iwai, E. D. Getzoff and H. Kandori** (2015). FTIR study of CPD photolyase with substrate in single strand DNA. *Biophysics*. **11**: 39-45.
- Maki, H. and M. Sekiguchi** (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*. **355**(6357): 273-275.
- 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**(30): 21410-21421.
- Markham, B. E., J. E. Harper, D. W. Mount, G. B. Sancar, A. Sancar, W. D. Rupp, C. J. Kenyon and G. C. Walker** (1984). Analysis of mRNA synthesis following induction of the *Escherichia coli* SOS system. *J Mol Biol*. **178**(2): 237-248.
- 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**(13): 3245-3254.
- McLennan, A. G.** (2006). The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci*. **63**(2): 123-143.
- Mielecki, D. and E. Grzesiuk** (2014). Ada response - a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. **355**(1): 1-11.
- Mo, J. Y., H. Maki and M. Sekiguchi** (1992). Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(22): 11021-11025.
- Morgan, M. T., A. Maiti, M. E. Fitzgerald and A. C. Drohat** (2011). Stoichiometry and affinity for thymine DNA glycosylase binding to specific and nonspecific DNA. *Nucleic Acids Res*. **39**(6): 2319-2329.
- Morse, M. L., E. M. Lederberg and J. Lederberg** (1956). Transduction in *Escherichia Coli* K-12. *Genetics*. **41**(1): 142-156.

- 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**(7): 1081-1088.
- Nagano, N., C. A. Orengo and J. M. Thornton** (2002). One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol.* **321**(5): 741-765.
- Nagy, G. N., I. Leveles and B. G. Vertessy** (2014). Preventive DNA repair by sanitizing the cellular (deoxy)nucleoside triphosphate pool. *FEBS J.* **281**(18): 4207-4223.
- Nakabeppu, Y.** (2014). Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*(15): 12543-12557.
- Noll, S., G. Hampp, H. Bausbacher, N. Pellegata and H. Kranz** (2009). Site-directed mutagenesis of multi-copy-number plasmids: Red/ET recombination and unique restriction site elimination. *Biotechniques.* **46**(7): 527-533.
- 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**(1): 168-189.
- O'Neill, R. J., O. V. Vorob'eva, H. Shahbakhti, E. Zmuda, A. S. Bhagwat and G. S. Baldwin** (2003). Mismatch uracil glycosylase from *Escherichia coli*: a general mismatch or a specific DNA glycosylase? *J Biol Chem.* **278**(23): 20526-20532.
- 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**(1): 7-8.
- Ohno, S.** (1970). Evolution by Gene Duplication. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray** (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**(11): 2411-2423.
- Parikh, S. S., G. Walcher, G. D. Jones, G. Slupphaug, H. E. Krokan, G. M. Blackburn and J. A. Tainer** (2000). Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(10): 5083-5088.

- Pignatello, J. J., E. Oliveros and A. MacKay** (2006). Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **36**(1): 1 - 84.
- Pugmire, M. J., W. J. Cook, A. Jasanooff, 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**(2): 285-299.
- Pugmire, M. J. and S. E. Ealick** (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem. J.* **361**(Pt 1): 1-25.
- Pursell, Z. F., J. T. McDonald, C. K. Mathews and T. A. Kunkel** (2008). Trace amounts of 8-oxo-dGTP in mitochondrial dNTP pools reduce DNA polymerase gamma replication fidelity. *Nucleic Acids Res.* **36**(7): 2174-2181.
- Quillardet, P., M. A. Rouffaud and P. Bouige** (2003). DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* **154**(8): 559-572.
- Radman, M.** (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* **5A**: 355-367.
- 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**(32): 7440-7450.
- Riggs, A. D. and P. A. Jones** (1983). 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res.* **40**: 1-30.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, 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**(4732): 1350-1354.
- Sang, P. B. and U. Varshney** (2013). Biochemical properties of MutT2 proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and *M. smegmatis* and their contrasting antimutator roles in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **195**(7): 1552-1560.
- Sassanfar, M. and J. W. Roberts** (1990). Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol.* **212**(1): 79-96.
- 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.

- 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**(23): 5199-5209.
- Schmid, F. X. (1997).** Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *IRL Press*: 259-295.
- Schmidt, M. G., K. M. Dolan and D. B. Oliver (1991).** Regulation of *Escherichia coli* secA mRNA translation by a secretion-responsive element. *J Bacteriol.* **173**(20): 6605-6611.
- Schmitz, J. F. and E. Bornberg-Bauer (2017).** Fact or fiction: updates on how protein-coding genes might emerge *de novo* from previously non-coding DNA. *F1000Res.* **6**: 57.
- Schneider, D. (2011).** Identifikation und funktionelle Charakterisierung von TrpD2, einer neuen Klasse nukleinsäurebindender Proteine, Dissertation, Universität Regensburg.
- Schneider, D., W. Kaiser, C. Stutz, A. Holinski, O. Mayans and P. Babinger (2015).** YbiB from *Escherichia coli*, the Defining Member of the Novel TrpD2 Family of Prokaryotic DNA-binding Proteins. *J Biol Chem.* **290**(32): 19527-19539.
- 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**(2): 506-516.
- Sharma, A., C. Doucette, F. N. Biro and M. M. Hingorani (2013).** Slow conformational changes in MutS and DNA direct ordered transitions between mismatch search, recognition and signaling of DNA repair. *J Mol Biol.* **425**(22): 4192-4205.
- 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**(16): 3055-3063.
- Shusterman, R., S. Alon, T. Gavrinyov and O. Krichevsky (2004).** Monomer dynamics in double- and single-stranded DNA polymers. *Phys Rev Lett.* **92**(4): 048303.
- Song, M. G., S. Bail and M. Kiledjian (2013).** Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *RNA*. **19**(3): 390-399.
- Sorokina, M., M. Stam, C. Medigue, O. Lespinet and D. Vallenet (2014).** Profiling the orphan enzymes. *Biol Direct.* **9**: 10.

- Steenken, S. and S. V. Jovanovic** (1997). How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*(119): 617-618.
- Sternер, R. and B. Höcker** (2005). Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold. *Chemical reviews*. **105**(11): 4038-4055.
- Stryer, L.** (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*. **47**: 819-846.
- Tajiri, T., H. Maki and M. Sekiguchi** (1995). Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. **336**(3): 257-267.
- 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**(6781): 1014-1018.
- Taniguchi, Y., P. J. Choi, G. W. Li, H. Chen, M. Babu, J. Hearn, A. Emili and X. S. Xie** (2010). Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*. **329**(5991): 533-538.
- Tassotto, M. L. and C. K. Mathews** (2002). Assessing the metabolic function of the MutT 8-oxodeoxyguanosine triphosphatase in *Escherichia coli* by nucleotide pool analysis. *J Biol Chem*. **277**(18): 15807-15812.
- Tchou, J., V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A. P. Grollman and F. Johnson** (1994). Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J Biol Chem*. **269**(21): 15318-15324.
- Teichmann, S. A.** (2002). The constraints protein-protein interactions place on sequence divergence. *J Mol Biol*. **324**(3): 399-407.
- Udenfriend, S., C. T. Clark, J. Axelrod and B. B. Brodie** (1954). Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation. *J Biol Chem*. **208**(2): 731-739.
- 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**(19): 5496-5505.
- Wang, L. and P. G. Schultz** (2001). A general approach for the generation of orthogonal tRNAs. *Chem Biol*. **8**(9): 883-890.

- Wang, W. and B. A. Malcolm** (2002). Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* **182**: 37-43.
- Wang, Z. X.** (1995). An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Lett.* **360**(2): 111-114.
- Werner, K.** (2016). Vergleichende Aktivitätsstudien mit TrpD2-, TrpD- und NPII-Proteinen, Bachelorarbeit, Universität Regensburg.
- Xie, J. and P. G. Schultz** (2005). An expanding genetic code. *Methods.* **36**(3): 227-238.
- 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**(2): 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. USA.* **97**(11): 5978-5983.
- Zhang, Q. M., I. Miyabe, Y. Matsumoto, K. Kino, H. Sugiyama and S. Yonei** (2000). Identification of repair enzymes for 5-formyluracil in DNA. Nth, Nei, and MutM proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **275**(45): 35471-35477.
- Zharkov, D. O.** (2008). Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci.* **65**(10): 1544-1565.

7. ANHANG

7.1 EINFLUSS DER IONENSTÄRKE AUF DIE NUKLEINSÄUREBINDUNG DES YBiB-WILDTYPHS

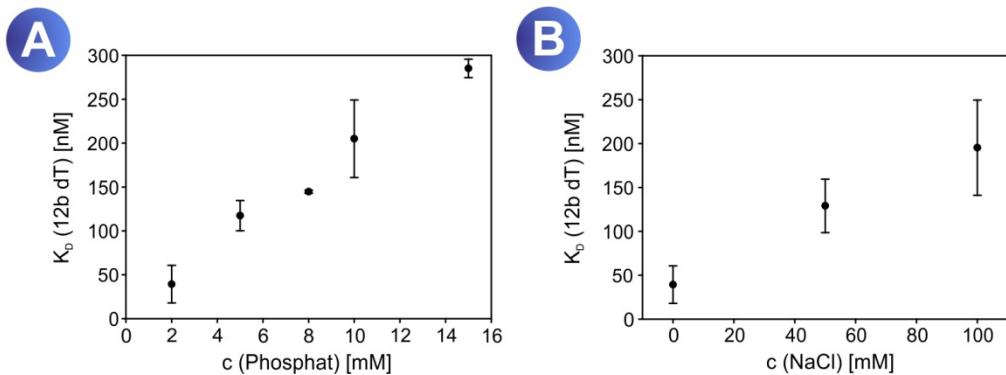


Abbildung 7.1: Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung des YbiB-Proteins an einzelsträngige DNA. Zu YbiB wurden 12b lange einzelsträngige Oligonukleotide in 50 mM Tris/HCl pH 7.5 bei unterschiedlichen Phosphationen-Konzentrationen (A) oder in 50 mM Tris/HCl, 2 mM KP bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (B) titriert. K_D -Werte wurden aus den Titrationskurven bestimmt und gegen die Salzkonzentration aufgetragen. Alle Messpunkte wurden im Triplikat bestimmt. Abbildung modifiziert nach Schneider et al. (2015).

7.2 KRISTALLISATIONS-SCREENS: OPTIMIERTE BEDINGUNGEN

Tabelle 7.1: Optimierung MIDAS™ Bedingung D5

	Reagenz	1	2	3	4	5	6
A	Jeffamine SD-2001 [% (v/v)]	8	8	8	8	8	8
	Poly(acrylic acid sodium salt) 2100 [% (v/v)]	7	12.5	17	22	27	30
	HEPES pH 7.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
B	Jeffamine SD-2001 [% (v/v)]	6	6	6	6	6	6
	Poly(acrylic acid sodium salt) 2100 [% (v/v)]	7	12.5	17	22	27	30
	HEPES pH 7.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C	Jeffamine SD-2001 [% (v/v)]	4	4	4	4	4	
	Poly(acrylic acid sodium salt) 2100 [% (v/v)]	7	12.5	17	22	27	30
	HEPES pH 7.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
D	Jeffamine SD-2001 [% (v/v)]	2	2	2	2	2	2
	Poly(acrylic acid sodium salt) 2100 [% (v/v)]	7	12.5	17	22	27	30
	HEPES pH 7.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Tabelle 7.2: Optimierung Morpheus Bedingung G4(1)

	Reagenz	1	2	3	4	5
A	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	Precipitants (#) [%]	32.5	35	37.5	40	42.5
B	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Precipitants (#) [%]	32.5	35	37.5	40	42.5
C	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
	Precipitants (#) [%]	32.5	35	37.5	40	42.5

(*) = 1M Carboxylic acids = jeweils 0.2M Sodium formate; 0.2M Ammonium acetate; 0.2M Sodium citrate tribasic dihydrate; 0.2M Sodium potassium tartrate tetrahydrate; 0.2M Sodium oxamate

(#) = 75%-Lösung: 25% MPD, 25% PEG 1000, 25% PEG 3350

Tabelle 7.3: Optimierung Morpheus Bedingung G4(2)

	Reagenz	1	2	3	4	5
A	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	Precipitants (#) [%]	27.5	30	32.5	35	37.5
B	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Precipitants (#) [%]	27.5	30	32.5	35	37.5
C	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
	Precipitants (#) [%]	27.5	30	32.5	35	37.5
D	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Precipitants (#) [%]	27.5	30	32.5	35	37.5

E	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	Precipitants (#) [%]	27.5	30	32.5	35	37.5
F	Imidazol/MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Carboxylic acids (*) [M]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	Precipitants (#) [%]	27.5	30	32.5	35	37.5

(*) = 1M Carboxylic acids = jeweils 0.2M Sodium formate; 0.2M Ammonium acetate; 0.2M Sodium citrate tribasic dihydrate; 0.2M Sodium potassium tartrate tetrahydrate; 0.2M Sodium oxamate

(#) = 75%-Lösung: 25% MPD, 25% PEG 1000, 25% PEG 3350

Tabelle 7.4: Optimierung MIDAS™ Bedingung C2

	Reagenz	1	2	3	4	5
A	MES pH 6.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	NaCl [M]	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
	Jeffamine ED-2003 [% (v/v)]	25	27.5	30	32.5	35
B	MES pH 6.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	NaCl [M]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Jeffamine ED-2003 [% (v/v)]	25	27.5	30	32.5	35
C	MES pH 6.0 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	NaCl [M]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	Jeffamine ED-2003 [% (v/v)]	25	27.5	30	32.5	35

Tabelle 7.5: Optimierung MIDAS™ Bedingung D8

	Reagenz	1	2	3	4	5
A	Tris/HCl pH 8 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Glycerol ethoxylate [%]	5	10	15	20	25
	Tetrahydrofuran [%]	5	5	5	5	5
B	Tris/HCl pH 8 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Glycerol ethoxylate [%]	5	10	15	20	25
	Tetrahydrofuran [%]	10	10	10	10	10

C	Tris/HCl pH 7.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Glycerol ethoxylate [%]	5	10	15	20	25
	Tetrahydrofuran [%]	5	5	5	5	5
D	Tris/HCl pH 7.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Glycerol ethoxylate [%]	5	10	15	20	25
	Tetrahydrofuran [%]	10	10	10	10	10
E	MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Glycerol ethoxylate [%]	5	10	15	20	25
	Tetrahydrofuran [%]	5	5	5	5	5
F	MES pH 6.5 [M]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Glycerol ethoxylate [%]	5	10	15	20	25
	Tetrahydrofuran [%]	10	10	10	10	10

7.3 SCHEMATISCHER INPUT-BEFEHL FÜR DYNAFIT

Der für DynaFit verwendete Input-Befehl zur Bestimmung der Dissoziationskonstante aus Fluoreszenzpolarisationsdaten. Das Input-Schema ist in verallgemeinerter Form dargestellt.

```
;
[task]
data = equilibria
task = fit
model = one site ?
[mechanism]
E + D <==> ED : Kd1 dissociation
[constants]
Kd1 = 15 ? # Initialer Wert für Kd1
[concentrations]
D = 5 # Konzentration der vorgelegten Fluoreszenzsonde
[responses]
intensive
D = 0.083 ?? # Initialer Wert der Polarisation ohne Interaktionspartner
ED = 0.183 ?? # Initialer Wert der Polarisation nach vollständiger Sättigung der Bindestelle
[data]
variable E
plot logarithmic
set Data1
set Data2
```

```

[output]
directory ./users/output/DataX
; _____
[task]
data = equilibria
task = fit
model = two sites ?
[mechanism]
E + D <==> ED : Kd1 dissoc
ED + E <==> EED : Kd2 dissoc
[constants]
Kd1 = 35 ?? # Initialer Wert für Kd1
Kd2 = 1000 ?? # Initialer Wert für Kd2
[responses]
intensive
D = 0.082 ?? # Initialer Wert der Polarisation ohne Interaktionspartner
ED = 0.16 ; # Initialer Wert der Polarisation nach vollständiger Sättigung der 1. Bindestelle/wird
hier konstant gehalten
EED = 0.178 ?? # Initialer Wert der Polarisation nach vollständiger Sättigung der 2. Bindestelle
; _____
[set:Data1]
E, (nM)      anisotropy
x1           y1
x2           y2
..
[set:Data2]
E, (nM)      anisotropy
x1           y1
x2           y2
..
[end]

```

7.4 KRISTALL-DATEN DER NEUEN YBiB-APOSTRUKTUR

Die von Dr. Chitra Rajendran bestimmten Kristall-Daten der neuen YbiB-Apostruktur (Abbildung 4.15).

<i>Resolution range (Å)</i>	18.1 - 1.908 (1.976 - 1.908)
<i>Space group</i>	P 1 2 ₁ 1
<i>Unit cell</i>	45.46, 67.44, 105.11, 90, 101.38, 90
<i>Unique reflections</i>	48322 (4645)

<i>Completeness (%)</i>	99.39 (94.97)
<i>Mean l/sigma(l)</i>	3
<i>Wilson B-factor</i>	27.31
<i>Reflections used for R-free</i>	
<i>R-work</i>	0.1932 (0.3023)
<i>R-free</i>	0.2417 (0.3475)
<i>Number of non-hydrogen atoms</i>	5209
<i>macromolecules</i>	4835
<i>ligands</i>	---
<i>water</i>	374
<i>Protein residues</i>	633
<i>RMS(bonds)</i>	0.008
<i>RMS(angles)</i>	1.13
<i>Ramachandran favored (%)</i>	97
<i>Ramachandran allowed (%)</i>	2.36
<i>Ramachandran outliers (%)</i>	0.64
<i>Clashscore</i>	5.56
<i>Average B-factor</i>	36.00

7.5 QUANTIFIZIERUNG VON 8-Oxo-dGTP MITTELS HPLC-ANALYTIK

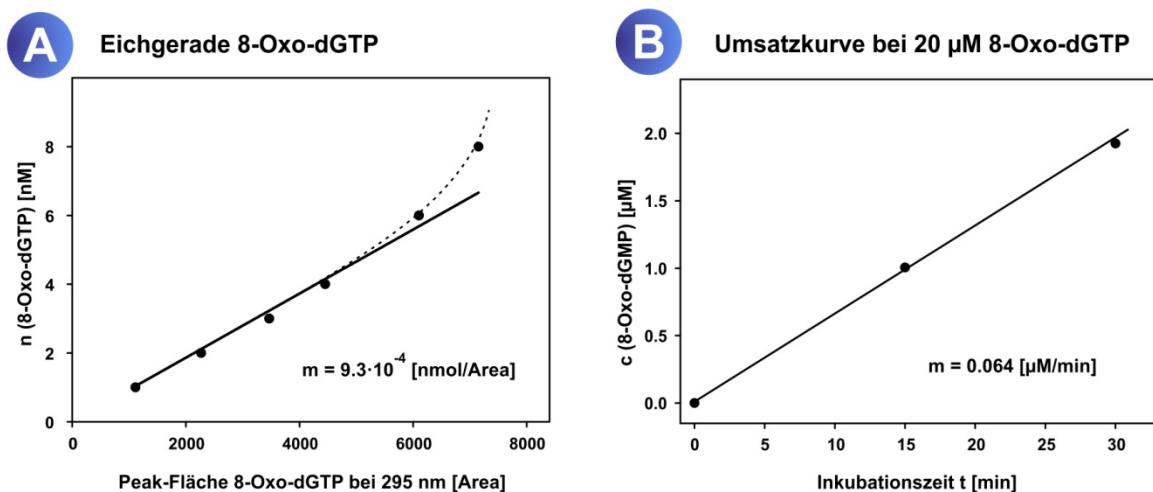


Abbildung 7.2: 8-Oxo-dGTP Eichgerade und eine exemplarische Umsatzkurve. Unterschiedliche Stoffmengen 8-Oxo-dGTP wurden zunächst auf das HPLC-System aufgegeben und deren Elution mittels Absorptionsmessung bei 295 nm beobachtet. (A) Die 8-Oxo-dGTP Peaks wurden integriert und anschließend die injizierte 8-Oxo-dGTP Stoffmenge (n) gegen die Peak-Fläche aufgetragen. Im Folgenden wurde der lineare Bereich der Eichgerade dazu verwendet, um die mittels Stoppkinetik beobachtete Produktbildung des 8-Oxo-dGMPs zu quantifizieren. Dies ist möglich, da 8-Oxo-dGTP und 8-Oxo-dGMP ein identisches Absorptionsspektrum aufweisen. (B) Im Anschluss an die Quantifizierung wurden die Werte in einzelnen Umsatzkurven zusammengefasst, aus denen wiederum die Anfangssteigung und somit die initiale Reaktionsgeschwindigkeit (v_i) für jede eingesetzte Substratkonzentration bestimmt werden konnte.

7.6 BINDUNG VON YBIB AN KURZE NUKLEINSÄUREN IN ANWESENHEIT VON DNTPS

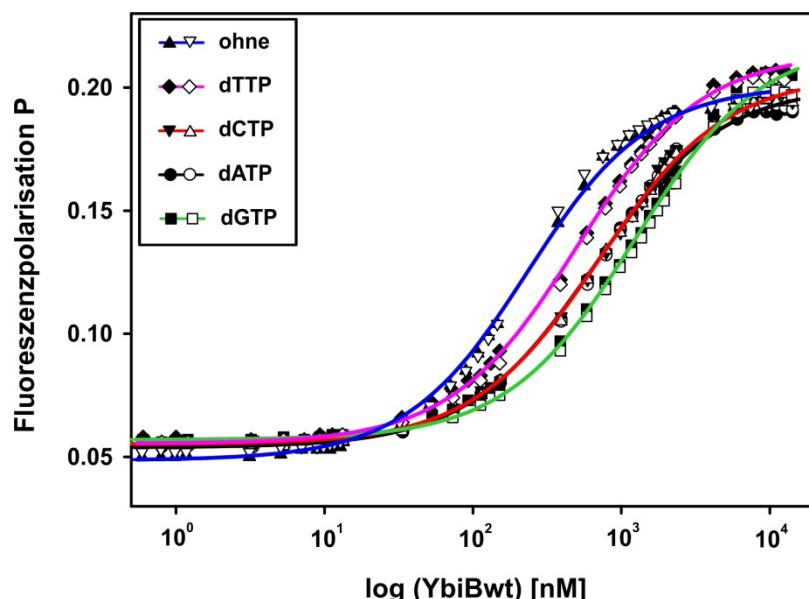


Abbildung 7.3: Einfluss der dNTPs auf die Bindung von YbiB an kurze Nukleinsäuren. Gezeigt sind die Fluoreszenzpolarisationsmessungen zur Bestimmung der apparenten Affinität von YbiB gegenüber einer 12bp dsDNA-Sonde in Ab- und Anwesenheit eines der vier kanonischen Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP oder dTTP). An einem der beiden 5'-Enden jeder dsDNA-Sonde befindet sich ein Chromis 500N Fluorophor. In Duplikaten wurden jeweils 50 nM der DNA-Sonde ohne oder mit 5 μ M eines dNTPs in 50 mM Tris/HCl 2 mM KP pH 7.5 vorgelegt und YbiB schrittweise zutriert. Die Fluoreszenzpolarisation des Chromis 500N Farbstoffes wurde verfolgt und gegen die logarithmische YbiB-Konzentration aufgetragen. An die Messpunkte wurde ein 1:1 Bindungsmodell (je DNA-Molekül genau ein Bindungsergebnis; durchgezogene Linie) angepasst und somit die apparenten K_D -Werte (vgl. Tabelle 4.9) für die Bindung des YbiB-Proteins an die Nukleinsäure bestimmt.

8. DANKSAGUNG

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

Allen voran danke ich Professor Dr. Reinhard Sterner für das interessante, vielseitige Thema und das in mich gesetzte Vertrauen, dieses selbständig zu bearbeiten. Des Weiteren 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 bedanken, dass Projekt eigenständig weiter zu entwickeln, was es mir ermöglichte, viele verschiedene Methoden und Techniken kennenzulernen. Ich danke ihm auch für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion, seine ausgezeichnete fachliche Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön gilt auch Professorin Dr. Christine Ziegler und Dr. Chitra Rajendran für ihre fachliche Unterstützung bei dem Versuch einen kovalenten YbiB-DNA-Komplex zu kristallisieren. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Chitra Rajendran für die im Rahmen der Kooperation mitunter fachfremden, aber angenehmen Diskussionen bedanken.

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

Bei meinen ehemaligen Praktikanten Martin Winter und Michael Bernhard, sowie meinen Bachelor- und Masterstudentinnen Kim Werner und Sabrina Thalhauser möchte ich mich an dieser Stelle für ihren großen Einsatz und die geleistete Arbeit bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Mona Linde und Michael Schupfner für ihre Hilfsbereitschaft, die intensiven Gespräche über experimentelle Probleme, die daraus resultierenden Lösungsvorschläge und das freundschaftliche Verhältnis inner- und außerhalb des Labors bedanken. Ihre Unterstützung, Geduld und die vielen liebevollen Aufmunterungen, die ich in den letzten viereinhalb Jahren von ihnen erfahren durfte, werden mir für immer im Gedächtnis bleiben.

In diesem Sinne möchte ich mich zudem besonders bei Dr. Sandra Schlee und Klaus-Jürgen Tiefenbach sowohl für ihren wissenschaftlichen Rat, als auch für die zahlreichen intensiven und motivierenden Gespräche bedanken.

Bei allen anderen Mitgliedern der AG Sterner möchte ich mich für die stets freundliche und somit angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein weiterer großer Dank gilt meinen Eltern Laura und Wolfgang Kaiser, meinen Großeltern Berta und Johann Weber, sowie meiner Tante Laura Mayer, die mich jeher in allen Lebenslagen

tatkräftig unterstützt und geprägt haben, wodurch ich letztlich zu dem Menschen geworden bin, der ich heute bin.

Zuletzt möchte ich mich auch bei all denjenigen bedanken, die an mir und meinen persönlichen Fähigkeiten gezweifelt haben, was mich zunehmend dazu angespornt hat, mein Bestes zu geben.

9. EIDESSTATTLICHE 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, 5. April 2017

Wolfgang Kaiser

10. TAGUNGSBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN

Vorträge

Funktionelle Charakterisierung der TrpD2-Proteinfamilie

31. Rabensteiner Kolleg, Pottenstein 06/2014

Functional characterization of the TrpD2 protein family.

Rigel Summer Academy, Beilngries 06/2015

Functional characterization of the TrpD2 protein family - a novel group of DNA-binding proteins.

26th Faltertage, Halle (Saale) 10/2015

Poster

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

Functional characterization of the TrpD2 protein family.

Rigel Summer Academy, Kostenz 09/2014

Publikationen

Scheider D., Kaiser W., Stutz C., Holinski A., Mayans O. & Babinger P.

YbiB from Escherichia coli, the Defining Member of the Novel TrpD2 Family of Prokaryotic DNA-binding Proteins.

The Journal of Biological Chemistry Vol. 290, No. 32, pp 19527 - 19539, August 7, 2015