

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Studien zur Erkennung geschädigter DNA in
der Nukleotid- und Basenexzisionsreparatur**

Ralf Strasser

aus

München

2010

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von *Herrn Prof. Dr. Thomas Carell* betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 12.08.2010



Ralf Strasser

Dissertation eingereicht am: 17.08.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sieber

Mündliche Prüfung am: 20.09.2010

Meinen Eltern gewidmet

Gehe nicht, wohin der Weg führen mag,
sondern dorthin, wo kein Weg ist,
und hinterlasse eine Spur.

Jean Paul

Danksagung

Meinem Doktorvater, *Prof. Dr. Thomas Carell* danke ich ganz herzlich für die interessante Aufgabenstellung und stets vorhandene Diskussionsbereitschaft. Trotz der häufigen Abwesenheit interessierte er sich immer für die neuesten Ergebnisse und versprühte den nötigen Optimismus, auch wenn die Forschung nicht immer die erwarteten Ergebnisse brachte. Vor allem aber auch die gebotenen Arbeitsbedingungen und Ausstattung der Labore waren exzellent und sicherlich nicht alltäglich.

Herrn *Prof. Dr. Stephan Sieber* danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferats und den Mitgliedern der Prüfungskommission für Ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung.

Herrn *Prof. Dr. Jürgen Evers* danke ich für die Unterstützung als Paten-Professor während des gesamten Studiums.

Besonders möchte ich *Dr. Markus Müller* danken, der immer ein offenes Ohr für kritische und hilfreiche Diskussionen hatte und stets auf jegliche biochemischen Fragen eine Antwort wusste. Aber auch für die nicht immer selbstverständliche Unterstützung bei Problemen in der IT-Welt möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Und natürlich für die regen Diskussionen vor dem Haus F.

Auch besonders möchte ich mich bei *Dr. Sabine Schneider* bedanken, die mir die Welt der Kristalle näher brachte. Und trotz nächtelanger meist erfolgloser Messungen am Synchrotron nicht den Optimismus vergaß, sondern nach neuen Möglichkeiten suchte, wie die Kristalle besser streuen könnten.

Für das sorgfältige Korrekturlesen möchte ich mich sehr herzlich bei *Dr. Markus Müller, Dr. Sabine Schneider, Dr. Melanie Maul, Dr. Andreas Glas* und *Stefanie Menrad* bedanken.

Folgenden Kollegen möchte ich mich für das Bereitstellen von mehr (besonders bei Kristallisationsprojekten) oder weniger großen Mengen an DNA und der sehr guten Zusammenarbeit danken: *Stephanie Schorr, Dr. Andreas Glas, Malte Winnacker, Thomas Reißner, Dimitrios Stathis, Tim Gehrke, Korbinian Heil* und *Dr. Heiko Müller*.

Für die Mithilfe und Unterstützung möchte ich meinen Master-und Bachelor-Studenten bzw. F-Praktikanten danken. Allen voran *Sandra Koch, Dr. Andreas Glas, Richard Franz-Xaver Plapperer, Verena Stockhausen* und *Nina Schöffl*.

Für die unkomplizierte und angenehme Zusammenarbeit mit den radioaktiven Gelen möchte ich mich bei *Ruth Hoffmann* bedanken. Auch wenn es mal etwas länger dauert...

Den Mitarbeitern *Claudia Gräf, Sabine Voss* und vor allem *Slava Gärtner* danke ich für die große Hilfsbereitschaft bei den organisatorischen Herausforderungen des Laboralltags und allen bürokratischen Angelegenheiten.

Dem gesamten Arbeitskreis möchte ich für ein ausgesprochen freundliches und kollegiales Verhältnis danken. Es haben sich daraus wahre Freundschaften entwickelt, die ich nicht missen möchte. Aber auch die vielen Aktionen außerhalb des Labors sorgten für die nötige Abwechslung und dem richtigen Zusammenhalt. Aus dem AK Knochel möchte ich *Marc „Freilich“ Mosrin* für die richtige Ablenkung danken...

Dem „harten Kern“ der Biochemie aus der Anfangszeit, bestehend aus *Dr. Melanie Maul, Dr. Carsten Pieck* und *Dr. Markus Müller* möchte ich herzlich danken.

Meinen mehr oder weniger permanenten Laborkollegen aus dem Labor „Campusblick“ oder auch Labor „Großraumdisse“ genannt, möchte ich für ein grandioses Laborklima danken. Zu nennen wären besonders *Dr. Melanie Maul, Dr. David Kuch* und *Dr. Simon Warncke* und natürlich allen Nachfolgern und Zwischenmietern. Vor allem die musikalische Untermalung war hervorragend und es eröffneten sich dadurch ganz neue Dimensionen der Laborarbeit.

Aber vor allem möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben: Meinen Eltern. Meiner Mutter, die mich durch ihren unermüdlichen Einsatz auch in schwierigen Zeiten immer unterstützte. Meinem Vater, der mich bei diesem Abschnitt meines Lebens nicht mehr begleiten durfte. Aber ich trotzdem immer auf ihn zählen kann.

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder wurden auf Konferenzen präsentiert:

Konferenzbeiträge:

1. *8th Winter Research Conference on Oxidative DNA Damage: From Chemical Aspects to Biological Consequences*, 17.01 – 23.01.2009, Les Houches, Frankreich. «*Rad14 confers specificity for bulky adducts in Nucleotide Excision Repair*» (Posterpräsentation).
2. *EMBL Conference on Chemical Biology 2008*, 08.10 – 11.10.2008, Heidelberg, Deutschland. «*Rad14 is a Key Protein in Nucleotide Excision Repair*» (Posterpräsentation).
3. *7th International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids*, 01.04 – 05.04.2007, Sheffield, UK. «*Damage recognition in Nucleotide Excision Repair*» (Posterpräsentation).
4. *Gordon Research Conference on DNA damage, Mutation & Cancer*, 05.03 – 10.03.2006, Ventura, CA, USA. «*Repair of UV-induced DNA lesions*» (Posterpräsentation).
5. *EU – Network Meeting, Base and Sugar Radical Reactivity in Nucleic acids*, 14.03 – 15.03.2008, LMU München, Deutschland (Konferenzteilnahme).
6. *2nd International Gene Center/SFB646 Symposium, Regulatory Networks in Genome Expression and Maintenance*, 12.10 – 13.10.2007, Gene Center Munich, Deutschland (Konferenzteilnahme).

Publikationen:

7. M. Winnacker, S. Breeger, R. Strasser, and T. Carell, *ChemBioChem*, **2009**, *10* (1), 109-118. Novel Diazirine-Containing DNA Photoaffinity Probes for the Investigation of DNA-Protein-Interactions.
8. M. Winnacker, V. Welzmler, R. Strasser, and T. Carell, *ChemBiochem*, **2010**, *11* (10), 1345-1349. Development of a DNA Photoaffinity Probe for the Analysis of 8-OxodG-Binding Proteins in a Human Proteome.

1	Zusammenfassung	1
2	Summary.....	5
3	Einleitung.....	9
3.1	Struktur der DNA.....	9
3.2	Schädigung der DNA und deren Reparatur	10
3.3	Direkte Reparatur	14
3.3.1	CPD-Photolyase, (6-4)-Photolyase und Sporenphotoproduktlyase	14
3.3.2	Direkte Reparatur einer alkylierten DNA	16
3.4	Mismatch-Reparatur (MMR).....	17
3.5	Reparatur von Doppelstrangbrüchen- Rekombinationsreparatur	18
3.6	Basenexzisionsreparatur (BER).....	19
3.6.1	Allgemeines	19
3.6.2	Substrate für die BER.....	19
3.6.3	Mechanismus der BER.....	22
3.6.4	Enzyme der BER – DNA Glykosylasen.....	24
3.7	Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	31
3.7.1	Allgemeines	31
3.7.2	Krankheiten bedingt durch defekte NER	32
3.7.3	Substrate für die NER.....	33
3.7.4	Prokaryotische Nukleotidexzisionsreparatur	41
3.7.5	Eukaryotische Nukleotidexzisionsreparatur	44
4	Aufgabenstellung.....	54
5	Materialien und Methoden.....	55
5.1	Materialien	55
5.1.1	Chemikalien	55
5.1.2	Spezielle Anwendungen	55
5.1.3	Enzyme	56

5.1.4	Plasmide	56
5.1.5	Oligonukleotide	57
5.1.6	Bakterienstämme	58
5.1.7	Hefestämme	59
5.1.8	Geräte	59
5.1.9	DNA- und Proteinstandards	61
5.1.10	Puffer, Medien und Stammlösungen	62
5.1.11	Datenbanken und Programme	63
5.1.12	Bioinformatische Anwendungen	64
5.2	Mikrobiologische Methoden	66
5.2.1	Bakterienkulturen	66
5.2.2	Hefe – Kulturen	67
5.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	68
5.2.4	Transformation von Hefe	70
5.2.5	Induktion der Proteinexpression von Fpg in <i>E. coli</i>	72
5.2.6	Induktion der Proteinexpression von Rad14 in <i>E. coli</i>	73
5.2.7	Hefe Induktion	73
5.2.8	Aufschluss mit der French-Press	73
5.2.9	Aufschluss im Durchflusshomogenisator	74
5.2.10	Alternative Hefe-Aufschluss-Methoden	75
5.3	Molekularbiologische Methoden	76
5.3.1	DNA – Isolierung	76
5.3.2	DNA – Reinigung	81
5.3.3	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	84
5.3.4	PCR – Polymerase Ketten Reaktion	86
5.3.5	Bakterien PCR	89
5.3.6	Ortsspezifische Mutagenese	90
5.3.7	Gateway® - Technologie	91
5.3.8	Stargate® - Klonierung	95
5.3.9	Eukaryotische Proteinexpression mit <i>K. lactis</i>	96
5.4	Proteinchemische Methoden	97

5.4.1	SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese	97
5.4.2	Western – Blot – Analyse	99
5.4.3	Immunchemische Färbung für Proteine	100
5.4.4	Proteinquantifizierung	103
5.4.5	Proteinreinigung.....	104
5.5	Kristallisationsexperimente	111
5.5.1	Kristallisation des DNA bindenden Fragments von Rad14	111
5.5.2	Kristallisation der Formamidopyrimidin Glykosylase	112
5.6	Biochemische Methoden	112
5.6.1	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	112
5.6.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	113
5.6.3	Aktivitätsassays der Formamidopyrimidin Glykosylase.....	113
5.6.4	<i>Electromobility shift assays (EMSA)</i> mit Rad14	114
5.6.5	Fluoreszenz-Polarisationsmessungen.....	117
5.7	Analytische und Präparative Methoden	119
5.7.1	Messung der Schmelzpunktkurven von Oligonukleotiden	119
5.7.2	Tryptischer Peptidverdau.....	120
5.7.3	MALDI-TOF und LC-MS	122
5.8	Statistische Methoden	123
5.9	Synthese der DNA für Electromobility shift assays und Kristallisationen	123
6	Ergebnisse und Diskussion	125
6.1	Formamidopyrimidin Glykosylase (Fpg/MutM)	125
6.1.1	Allgemeines	125
6.1.2	Klonierung, Expression und Eigenschaften von Fpg (Wildtyp)	126
6.1.3	Aktivitätsstudien zu Fpg.....	130
6.1.4	Kristallisation und Diffraktion der Co-Kristalle von Fpg mit DNA.....	136
6.1.5	Strukturanalyse der Kristalle von Fpg mit DNA.....	140
6.1.6	Hypothetischer Mechanismus der Schadenserkennung durch Fpg.....	149
6.2	Die Proteine Rad4 und Rad23	153

6.3	Das Protein Rad14	155
6.3.1	Allgemeines	155
6.3.2	Fluoreszenz-Polarisationsmessungen von Rad14	162
6.3.3	<i>Elektromobility shift assays (EMSA)</i> von Rad14	165
6.4	Mechanismus der Schadenserkennung in der NER.....	178
7	Abkürzungsverzeichnis	182
8	Literaturverzeichnis	187
9	Anhang.....	207

1 Zusammenfassung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist Trägerin der genetischen Information. Ihre fehlerfreie Weitergabe ist notwendig, um das Überleben eines jeden Organismus zu sichern. Jedoch stellt sie ein ständiges Angriffsziel einer Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren dar. Um die genetische Integrität der DNA trotzdem aufrecht zu erhalten, haben sich verschiedene Wege der DNA-Reparatur ausgebildet. Aufgrund der Komplexität der DNA-Reparatur sind diese jedoch noch nicht komplett verstanden. Besonders im Bereich der Schadenserkennung werden momentan verschiedene Mechanismen diskutiert. Die Frage, wie geschädigte Basen aus einer Vielzahl ungeschädigter Basen spezifisch erkannt werden ist hierbei von zentraler Bedeutung. Störungen in dem Prozess der Reparatur/Schadenserkennung führen zur Entstehung von Krankheiten und Krebs. Somit ist ein genaues Verständnis der Mechanismen in der Schadenserkennung essentiell für die Entwicklung neuartiger und innovativer Medikamente im Bereich der Krebsforschung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Schadenserkennung der zwei wichtigsten DNA-Reparaturwege, der Nukleotidexzisionsreparatur und der Basenexzisionsreparatur, untersucht.

Die Basenexzisionsreparatur (*BER*) ist der wichtigste Reparaturpfad für die Detektion und Entfernung von Basen, die durch Oxidation, Alkylierung und Deaminierung geschädigt wurden, jedoch keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Struktur der Doppelhelix aufweisen. Initiiert wird die *BER* durch DNA-Glykosylasen, die die geschädigten Basen erkennen und entfernen. Der genaue Mechanismus, wie diese Glykosylasen geschädigte von ungeschädigten Basen unterscheiden können ist derzeit noch nicht völlig verstanden. Speziell 8-oxo-dG, das schwerwiegende Mutationen verursacht, unterscheidet sich nur um zwei Atome von seinem natürlichen Analogon und steht damit besonders im Fokus der Wissenschaft. In dieser Arbeit konnte erstmalig die Struktur einer *Wildtyp*-Formamidopyrimidin Glykosylase (Fpg/MutM) aus *Lactococcus lactis* in Komplex mit 8-oxo-dG geschädigter DNA

erhalten werden (Abbildung 1.1). Diese Struktur ist essentiell für die weitere Aufklärung der Schadenserkennung.

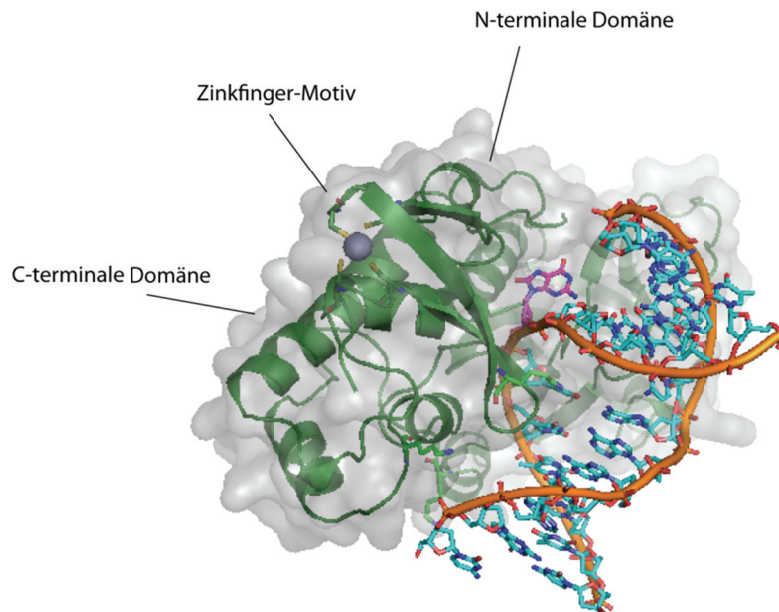
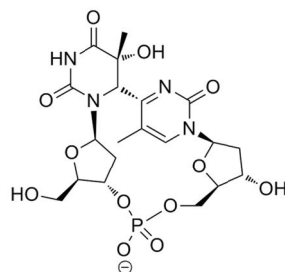


Abbildung 1.1: Kristallstruktur von Fpg (wt) mit c8-oxo-dG geschädigter DNA (ODN 9). Die Sekundärstruktur des Proteins ist als Bänderdarstellung in grün gezeigt und mit der semitransparenten Oberfläche überlagert. Das c8-oxo-dG wurde in rosa dargestellt und ist um 180° aus dem Doppelstrang herausgedreht. Das Zn²⁺-Atom ist als graue Kugel dargestellt.

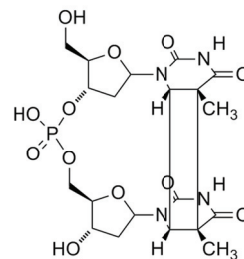
Bei Fpg handelt es sich um eine bifunktionelle Glykosylase der *H2TH*-Superfamilie, das ein Zinkfinger-Motiv (graue Kugel) in der C-terminalen Domäne und einen N-terminalen Prolinrest im aktiven Zentrum besitzt, der den nukleophilen Angriff auf das Substrat durchführt. In der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass sich die geschädigte Base (rosa) in einer extrahelikalen Position im aktiven Zentrum der Glykosylase befindet. Um weitere Informationen zu erhalten, wurden zusätzlich zu den kristallographischen Daten Aktivitätsassays mit verschiedenen DNA-Schäden durchgeführt. Aus den hier gewonnen Ergebnissen konnte die unterschiedliche Aktivität von Fpg gegenüber verschiedenen DNA-Schäden gezeigt und auf den Mechanismus der Diskriminierung zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA geschlossen werden. Demnach stellt die Protonierung der Base und elektronische Effekte ein entscheidendes Kriterium für die Unterscheidung dar. Durch die Spaltung der glykosidischen Bindung wird die Base in einem S_N1-

ähnlichen Mechanismus entfernt. Diese Ergebnisse tragen nun wesentlich zur Aufklärung der Schadenserkennung von Glykosylasen bei.

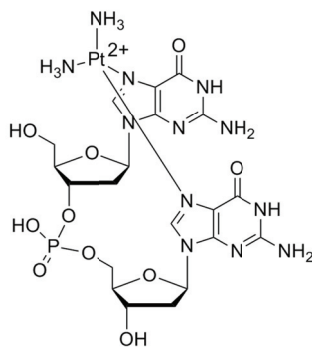
Im zweiten Teil der Arbeit wurde die primäre Schadenserkennung der Nukleotidexzisionsreparatur (*NER*) in *S. cerevisiae* genauer untersucht. Der generelle Mechanismus der *NER*, an der ca. 30 Proteine beteiligt sind, ist bekannt, jedoch fehlen auch hier genaue Informationen über das Zusammenspiel und das Bindungsverhalten, der an der Schadenserkennung beteiligten Proteine. Drei verschiedene Mechanismen der Schadenserkennung wurden vorgeschlagen, bei denen Rad4 bzw. Rad14 alleine oder in zufälliger Reihenfolge geschädigte DNA erkennen. In Abbildung 1.2 ist eine Übersicht aller in dieser Arbeit untersuchten Substrate der *NER* dargestellt.



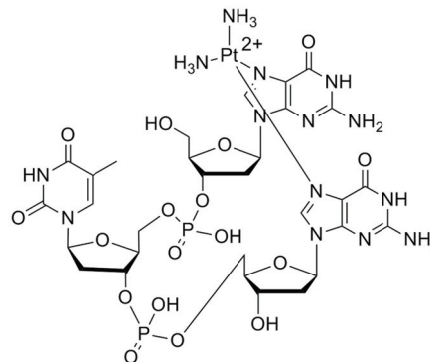
(6-4)-Photoprodukt



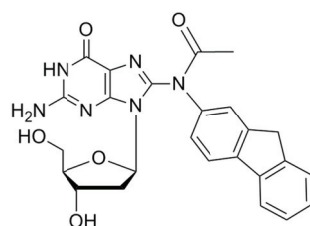
Cyclobutan Pyrimidin Dimer



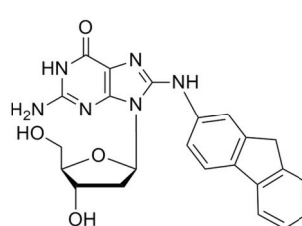
Cisplatin (GG-verbrückt)



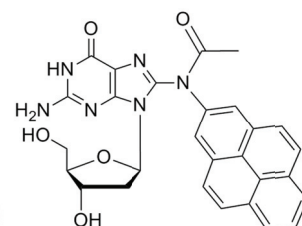
Cisplatin (GTG verbrückt)



Acetylaminofluoren-dG



Aminofluoren-dG



Acetylaminopyren-dG

Abbildung 1.2: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Substrate der *NER*.

Mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisationsmessungen, *Electromobility shift assays* und *Photoaffinity labeling* Experimenten konnten Details der Schadenserkennung von Rad14 aufgeklärt werden. Es zeigte sich, dass Rad14 eine besondere Affinität für große aromatische Kohlenwasserstoffe, sog. *bulky adducts*, wie z. B. Acetylaminofluoren aufweist. Aber auch Cisplatin-geschädigte DNA stellte ein gutes Substrat dar. Im Gegensatz dazu wurden UV-Schäden, oder Schäden, die die Duplexstruktur der DNA stark verzerren von Rad14 nicht erkannt. Die Bindungsaffinitätskonstante von Rad14 zu den *bulky adducts* liegt im nanomolaren Bereich. Um einen besseren Überblick über den Mechanismus der Schadenerkennung auf atomarer Ebene zu bekommen, wurden erste Experimente der Kristallisation einer verkürzten Form von Rad14 mit AAF-geschädigter DNA begonnen.

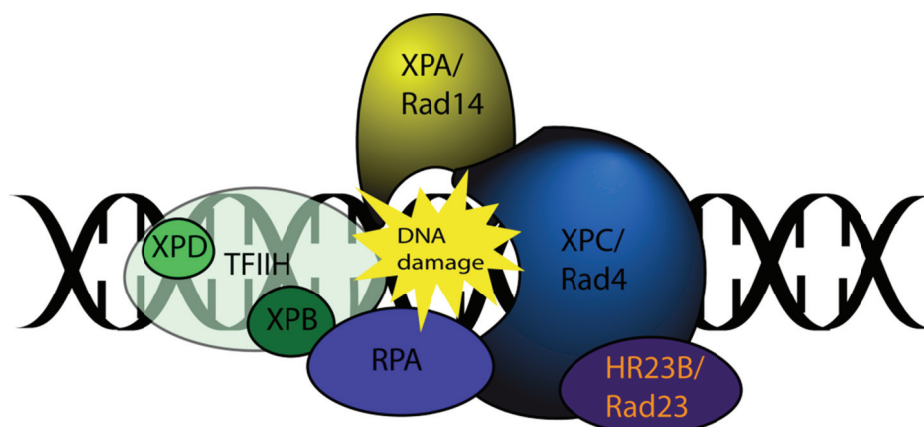


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der an der Schadenerkennung beteiligten Proteine.

In oben stehender Abbildung sind schematisch noch einmal alle, an der Schadenerkennung beteiligten Proteine aufgeführt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *NER* mit zwei gegensätzlichen Schadenserkennungsmechanismen arbeitet. Schadenserkennungssystem 1 benötigt Rad4 und detektiert verzerrte Duplexstrukturen. Schadenserkennungsmechanismus 2 beinhaltet Rad14 für die Bindung von großen Adduktschäden und Cisplatin. Die Schadenserkennung hängt demnach von der Art des zu reparierenden Schadens ab.

2 Summary

Deoxyribonucleic acid (DNA) is the carrier of the genetic information. By its error free passing the survival of an organism is secured. The DNA is, however, a constant target of a multitude of endogenous and exogenous agents. In order to keep the genetic integrity of the DNA, different ways of DNA repair have evolved. Due to its complexity, the mechanisms are not yet completely understood. Particularly in the field of damage recognition different mechanisms have been suggested. The question of how DNA lesions are effectively recognized in a vast expanse of normal DNA is of crucial importance. Disturbances during the process of damage recognition can lead to diseases and cancer. Thus, an exact understanding of the mechanisms of damage recognition is essential for the development of new and innovative drugs. The damage recognition mechanisms of the two most important DNA repair pathways, the base excision repair and the nucleotide excision repair are the subject of this thesis.

Base excision repair (*BER*) is the predominant pathway for coping with a broad range of small lesions resulting from oxidation, alkylation, and deamination which modify single bases without large effect on the double helix structure. It is initiated by DNA glycosylases which recognize and remove damaged bases. The accurate mechanism of how the DNA Glycosylases discriminate between damaged and undamaged bases is still not fully understood. Particularly 8-oxo-dG, a source for severe mutations, differs only by two atoms from its natural counterpart and is therefore of special interest. In this thesis the first time a crystal structure of a wildtype formamidopyrimidine glycosylase (Fpg/MutM) from *Lactococcus lactis* in complex with 8-oxo-dG damaged DNA could be obtained (Figure 2.1). This structure is essential for the further elucidation of damage recognition.

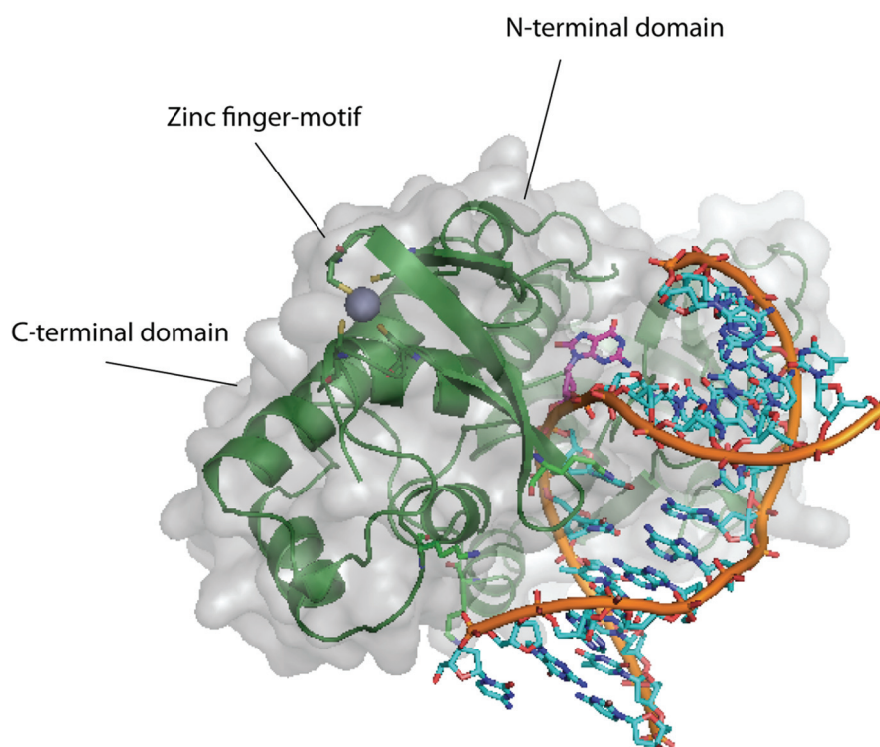


Figure 2.1: Crystal structure of *L/Fpg* (wt) with c8-oxo-dG damaged DNA (ODN **9**). The secondary structure of the protein is shown in a cartoon representation in green and a semitransparent protein surface was applied to the model. C8-oxo-dG is shown in pink and fixed in an extrahelical position. Zn^{2+} is shown as a grey ball.

Fpg is a bifunctional glycosylase of the *H2TH*-superfamily which possess a zinc finger motif (grey ball) in the C-terminal domain and an N-terminal prolin residue in the active site. This prolin performs the nucleophilic attack on the substrate. The crystal structure shows the damaged base in an extrahelical position in the active site of the glycosylase. To gain further information, activity assays with different DNA lesions were performed. These data show the diverse activity of Fpg to various DNA damages and how the mechanism of discrimination between damaged and undamaged DNA works. A crucial criterion for discrimination represents the protonation of the base and electronical effects. By cleaving the glycosidic bond, the damaged base will be removed in a $\text{S}_{\text{N}}1$ -like mechanism. These results represent an essential step in the understanding of DNA damage repair by glycosylases.

In a second part of the work, the primary damage recognition of nucleotide excision repair (*NER*) in *S. cerevisiae* was examined. Although the overall mechanism of *NER* is largely understood, details about the interaction and binding affinity damage recognition proteins is lacking. Three conflicting mechanisms have been proposed for the critical initial damage recognition step with either Rad4, Rad14, or both acting randomly as the primary lesion sensor. The following table shows all used DNA substrates.

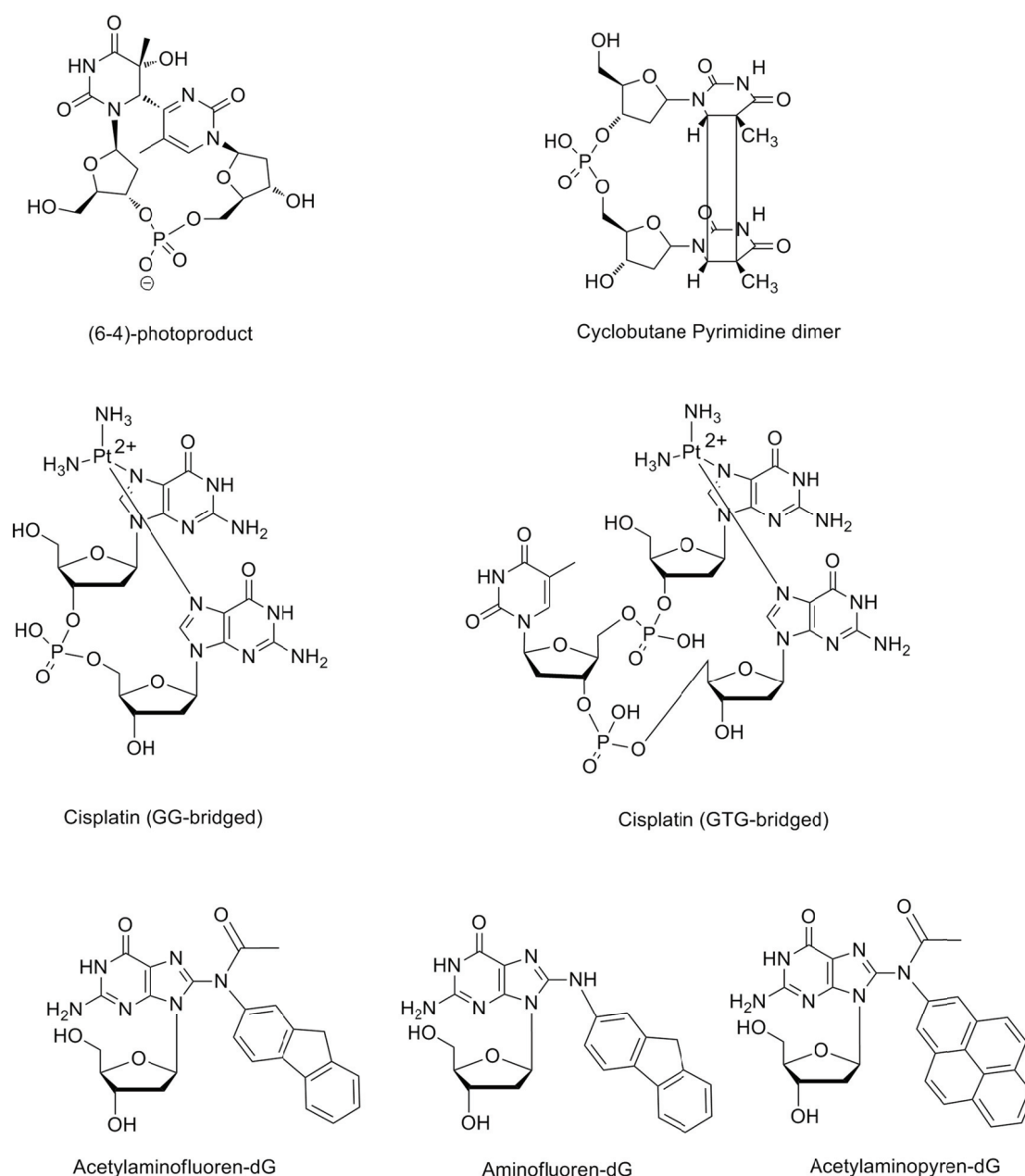


Figure 2.2: Overview of used substrates for *NER*.

Fluorescence polarization, electromobility shift assays and photoaffinity labeling experiments were used to examine details of the damage recognition of Rad14 with different DNA damages. It could be shown that Rad14 has a strong affinity to bulky adducts, for example acetylaminofluoren adducts. Additionally, cisplatin damaged DNA represents a good substrate. In contrast, different UV-lesions or lesions disturbing the duplex structure of the DNA were not recognized at all. The binding affinity constant of Rad14 to the bulky adducts was determined to be in the nanomolar range. Additionally, crystallization experiments of the DNA binding fragment of Rad14 were started in order to get an insight into the damage recognition process on an atomic level.

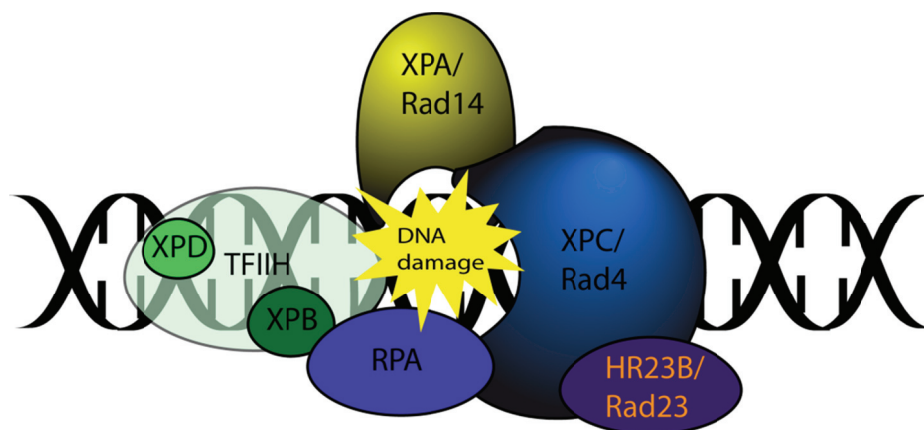


Figure 2.3: Schematic representation of the damage recognition proteins.

The upper figure represents a schematic view of the all proteins participating in damage recognition. This thesis shows that *NER* possesses two complementary operating lesion detections systems. Lesion detection system 1 requires Rad4/XPC. It detects disrupted duplex structures. Lesion detection system 2 involves Rad14/XPA for the binding of bulky adducts generated by reaction of metabolically activated aromatic compounds. These data demonstrates that *NER* lesion recognition depends critically on the type of lesion, which needs to be repaired.

3 Einleitung

3.1 Struktur der DNA

“We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.“ Bei diesem Zitat handelt es sich um die ersten beiden Sätze einer der denkwürdigsten Publikationen zu Beginn der Forschung im Bereich der Nukleinsäuren. Der Artikel mit dem Namen „Molecular Structure of Nucleic acids: A structure for deoxynucleic acid“ wurde von *J. D. Watson* und *F. H. C. Crick* in *Nature* im Jahre 1953 veröffentlicht und beschreibt die doppelhelikale Struktur der DNA basierend auf Röntgen-diffraktogrammen von *M. Wilkins* und *R. Franklin*.^[1] Das DNA-Molekül besteht aus den vier Nukleobasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), die über ein Rückgrat aus 2-Desoxyribose und Phosphodiestergruppen zu einer linearen Kette aufgereiht und über spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zu einem zweiten DNA-Strang verbunden sind. Dabei kommt es stets zu einer Paarung von A mit T bzw. G mit C (Abbildung 3.1 **a**), wobei die Abfolge der Nukleobasen die Erbinformation kodiert. Unter physiologischen Bedingungen dominiert die rechtsgängige B-Form der DNA-Doppelhelix, zusätzlich besteht die Möglichkeit der Ausbildung einer A- und Z-Form. Während es sich bei der A-Form ebenfalls um eine rechtsgängige Helix handelt, welche jedoch eine engere und tiefere große Furche aufweist, so liegt in der Z-Form eine linksgängige Helix vor. Diese tritt besonders bei GC-reichen Abschnitten auf. 2005 wurde eine Kristallstruktur der Z-DNA in Verbindung mit der B-DNA veröffentlicht und somit auf eine biologische Aktivität der Z-DNA hingewiesen.^[2] Regionen in der Nähe des Startpunkts der Transkription weisen häufig Sequenzmotive für die Ausbildung einer Z-DNA auf. Das Auftreten der Z-DNA in der Nähe der Promoterregionen führt zu einer Stimulation der Transkription. In Abbildung 3.1 (**b**) ist die doppelhelikale Struktur der B-DNA abgebildet. Die Helix besitzt einen Durchmesser von 2 nm und eine vollständige Drehung wird nach 10 Basen erreicht. Die Abfolge von 3 Nukleobasen bestimmt den degenerierten genetischen Code für die Aminosäuren.

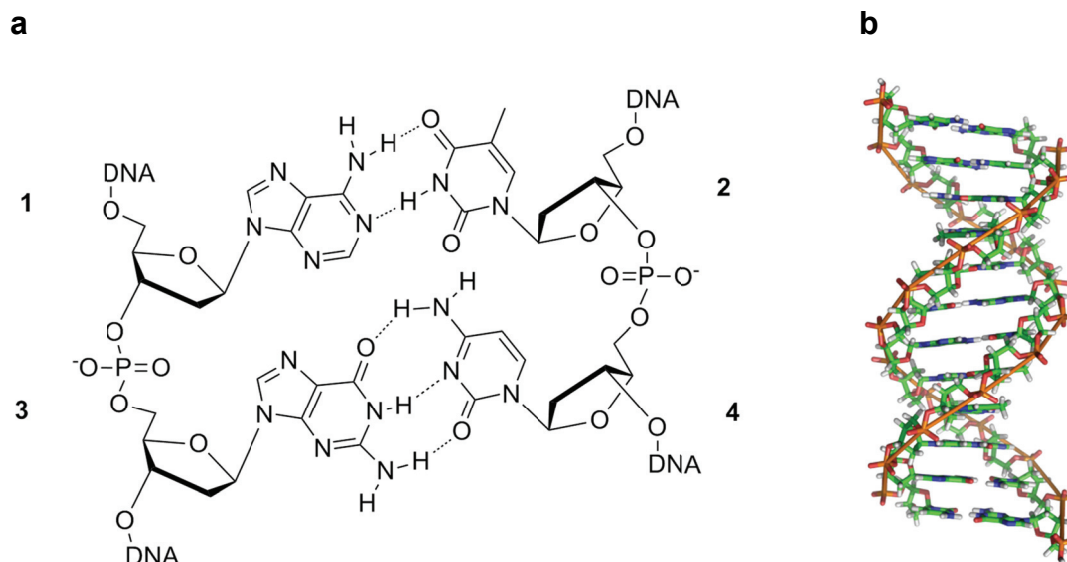


Abbildung 3.1 (a) Ausschnitt eines DNA Moleküls mit *Watson-Crick*-Basenpaarung. Die Purinbasen Adenin **1** und Guanin **3** paaren mit den Pyrimidinbasen Thymin **2** und Cytosin **4**. Die gebildete Doppelhelix aus zwei antiparallelen Strängen wird durch Wasserstoffbrücken und π -Stapelwechselwirkungen der Basen zusammen gehalten. (b) Doppelhelikale Struktur der DNA (B-Form).

3.2 Schädigung der DNA und deren Reparatur

Da die DNA mit zahlreichen Molekülen in zellulärer Umgebung reagieren kann, kommt es zu ungefähr 50000 DNA Schäden pro Tag in einer menschlichen Zelle.^[3] Bei 37°C, der Temperatur, bei der sich eine menschliche Zelle entwickelt, kommt es beispielsweise zu einem Verlust von ca. 18000 Purinen pro Zelle und Tag durch eine Hydrolyse der Bindung zwischen der Base und dem Phosphatrückgrat.^[4] Eine weitere Quelle genetischer Veränderungen unter physiologischen Bedingungen ist die Transformation von Thymin zu Uracil durch Desaminierung. Dieser Prozess findet 100 bis 500 Mal in jeder menschlichen Zelle pro Tag statt. Wie man hier eindrucksvoll sieht, gibt es eine enorme Anzahl an DNA-Schäden, die nicht nur durch spontane Reaktionen entstehen, sondern auch durch äußere Einflüsse verursacht werden können. Dabei unterscheidet man zwischen Schäden an den Nukleobasen und Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Veränderungen an der Struktur der

DNA können sich auf die Paarungseigenschaften der Basen auswirken oder dazu führen, dass die Information der DNA nicht mehr ausgelesen werden kann. In beiden Fällen kommt es zum Verlust der genomischen Integrität. Endogene und exogene Agenzien verursachen derartige Veränderungen. Endogene Agenzien sind stoffwechsel-bedingte, reaktive Metabolite wie *reactive oxygen species* (ROS) oder *reactive nitrogen species* (RNS). Zu den exogenen Agenzien hingegen, zählen eine Vielzahl an Chemikalien (z.B. polyzyklische aromatische und nicht aromatische Kohlenwasserstoffe und alkylierende Reagenzien), sowie radioaktive- und UV-Strahlung. Durch diese Substanzen entstehen mutagene und zytotoxische Schäden, die zu einer fehlerhaften Transkription bzw. Replikation führen können. Im schlimmsten Fall kommen diese zum vollständigen Erliegen. Kann dies durch die zelleigenen Reparaturmechanismen nicht behoben werden, wird der Zelltod eingeleitet. In Abbildung 3.2 sind alle Klassen DNA-schädigender Substanzen, mit den daraus resultierenden Schäden und den möglichen Reparatursystemen aufgeführt.

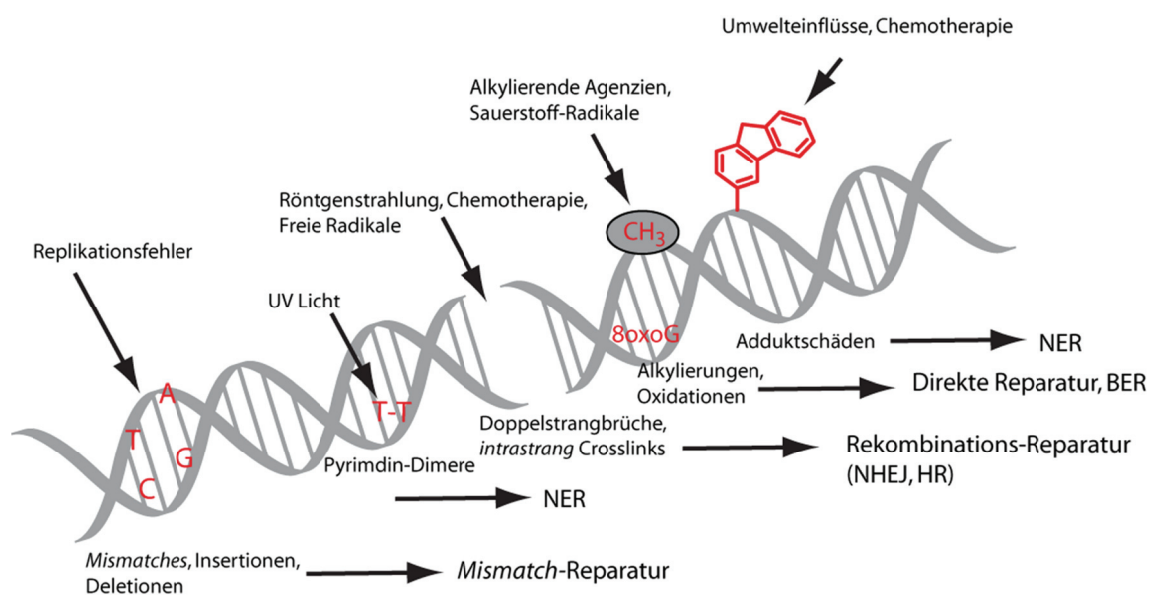


Abbildung 3.2: Darstellung der verschiedenen exogenen und endogenen Einflüsse auf die DNA, die damit verbundenen DNA Schäden und die zelleigenen Reparatursysteme.

Ebenso führen Punktmutationen zur Schädigung einer Zelle. Hierbei ist eine einzelne Nukleobase zuviel oder zuwenig eingebaut oder gegen eine andere

ausgetauscht worden, wobei die Basen chemisch unverändert bleiben. Durch die Degeneration des genetischen Codes kann eine Punktmutation vergleichsweise harmlos ausfallen, besonders wenn es sich um eine *wobble* Base handelt. Der allgemeinen Hypothese für *wobble* Paarungen zufolge, entsteht die Basen-Paarung zwischen dem Codon-Triplett der mRNA und dem Anticodon-Triplett der tRNA nur bei der 1. und 2. Base der mRNA durch eine feste Wasserstoffbrückenbindung. Die Bindung der 3. Base ist schwächer und kann auch zu sogenannten Nicht-Watson-Crick-Paarungen führen. Damit diese Paarungen möglich sind, müssen die Basen aus ihrer Position am Ribosom während der Translation „herauswackeln“. Diese Paarungen werden deshalb als *wobble*-Paarungen bezeichnet. In den anderen und damit schwerwiegenderen Fällen besteht jedoch die Möglichkeit einer Leseraster-Verschiebung (*frameshift mutation*), die durch Insertionen oder Deletionen auftreten. Hierbei baut die Polymerase während der Replikation zu viele Basen in die Sequenz ein, oder es kommt zum Verlust einzelner Basen. Folgedessen kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Synthese eines unter Umständen verkürzten oder defekten Proteins. Zwar handelt es sich bei diesen Veränderungen nicht um eine chemische Modifikation der DNA, doch können diese Veränderungen eine große Schädigung der Zelle hervorrufen.

In Abbildung 3.2 sind auch die verschiedenen Reparatursysteme aufgeführt, die die DNA Schäden beheben können. Bei Betrachtung des großen Spektrums an schädigenden Substanzen ist es kaum verwunderlich, dass sich eine große Vielfalt an unterschiedlichen Reparatursystemen entwickelt hat. Im Rahmen einer generellen biologischen Antwort haben sich neben den Reparaturmechanismen auch gewisse Toleranzmechanismen ausgebildet, die das Überleben einer Zelle/Organismus sichern. Zum einen wird geschädigte DNA durch Direkte Reparatur, Basenexzisionsreparatur (*BER*), Nukleotid-exzisionsreparatur (*NER*), *Mismatch* Reparatur und Einzel-/Doppelstrangbruchreparatur behoben, auf welche in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen wird. Bei den Toleranzmechanismen hingegen handelt es sich um *Translesion DNA synthesis*, *Postreplicative gap filling* und *Replication fork progression* (siehe Abbildung 3.3). Ferner kann eine Zelle aber auch die Schädigung während des Zellzykluses durch den *cell cycle checkpoint*

control kontrollieren. Bevor die nächste Phase betreten wird, kommt es am Ende jeder Phase zu einer abschließenden Kontrolle. Wurde durch Sensoren ein DNA-Schaden entdeckt, so wird die Zellteilung unterbrochen bis der Schaden behoben ist. Bei einer zu großen Schädigung der Zelle wird der Weg des programmierten Zelltods (Apoptose) beschritten.

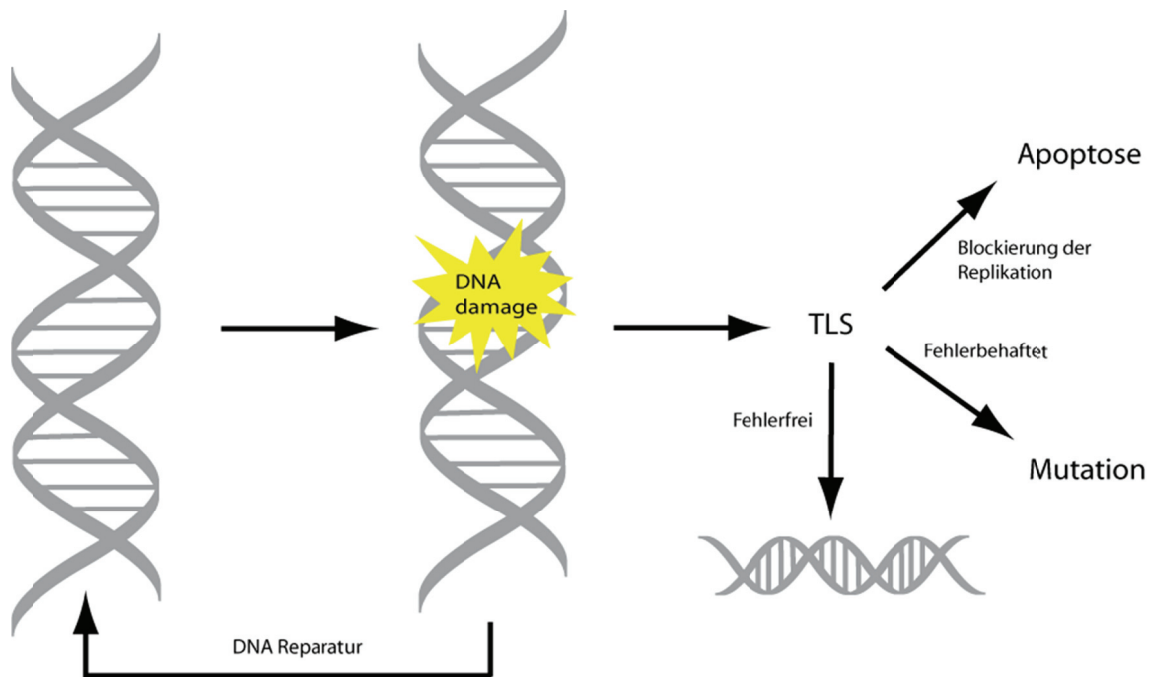


Abbildung 3.3: Schematische Übersicht zur biologischen Antwort auf DNA Schäden. TLS: Translesion synthesis.

Um die große Anzahl unterschiedlicher Schäden zu detektieren liegt den DNA-Reparaturenzymen ein komplizierter Mechanismus der Schadenserkennung zu Grunde. Dabei stellen sich zwei Fragen: Wie wird der Schaden in der großen Anzahl ungeschädigter Nukleobasen lokalisiert? Und welche Elemente oder funktionellen Gruppen der Schäden werden durch die Reparaturenzyme erkannt? Im Folgenden werden die unterschiedlichen Reparaturwege genauer erklärt, wobei ein Hauptaugenmerk auf der Schadenserkennung und dem Mechanismus der Reparatur liegt.

3.3 Direkte Reparatur

Im einfachsten Fall kann ein entstandener DNA-Schaden durch direkte Reparatur in einem einfachen enzymatischen Prozess wieder in seine Ursprungsform überführt werden. Aufgrund der großen chemischen Vielfalt von DNA Schäden ist diese Form der Reparatur in der Evolution jedoch durch komplexere Systeme ergänzt, bzw. ersetzt worden. Im Folgenden werden die bekanntesten Reparaturenzyme der direkten Reparatur vorgestellt.

3.3.1 CPD-Photolyase, (6-4)-Photolyase und Sporenphotoproduktlyase

DNA Photolyasen verwenden die Energie des Lichts, um durch UV-Strahlung geschädigte DNA, wie Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD) oder (6-4)-Photoprodukte ((6-4)PP) (siehe auch 3.7.3.1) zu reparieren.^[17] Die Sporenphotoproduktlyase hingegen arbeitet bei der Entfernung von Sporenphotoschäden unter Ausschluss von Licht. 2004 wurde von Mitarbeitern des *AK Carell* die Co-Kristallstruktur einer Photolyase aus *A. nidulans* in Komplex mit CPD geschädigter DNA veröffentlicht.^[18] Während der Reparatur wurde der DNA Strang durch das Enzym um 50° gebogen, der Dimerschaden in das aktive Zentrum um 180° gedreht und dort durch Synchrotron-Strahlung bei 100K in zwei Thyminen gespalten. In Abbildung 3.4 (a) ist die Co-Kristallstruktur einer CPD-Photolyase in Komplex mit CPD geschädigter DNA dargestellt. Alle bekannten CPD-Photolyasen enthalten FAD in stöchiometrischen Mengen als Cofaktor.^[19] Der zweite Cofaktor kann 8-HDF (8-Hydroxy-10-(*D*-Ribo-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl-5-deazaalloxazin) oder das Pterin MTHF (5,10-Methenyl-tetrahydrofolat) sein. Der Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase ist weitest gehend biochemisch untersucht worden.^[20]

Im Jahre 2008 gelang es wiederum Mitarbeitern des *AK Carell* die Co-Kristallstruktur einer (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* in Komplex mit einem definierten T(6-4)T-Schaden zu lösen.^[21] Die Struktur zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu den bereits bekannten Strukturen aus der Familie der

Photolyasen und Cryptochrome (Abbildung 3.4 **b**). Die N-terminale α/β -Domäne ist über einen interdomänen *Loop* mit der C-terminalen, FAD-bindenden, helikalen Domäne verbunden. Zudem öffnet die (6-4)-Photolyase, wie auch die CPD-Photolyase, während der Schadenserkennung die DNA vollständig und das Dimer wird um fast 180° in die aktive Tasche des Enzyms gedreht (*dinucleotide-flipping*). Aus weiteren Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf das Vorhandensein eines bisher vermuteten Oxetanintermediates während der Reparatur. Der neu postulierte Mechanismus eines radikalischen Pyrimidin C5-Intermediates, wurde durch Reparatorexperimente von U(6-4)T geschädigter DNA gestützt.^[22] Dabei zeigte sich wie erwartet, eine deutlich verringerte Reparatur des U(6-4)T Schadens im Vergleich zum T(6-4)T Schaden.^[21]

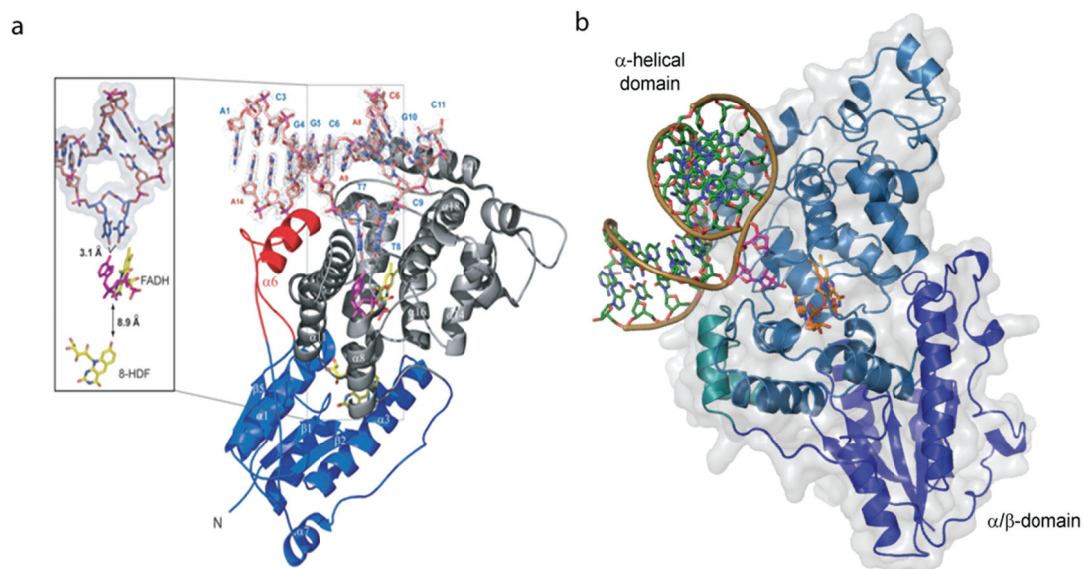


Abbildung 3.4: Kristallstrukturen zweier Photolyasen. **(a)** Struktur der CPD-Photolyase aus *A. nidulans* in Komplex mit CPD enthaltender DNA. Das CPD-Dimer ist in Blau dargestellt. Die vorstehende α_6 -Helix (rot) kontaktiert die DNA und die Co-Faktoren sind in gelb dargestellt.^[18] **(b)** Struktur der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* mit einem T(6-4)T-Schaden. Die N-terminale Domäne ist dunkelblau und die katalytische α -helikale Domäne ist in hellblau dargestellt. Über das Protein wurde eine semitransparente Proteinoberfläche gelegt. Der FAD und der F_0 Cofaktor sind in gelb bzw. pink abgebildet.^[23]

Die Struktur und der genaue Mechanismus der Sporenphotoproduktlyase, die für die Entfernung des Sporenphotoprodukts verantwortlich ist, bleibt Gegenstand der Forschung.^[24]

3.3.2 Direkte Reparatur einer alkylierten DNA

Neben den in dem vorangehenden Kapitel besprochenen Photolyasen, die in einer enzymatischen Einschrittreaktion verschiedene Photoprodukte entfernen, gibt es eine zweite Form der direkten Reparatur und Entfernung von mindestens vier Typen alkylierter DNA (3-Methyladenin, O⁶-Methylguanin, 1-Methyladenin und Methyl-FaPyG). Alkylierende Agenzien können verschiedene Schäden an den heterozyklischen Basen oder dem Rückgrat der DNA hervorrufen, welche für die Zelle toxisch und mutagen sind. Bei diesen Molekülen handelt es sich um exogene oder endogene Stoffe, wie z.B. S-Adenosylmethionin, das ein Methyl donor für viele zelluläre Prozesse ist, aber auch Methylierungsschäden hervorrufen kann.^[25] Die meisten dieser alkylierten Nukleobasen werden durch direkte Reparatur mittels folgender Enzyme entfernt: die N-terminale Domäne des *E. coli* Ada Proteins, die Familie der O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferasen und die AlkB Familie.^[26] Bisher konnten 9 humane AlkB Homologe identifiziert werden.^[27] Es entwickelten sich zwei verschiedene Strategien, um die Alkylierung zu beheben. In einer einstufigen Reaktion wird die Methylgruppe auf einen internen Cystein-Rest der Alkyltransferase übertragen, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (*Suizid*-Enzym). Neben Methylgruppen können auch länger-kettige Alkylgruppen auf dieses Reparaturprotein übertragen werden, wobei die Effizienz mit zunehmender Länge des Alkylrestes abnimmt. Zum anderen benutzt AlkB einen ähnlichen Mechanismus wie Eisen-abhängige Oxygenasen, nämlich Eisen-Oxo-Intermediate, um chemisch wenig reaktive Addukte oxidieren zu können.^[28]

3.4 Mismatch-Reparatur (MMR)

Die DNA-Mismatch-Reparatur ist verantwortlich für das Entfernen von Basenfehlpaarungen, die durch Desaminierung, Oxidation, Methylierung und Replikationsfehlern während der DNA Replikation und Rekombination entstehen können. Da das *proofreading* nicht absolut fehlerfrei arbeitet, kommt es mit einer Fehlerhäufigkeit von 10^{-7} pro Basenpaar und Replikation zu fehlgepaarten Basen. Diese Fehler werden nun durch die Mismatch-Reparatur behoben. Die Fehlerrate während der Replikation wird dadurch um den Faktor 50-1000 erniedrigt.^[5] Aber auch Basenpaaranomalien, die von einem DNA Schaden herrühren, werden durch MMR repariert. Dazu zählen O⁶-Methylguanin,^[6] 8-Oxoguanin,^[7] Karzinogene Addukte,^[8] UV-Photoprodukte^[9] und Cisplatin-Addukte.^[10]

In gram-negativen Bakterien (z. B. *E. coli*) erfolgt die Diskriminierung zwischen dem Parental- und Tochterstrang über das Methylierungsmuster der DNA.^[11] Methyltransferasen, wie z. B. die Desoxyadenine Methyltransferase (DAM) addieren eine Methylgruppe an das N6 Atom des Adenins in d(GATC). In Folge dessen liegt der Templatstrang methyliert vor, während der Tochterstrang unmethyliert bleibt.^[12] Somit kann zwischen den verschiedenen Generationen der DNA Population unterschieden werden. In *E. coli* sind die Proteine MutS, MutH und MutL maßgeblich an der MMR beteiligt. Der initiale Schritt in der Erkennung von fehlgepaarten, aber chemisch intakten Basen erfolgt durch das MutS-Homodimer über das ATP-abhängig MutL rekrutiert wird. Nach Bildung des *Repairosoms* schneidet MutH an der 5'-Position einer unmethylierten d(GATC)-Sequenz.^[13] An dieser Stelle binden anschließend die DNA Helikase II (UvrD) und verschiedene Endonukleasen (ExoVIII, RecJ oder ExoI), die den Strang über die ungepaarte Stelle hinaus abbauen. Der somit entstandene Einzelstrang wird durch SSB Proteine stabilisiert und durch die DNA Polymerase III wieder aufgefüllt. Die entstandene Lücke wird in Folge durch die DNA Ligase wieder geschlossen.^[14, 15] Durch die Strukturaufklärung des MutS/MuS α -DNA Komplexes wurde gezeigt, dass die fehlgepaarten Basen direkt im DNA-Duplex erkannt werden.^[16] Die verstärkte Deformation der DNA aufgrund der Schwächung der Watson-Crick-Basenpaarung in Fehlpaarungen

stellt einen Teil des Erkennungsmechanismus dar. Die Schadenserkennung bei der eukaryotischen *MMR* wird durch Proteine vollzogen, die zu den bakteriellen Homolog sind. Vor allem aber kommt es zu einer Detektion eines Knicks in der DNA, wobei noch nicht alle Fragen geklärt werden konnten.

3.5 Reparatur von Doppelstrangbrüchen- Rekombinationsreparatur

Vor allem Chemotherapeutika, endogene Agenzien oder auch ionisierende Strahlung rufen häufig Doppelstrangbrüche hervor.^[29] Diese können zu chromosomalen Aberrationen oder zu Apoptose führen. In einer eukaryotischen Zelle kann bereits ein einziger, nicht reparierter Doppelstrangbruch eines entscheidenden Gens den Zelltod durch Apoptose induzieren, oder bei Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus zur fehlerhaften Bildung der Tochterchromatiden führen. Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen sind bisher zwei Mechanismen bekannt, zum einen die *Homologe Rekombination (HR)* und zum anderen das *Non Homologous End Joining (NHEJ)*. Das *NHEJ* stellt bei eukaryotischen Zellen den entscheidenden Reparaturmechanismus für mitotisch teilende Zellen dar, um mögliche Chromosomentranslokationen, -deletionen und Genamplifikationen zu verhindern, wohingegen in Hefen die *HR* dominiert. Das *NHEJ* ligiert zwei Enden eines Doppelstrangbruchs, ohne dass eine Sequenzhomologie bestehen muss. Die *HR* nimmt in höheren Eukaryoten eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen während der Meiose ein. Hierbei tritt das geschädigte Chromosom mit der sequenzhomologen ungeschädigten DNA in Kontakt, die als Matrize für die Reparatur dient.^[30]

3.6 Basenexzisionsreparatur (BER)

3.6.1 Allgemeines

Die Basenexzisionsreparatur (*BER*) ist der wichtigste Reparaturmechanismus für die Entfernung und Korrektur von geschädigten Einzelbasen in der DNA.^[31] Sie ist unter anderem verantwortlich für die Reparatur von oxidativ geschädigten Basen, wie sie durch reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) gebildet werden. Diese entstehen durch entzündliche Prozesse in der Zelle, ionisierende Strahlung, langwelliges UV-Licht oder während der Atmungskette in den Mitochondrien. Hierbei fallen als Nebenprodukte der Sauerstoffreduktion Wasserstoffperoxid, Superoxidradikal-anionen und Hydroxylradikale an. Aber auch alkylierte Einzelbasen sind Substrate für die *BER*. Initiiert wird die *BER* durch DNA-Glykosylasen, einer Klasse von Enzymen, die geschädigte DNA-Basen erkennen und diese durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung entfernen. Beim Menschen sind bisher 11 verschiedene Glykosylasen bekannt, die sich durch ihre hohe Spezifität auszeichnen.^[32]

3.6.2 Substrate für die BER

Die oxidative Schädigung der DNA und die damit einhergehenden chemischen Veränderungen der Nukleobasen sind nicht nur bei der Tumorgenese oder beim Alterungsprozeß, sondern auch bei verschiedenen Entzündungsprozessen der Zelle von Bedeutung.^[33] Basenschädigungen, DNA-Protein-*crosslinks* und Oxidationen an den Desoxyriboseeinheiten, die zu Strangbrüchen führen, sind hauptsächliche Typen von oxidativen Schäden.^[34] Insgesamt sind bislang etwa 100 oxidativ erzeugte DNA Schäden bekannt.^[35] Aufgrund des geringsten Redoxpotentials von Guanin unter den natürlichen Basen, ist diese Nukleobase am leichtesten oxidierbar. Dies führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher oxidierten Guaninbasen (GO).^[36] Aber auch die oxidative Schädigung der anderen Basen ist möglich, jedoch spielen sie eine

untergeordnete Rolle. Bevorzugter Angriffspunkt von Oxidationsmitteln ist das 5'-Guanin in einem entsprechenden GG-Sequenzkontext, da das Redoxpotential von direkt benachbarten Guaninbasen aufgrund der π -Basenstapelung in einem Duplex weiter reduziert wird. Die meisten oxidativen dG-Schäden führen zu Mutationen, da sie bei der DNA-Replikation Fehlinserktionen durch die Polymerasen verursachen.

Der wichtigste Schaden, das 8-Oxo-7,8-dihydrodesoxyguanin (8-oxo-dG) entsteht durch eine Ein-Elektronenoxidation von Guanin. Die Anwesenheit von 8-oxo-dG wird oft als zellulärer Biomarker verwendet, um den Status von oxidativem Stress aufzuzeigen.^[37] In einer normalen Zelle entstehen ca. 1000-2000 8-oxo-dG-Schäden pro Tag, während in einer Krebszelle bis zu 100000 Läsionen entstehen.^[38] Das mutagene Potential resultiert daraus, dass 8-oxo-dG sowohl in der *syn*-, als auch in der *anti*-Konformation vorliegen kann. In der *anti*-Konformation formt es, genau wie Guanin, mit Cytosin ein nicht mutagenes *Watson-Crick*-Basenpaar (Abbildung 3.5 a).^[39] Die *syn*-Konformation jedoch, in der die Base um 180° um die glykosydische Bindung verdreht ist, stellt das energetische Minimum des freien 8-oxo-dG dar.^[40] In dieser Konformation präsentiert die geschädigte Base das O6 und die gegenüberliegende Base N7H für die Wasserstoffbrückenbindung. Es kommt zu einer Bildung eines *Hoogsteen*-Basenpaars. Hier ahmt 8-oxo-dG die Base Thymin nach, was zu Guanin-Thymin-Transversionen führt. Diese beiden Möglichkeiten sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

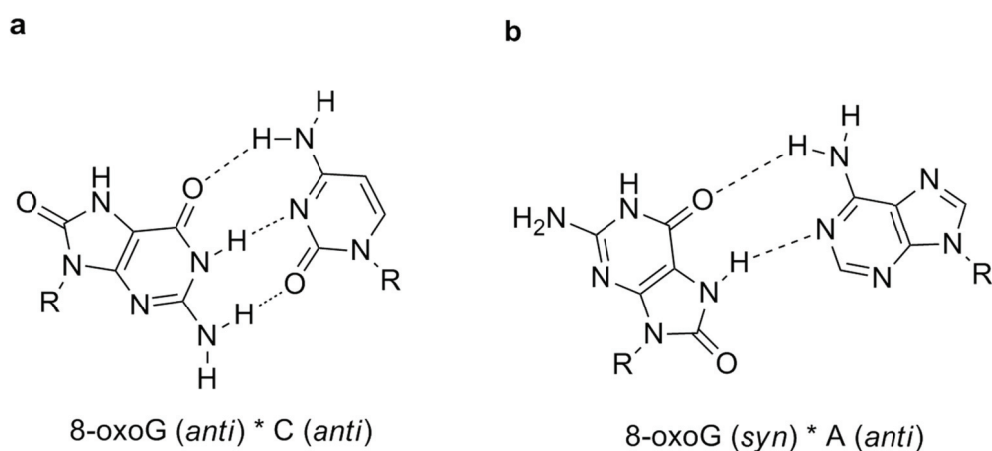


Abbildung 3.5: Mögliche Basenpaarungen von 8-oxoG. (a) Gegenüberstellung der *Watson-Crick*-Basenpaarung von 8-oxoG*C und (b) der *Hoogsteen*-Basenpaarung von 8-oxoG*A.

Befindet sich 8-oxo-dG während der Replikation im Templatstrang, wird sowohl dCTP, als auch dATP durch die jeweilige Polymerase eingebaut.^[41] Die *high fidelity B. stearothermophilus* Polymerase I insertiert bevorzugt dATP gegenüber 8-oxo-dG. Da bei korrektem Einbau eines dC und der Bildung eines *Watson-Crick*-Basenpaares es zu einer sterischen Behinderung zwischen C8=O und dem Zucker-Phosphatrückgrat kommt, rotiert 8-oxo-dG in die *anti*-Konformation. Dadurch wird ein *Hoogsteen*-Basenpaar aus 8-oxo-dG:dA gebildet, welches keiner sterischen Behinderung unterliegt. Die Rotationsfähigkeit von 8-oxo-dG ist daher die Grundlage für das hohe Mutationspotenital dieses Schadens.^[42] Die T7 Polymerase, eine weitere *high fidelity* Polymerase und Polymerase β , eine *error-prone* Polymerase, bauen im Gegensatz zu *BstPoll* dCTP gegenüber 8-oxo-dG ein. Dies ist möglich, da die DNA im aktiven Zentrum einen stärkeren Knick erfährt und dadurch sterische Behinderungen minimiert werden. Durch eine stärkere Stabilisierung der *anti*-Konformation im aktiven Zentrum von Dpo4, einer *low fidelity* Polymerase, kommt es zu einem Einbau von dCTP gegenüber 8-oxo-dG und somit zu keiner Mutation.^[42] Somit vollziehen einige Polymerasen eine *Translesion synthesis* in dessen Folge es zu keiner schädlichen Mutation kommt.

Neben der bereits beschriebenen Entstehung von 8-oxo-dG gibt es ein weiteres wichtiges Oxidationsprodukt von Guanin, das Formamidopyrimidin-2'-desoxyguanosin (FaPydG) (Abbildung 3.6). FaPydG und dessen Derivate werden durch Hydroxylradikale gebildet, welche durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen zellulär gebildet werden.^[43] Aufgrund der langen Lebensdauer von $^1\text{O}_2$ in Zellen ist die Bedeutung von Singulärem Sauerstoff für die Oxidation erheblich,^[44] da dieser größtenteils an Guanin und dessen Oxidationsprodukten angreift.^[45] Dabei entsteht in einer [4+2]-Cycloaddition zunächst ein zyklisches Endoperoxid, welches in einer Reaktionskaskade zu zwei weiteren wichtigen Oxidationsprodukten, dem Guanidinohydantoin (Gh) und Spiroiminohydantoin (Sp) reagiert (Abbildung 3.6).

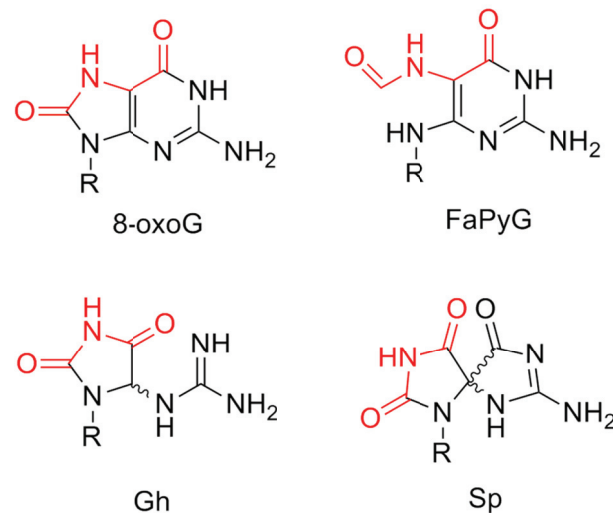


Abbildung 3.6: Verschiedene Oxidationsprodukte von Guanin. Dargestellt sind das 8-oxoG und das ihm verwandte Formamidopyrimidin-2'-guanosin (FaPyG), sowie die beiden Hydantoine Guanidinohydantoin (Gh) und Spiroiminohydantoin (Sp). Die ähnlichen Strukturelemente sind rot markiert.

3.6.3 Mechanismus der BER

DNA Glykosylasen sind verantwortlich für die initiale Erkennung des Schadens. Sie drehen die geschädigte Base aus der Doppelhelix um 180° (*base flipping*), schneiden die N-glykosidische Bindung und hinterlassen eine abasische Seite. Es gibt zwei Kategorien von Glykosylasen, die bezüglich ihrem Reaktionsmechanismus in mono- und bifunktionell eingeteilt werden. Monofunktionelle Glykosylasen führen einen nukleophilen Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom mit einem aktivierten Wassermolekül aus, in dessen Folge eine freie Base, sowie eine abasische Stelle im Strang entstehen. Eine *Apurinic/aprimidinic* Endonuklease (AP Endonuklease, human: Ape1) hydrolysiert anschließend die 5'-Phosphodiesterbindung, um ein DNA-Intermediat zu generieren, welches einen Einzelstrangbruch mit einem 3'-Hydroxyl- und 5'-Deoxyribose-5-Phosphat-Ende (5'-dRP) enthält. Im Gegensatz dazu sind bifunktionelle Glykosylasen in der Lage beide Schritte durchzuführen.^[32] Die weitere Reparatur geschieht in zwei unterschiedlichen Wegen, dem *Short-Patch*- und *Long-Patch*-Pfad, welche durch teilweise

unterschiedliche Enzyme durchgeführt werden. Hierbei wird entweder nur ein Nukleotid (*Short-Patch-BER*) oder es werden zwei bis acht Nukleotide (*Long-Patch-BER*) ausgetauscht. In der humanen *Short-Patch-BER* wird der 5'-dRp Schnitt durch die duale Lyase- (dRpase) und Polymerase-Aktivität der Polymerase β katalysiert. Anschließend wird durch die DNA Ligase I die Reparatur vervollständigt. Die *Long-Patch-BER* beinhaltet den Austausch und die Reparatur von mindestens zwei Nukleotiden, wobei bei diesem Mechanismus die 5'-dRp-Stelle als ein Teil des *flap*-Strukturelements durch die FEN1-Endonuklease geschnitten wird.^[46] Die dabei involvierte Polymerase konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Möglicherweise können sowohl die Polymerase β , als auch die Polymerasen δ und ϵ beteiligt sein. Anschließend kommt es auch hierbei zur Ligation durch die DNA Ligase I. Die Wahl des Reparaturpfades ist im Moment Gegenstand der Diskussion und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Falls das dRp-Intermediat durch die dRpase Aktivität der Polymerase β effizient entfernt werden kann, wird der Weg der *Short-Patch-BER* beschritten. Sofern die Prozessierung des dRp-Rests, wie im Falle der Reparatur einer reduzierten AP-Stelle, nicht effizient ablaufen kann, kommt es zur *Long-Patch-BER*. Aber ebenso beeinflussen die Art des Schadens, der momentane Zustand des Zellzyklus und ob sich die Zelle differenziert oder bereits teilt die Entscheidung bei der Wahl des Reparaturweges. In nachfolgender Abbildung sind die beiden Wege schematisch dargestellt.

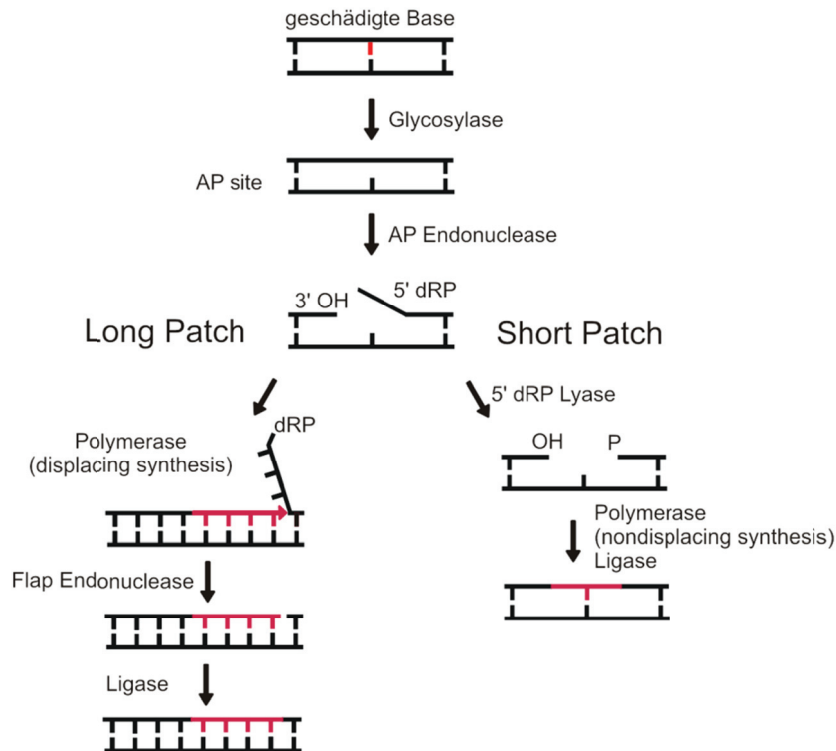


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des *Long-Patch*- und *Short-Patch*-Reparaturweges während der *BER*.

3.6.4 Enzyme der *BER* – DNA Glykosylasen

Mittlerweile sind 5 verschiedene Superfamilien von Glykosylasen bekannt.^[47] Die *helix-hairpin-helix* (*HhH*) und *helix-two-turn-helix* (*H2TH*) Superfamilien wurde nach diesen bestimmten konservierten Strukturmotiven benannt. Enzyme der *HhH*-Superfamilie besitzen einen Glycin-, Valin- oder Prolinreichen *Loop*, auf den ein katalytisch aktiver Aspartat-Rest folgt. Die beiden Domänen dieser Glykosylasen bestehen hauptsächlich aus α -Helices, wobei auch einige dieser Enzyme über zusätzliche Domänen oder Kofaktoren (z. B. einem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster) verfügen.^[31] Zu dieser Familie gehören bakterielle (*E. coli* Nth) und eukaryotische Glykosylasen (hOGG1).

Die N-terminale Domäne einer *H2TH* DNA Glykosylase formt ein β -Sandwich Strukturmotiv mit einer α -Helix, die das katalytisch aktive Prolin trägt. Die C-

terminale Domäne ist aus zwei α -Helices und zwei β -Faltblattstrukturen aufgebaut, die ein Zink-Finger-Motiv ausbilden.^[48] Diese beiden Domänen sind über ein flexibles Scharnier verbunden. Zu dieser Superfamilie gehören u.a. Nei und MutM/Fpg (siehe Kapitel 3.6.4.1). Bei der dritten und vierten Klasse der DNA Glykosylasen handelt es sich um die Alkyladenin DNA Glykosylase (Aag) und Uracil DNA Glykosylase (Udg), die nach den bekannten humanen Glykosylasen benannt wurden. Uracil DNA Glykosylasen sind monofunktionelle Enzyme, welche für das Erkennen und Entfernen von Uracil in DNA verantwortlich sind. Udg schneidet Uracil aus Einzel- und Doppelsträngiger DNA und ist komplett inaktiv gegenüber natürlichen Pyrimidinen in DNA und Uracil in RNA.^[49] Uracil tritt in DNA durch Desaminierung von Cytosin oder fälschlicherweise engebautes dUTP auf. Die Superfamilie schließt mindestens fünf Gruppen unterschiedlicher Enzyme mit ähnlicher Substratspezifität ein. Alle Uracil Glykosylasen sind um ein zentrales paralleles 4-faches β -Faltblatt organisiert, welches von mindestens zwei α -Helices auf jeder Seite eingeschlossen ist. *Loops* verbinden diese Elemente, tragen die aktiven Aminosäuren und bilden die Schadens-erkennende Tasche aus. Neu entdeckt wurde die Familie der die *HEAT-like repeat (HLR)* DNA Glykosylasen, die ausschließlich aus α -Helices in einer selenoidähnlichen Superhelix-Struktur aufgebaut sind. Diese Glykosylasen wurden bisher nur in Prokaryoten gefunden und hydrolysieren die N-glykosidische Bindung in CPD.^[50]

3.6.4.1 Formamidopyrimidin Glykosylase (Fpg/MutM) und die Suche nach dem Schaden

Bei der Formamidopyrimidin DNA Glykosylase (Fpg/MutM) handelt es sich um eine bifunktionelle Glykosylase der *H2TH* Superfamilie. Es ist ein ca. 30 kDa schweres Enzym mit einem Zinkfinger-Motiv und einem N-terminalen Prolinrest im aktiven Zentrum, der den nukleophilen Angriff auf das Substrat durchführt. Die Kristallstruktur von Fpg aus *T. thermophilus* zeigt, dass das Protein aus zwei globulären Domänen besteht, die über ein flexibles Scharnier verbunden sind, sowie zwei DNA Bindungsstellen besitzt.^[48] MutM bildet mit MutY (entfernt Adenin aus einer 8-oxo-dG:dA Fehlpaarung) und MutT (entfernt dOGTP) das als „GO“-System bekannte bakterielle Schutzsystem gegen genotoxische

Effekte von oxidativen Guaninschäden. Bei dem humanen funktionellen Homologen von Fpg handelt es sich um hOGG1, welche strukturell unterschiedlich sind, aber durch einen ähnlichen Mechanismus eine große Vielzahl gemeinsamer Substrate aufweisen. In Abbildung 3.8 sind die wichtigsten oxidierten Produkte zu sehen, die als Substrate für Fpg/MutM identifiziert wurden.^[51]

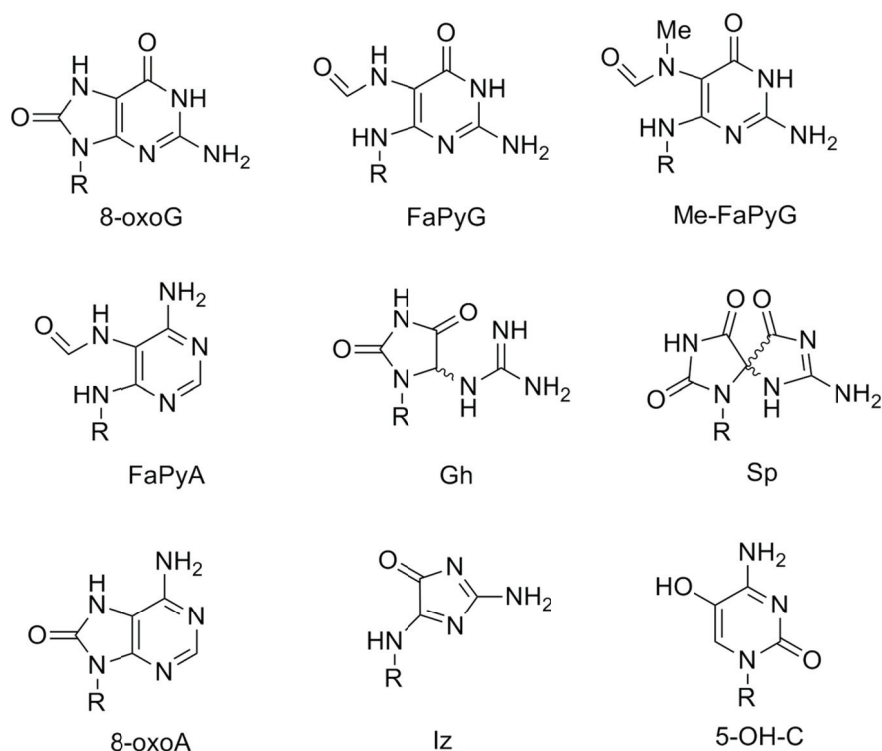


Abbildung 3.8: Zusammenstellung der wichtigsten Substrate von Fpg/MutM. 8-oxoG: 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin; FaPyG: Formamidopyrimidin-2'-guanosin; Me-FaPyG: 7-Methyl-Formamido-pyrimidin-2'-guanosin; FaPyA: Formamidopyrimidin-2'-adenosin; Gh: Guandinohydantoin (Gh); Sp: Spiroiminohydantoin; 8-oxoA: 8-Oxo-7,8-dihydroadenosin; Iz: Imidazolon; 5-OH-C: 5-Hydroxy-cytosin.

Die Identifikation einer geschädigten Einzelbase unter Millionen von ungeschädigten Basen gleicht der Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen. Fraglich ist, wie ein Enzym eine geschädigte Base erkennen kann, die sich nur minimal von ungeschädigten Basen unterscheidet und von sehr vielen ungeschädigten Basen umgeben ist. Einer allgemeinen Hypothese nach identifizieren DNA Reparaturenzyme Schäden durch eindimensionale

Diffusionsmodelle.^[52] Genauer gesagt kann man das Problem der Schadenserkennung in zwei Bereiche einteilen:

1. Dynamische Erkennung (Wie findet das Enzym die ungeschädigte Base im Genom?)
2. Statische Erkennung (Wie wird der identifizierte Schaden als Michaelis-Menten-Komplex in dem aktiven Zentrum stabilisiert?)

Für hOGG1 wurde ein Mechanismus für die Schadenserkennung postuliert, der beide Bereiche vereint. Hierzu muss jede Base in die aktive Tasche geklappt werden, unabhängig davon ob sie geschädigt ist oder nicht. Dieses Konzept wird durch die experimentelle Analyse der Bindungswinkel in hOGG1 mit geschädigter und ungeschädigter DNA unterstützt.^[53, 54] Dieses Modell kann jedoch nicht als universell angesehen werden, da z. B. Purinbasen nicht in die aktive Tasche der Uracil DNA Glykosylase geklappt werden können.^[55] Zusätzlich erklärt es nicht die Erkennung und das selektive Herausschneiden der natürlichen Base Adenin durch MutY.^[56] Bei einem weiteren vorgeschlagenen Mechanismus handelt es sich um einen „*direct readout*“, bei dem geschädigte Nukleobasen durch Wasserstoffbrücken-bindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen in der großen oder kleinen Furche dynamisch detektiert werden. Anschließend kommt es zu einem *flip-out* der geschädigten Base und zu deren Entfernung. Dieser Mechanismus ist sowohl mit, als auch ohne statischer Erkennung möglich. Der „*indirect readout*“ hingegen beschreibt ein Erkennungsmodell, das nicht auf gebildete Wasserstoffbrücken-bindungen zu den geschädigten Basen basiert, sondern thermodynamische Instabilitäten an der geschädigten Seite erkennt. Beide Mechanismen implizieren jedoch eine „Prä“-aktive Seite, die mit der geschädigten Base in Wechselwirkung tritt, bevor sie in das aktive Zentrum geklappt wird. Aufgrund der Tatsache, dass 8-oxo-dG sowohl ein thermodynamisch stabiles *Watson-Crick*-Basenpaar mit dC, als auch ein ebenso stabiles *Hoogsteen* Basenpaar mit dA ausbilden kann, wurde eine dynamische Erkennung mit einem „*direct readout*“ postuliert. Jedoch bleibt die Frage unbeantwortet, ob Glykosylasen zur Detektion geschädigter Basen jede Base aus der DNA herausklappen, oder nur bestimmte. Dagegen spricht der

hohe energetische Aufwand verbunden mit diesem Detektionsprozess. Abgesehen davon müsste der Mechanismus sehr schnell ablaufen, da das gesamte Genom untersucht werden muss. Hier liegt die Vermutung nahe, dass dieser Prozess ungenau ist. Als Lösung dieses Problems wurde eine wiederholte Untersuchung der DNA ohne Verbrauch von chemischer Energie durch das Enzym postuliert.^[57] Dieser schnelle Suchprozess konnte kürzlich durch Einzelmolekülmessungen von hOGG1 an einem ungeschädigten DNA-Duplex visualisiert werden. Es wurde gezeigt, dass hOGG1 mit einer Diffusionsgeschwindigkeit nahe der theoretisch möglichen Geschwindigkeit für eindimensionale Diffusion über die DNA gleitet. Dies hat zur Folge, dass Millionen von Basen pro Sekunde untersucht werden.^[58]

Für Fpg, das funktionelle Homolog von hOGG1 in Bakterien, wurde ein anderer Mechanismus der Schadenserkennung postuliert, der noch einige Schwachstellen aufweist. In einem ersten Schritt bindet Fpg unspezifisch an die DNA Doppelhelix und bewegt sich entlang dieser. Möglicherweise wird dabei ein Phenylalaninrest (Phe114), gleich einer Sonde, zwischen die Basenpaare eingeführt, in dessen Folge die Doppelhelix stark gekrümmt wird und so Instabilitäten detektiert werden könnten.^[57] Trifft das Enzym nun auf eine geschädigte Nukleobase, so wird diese aus der Doppelhelix herausgeklappt und in einer extrahelikalen Position in dem aktiven Zentrum des Enzyms stabilisiert. In dieser Position liegt der C1-Kohlenstoff der Ribose frei vor und kann durch das N-terminale Pro2 nukleophil angegriffen werden (siehe Abbildung 3.9 a). Die im Doppelstrang entstandene Lücke wird durch die hydrophobe Seitenkette von Phenylalanin (Phe114) gefüllt. Die verbliebene Gegenbase wechselwirkt über Wasserstoffbrückenbindungen mit Arginin (Arg112). Aus der herausgeklappten 2'-Desoxyribose und dem sekundären Stickstoff des Pro2 bildet sich eine Schiff'sche Base, die durch Reaktion des Intermediats mit Natriumborhydrid nachgewiesen werden konnte.^[39] Anschließend wird durch Glu6 ein Wassermolekül deprotoniert, das die Ribose wiederum deprotoniert und es zu einer Umlagerung einer Doppelbindung kommt (β -Eliminierung, b). Dies hat eine Spaltung der 3'-Phosphodiesterbindung zur Folge (c). Als letzten Schritt folgt eine δ -Eliminierung durch eine Deprotonierung mit Glu3 und einer anschließenden

Spaltung der 5'-Phosphodiesterbindung, unter Verlust eines Moleküls 4-Oxo-2-pentenal.^[59] Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Glu3, ebenso wie bei Pro2 um essentielle Aminosäuren, deren Mutation einen kompletten Verlust der Aktivität von Fpg zur Folge hätte. Um ein Herausschneiden der Base zu verhindern, kommt in Kristallisationsexperimenten häufig die E3Q-oder ΔP2-Variante von Fpg zum Einsatz.

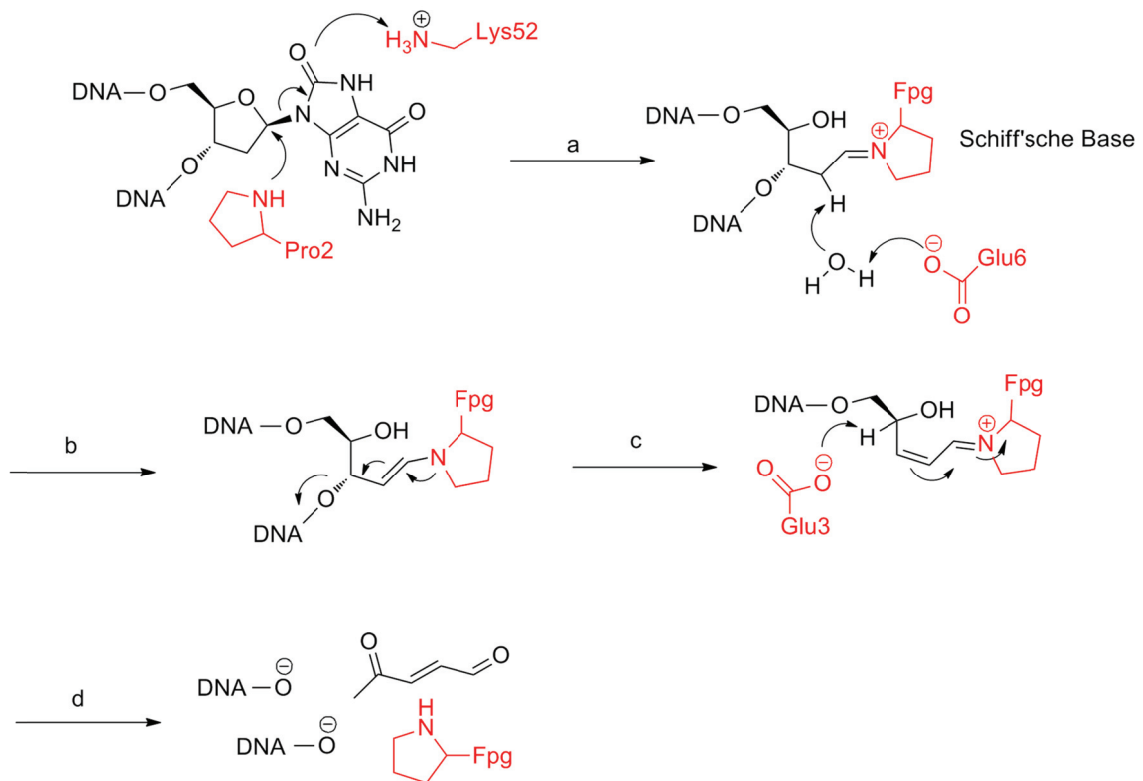


Abbildung 3.9: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus von Fpg; die beteiligten Aminosäuren sind in rot dargestellt. **(a)** Nukleophiler Angriff des Pro2 auf C1 der Ribose unter Abspaltung der geschädigten Base. **(b)** β-Eliminierung und Spaltung der Phosphodiesterbindung. **(c)** Abspaltung des Zuckers. **(d)** δ-Eliminierung unter Freisetzung von 4-Oxo-2-pentenal und Spaltung der Phosphodiesterbindung.

Um den genauen Mechanismus der Schadenserkenkung von Fpg aufzuklären, besonders wie es zu einer Diskriminierung zwischen geschädigten und ungeschädigten Basen kommt, ist neben weiteren biochemischen Experimenten auch eine Co-Kristallstruktur mit geschädigter und ungeschädigter DNA nötig. Um die katalytische Aktivität des Enzyms während

der Dauer der Kristallbildung zu unterdrücken, wurden verschiedene Ansätze verwendet. Einerseits können inaktive Mutanten von Fpg benutzt werden, bei denen entweder Pro2 mutiert ($\Delta 2P$),^[60] oder andererseits Glu3 gegen ein Glutamin ausgetauscht worden war (E3Q).^[57] Diese Mutationen haben zur Folge, dass Fpg die geschädigte DNA zwar bindet, aber nicht prozessieren kann. Die E3Q-Variante wurde von *Verdine et al.* verwendet, jedoch muss in diesem Fall das Protein zusätzlich an die DNA fixiert werden. Erreicht wurde dies durch die *disulfide cross-linking* (DXL) Methode, bei der neu geschaffene Cysteinreste im Bereich des aktiven Zentrums im Enzym mit Thiolresten in der DNA Disulfidbrücken ausbilden können. Die neu gebildeten Cysteinreste sind in Abbildung 3.10 in grün dargestellt.



Abbildung 3.10: Struktur des Schadenserkennenden Komplexes von MutM (*B. stearothermophilus*, dunkelrot) gebunden an 8-oxo-dG geschädigte DNA (gold). Die neu geschaffenen Cystein-Reste sind in grün dargestellt.^[57]

Die Verwendung von mutierten Enzymen, besonders Veränderungen im Bereich des aktiven Zentrums können Artefakte zur Folge haben, die zu einer veränderten Schadenserkenung führen. Aus diesem Grund wurden im *AK Carell* inerte Substrate entwickelt, die dem natürlichen Schaden möglichst genau gleichen und durch das Enzym zwar erkannt, jedoch nicht repariert werden können. Bei diesen Substraten handelt es sich um carbozyklische Analoga der oxidativen Schäden, bei denen der Ringsauerstoff des Zuckers gegen einen Kohlenstoff ausgetauscht wurde. Dies hat zur Folge, dass die Elektrophilie des C1 gesenkt wurde und es zu keinem nukleophilen Angriff des

Stickstoffs von Pro2 mehr kommen kann. Somit bleibt die Ausbildung der Schiff'schen Base verwehrt und die geschädigte Nukleobase verweilt im aktiven Zentrum des Enzyms, kann aber nicht prozessiert werden. Dadurch werden mögliche strukturelle Veränderungen durch Mutationen im aktiven Zentrum des Enzyms vermieden. In Abbildung 3.11 ist das natürliche 8-oxo-dG und sein carbozyklisches Analogon zu sehen. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Ribose keinen zellulären oder biochemischen Einfluss hat.^[61]

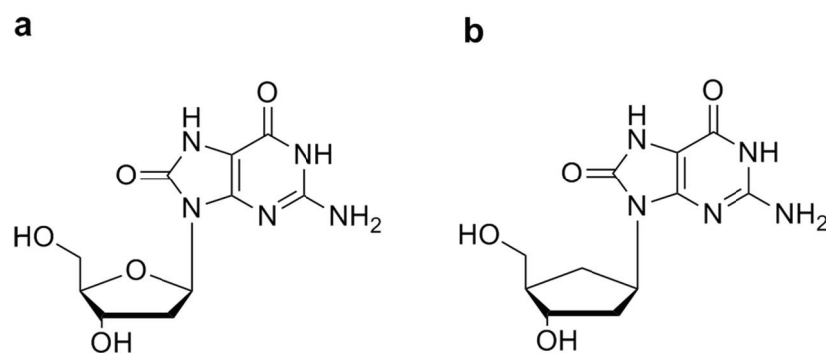


Abbildung 3.11: Das natürliche 8-oxo-dG (a) und das carbozyklische Analogon (b).

3.7 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

3.7.1 Allgemeines

In den letzten Jahren wurde durch die Medien vermehrt auf das Schicksal der Mondscheinkinder hingewiesen. Es handelt sich dabei um Kinder, die von einem seltenen genetischen Defekt betroffen sind und um der schnellen Entstehung von Hautkrebs entgegen zu wirken, jegliche Exposition von Sonnenlicht vermeiden müssen. Diese Kinder leiden unter *Xeroderma Pigmentosum* (XP, auch *Melanosis lenticularis progressiva* oder

Mondscheinkrankheit genannt), das durch einen Defekt in der Nukleotidexzisionsreparatur entsteht. Durch den Defekt kommt es aber nicht nur zu *Xeroderma Pigmentosum*, sondern es entstehen zwei weitere Krankheiten, das sogenannte *Cockayne Syndrom* und *Trichothiodystrophie*, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll.

3.7.2 Krankheiten bedingt durch defekte NER

3.7.2.1 *Xeroderma Pigmentosum*

Xeroderma Pigmentosum wurde zwischen 1874 und 1883 das erste Mal von den Dermatologen *Kaposi* und *von Hebra* erwähnt, als sie die beobachteten Symptome ihrer Patienten beschrieben.^[62, 63] Die Patienten wiesen gegenüber einem gesunden Menschen eine extreme Sensitivität gegenüber dem Sonnenlicht auf und waren einem 1000-fach höherem Hautkrebsrisiko ausgesetzt. 1932 entdeckte *de Sanctis*, dass *XP* auch mit neuronalen Dysfunktionen in Zusammenhang steht.^[64] In ca. 18 % der Fälle sind die Symptome mit einer primären neuronalen Degeneration und dem Verlust von Neuronen gekoppelt.^[65] Erste Tumore entstehen bereits in einem mittleren Alter von 8 Jahren und ohne Behandlung überleben die Patienten ihr erstes Lebensjahrzehnt nicht. *XP* kann zur Zeit nicht geheilt werden, aber durch systematische Abschirmung der Patienten vor Sonnenlicht und anderen schädlichen Einflüssen kann die Lebenserwartung auf ca. 20 Jahre erhöht werden.^[66] In den westlichen Ländern betrifft *XP* einen von 250000 Menschen, in Afrika und Japan ist es einer von 40000.^[67] Verschiedene Komplementationsgruppen, die nach den jeweiligen inaktiven Proteinen benannt wurden untergliedern die Formen von *XP* in A bis G. Die schwerste Form, bzw. der schwerste Ausprägungsgrad ist *XP-A*. In diesem Fall ist die Funktion des schadenserkennenden Proteins XPA gestört. Die leichteste Form stellt *XP-F/G* dar.

3.7.2.2 Cockayne Syndrom

Eine zweite Funktionsstörung wurde 1936 von *Edward Alfred Cockayne* mit UV-Sensitivität in Verbindung gebracht und nach seinem Entdecker als *Cockayne Syndrom* (auch *Weber-Cockayne-Syndrom* oder *Neill-Dingwall-Syndrom* genannt) bezeichnet.^[68] Es handelt sich hierbei um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch einen Defekt in der Transkriptions gekoppelten Reparatur (*TCR*) bedingt ist, an dem die Proteine CSA und CSB beteiligt sind.^[69] Interessanterweise zeigen die Patienten keine klare Veranlagung für die Entwicklung von Hautkrebs und auch die globale Genomreparatur (*GGR*) funktioniert einwandfrei. CS-Patienten weisen jedoch folgende Symptome auf: Verlangsamte körperliche und geistige Entwicklung, schwere neurologische Anomalitäten sowie Gesichtsfehlbildungen. Die Lebenserwartung liegt bei ca. 6-12 Jahren, wobei der Tod meistens durch vorzeitige Aterienverkalkung eintritt.^[70]

3.7.2.3 Trichothiodystrophie

Trichothiodystrophie (auch *IBIDS*, *Tay-Syndrom* oder *sulfur-deficient brittle hair* genannt) wurde 1971 von *Tay* zum ersten Mal beschrieben.^[71] Es handelt sich hierbei um eine autosomal-rezessive Krankheit, die mit Mutationen in der *TCR*, namentlich in den Proteinen XPB, XPD und TTDA, einhergeht. Patienten weisen kurzes brüchiges Haar, retardiertes Wachstum, Minderbegabung und Nagelanomalien auf.^[72, 73]

3.7.3 Substrate für die NER

Eine erstaunliche Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden wird durch die *NER* erkannt und repariert. Dazu gehören sowohl ein- als auch mehrbasige Läsionen, die durch UV-Strahlung oder chemisch reaktive Moleküle gebildet werden. In Abbildung 3.12 ist eine Übersicht aller in dieser Arbeit untersuchten Substrate der *NER* dargestellt.

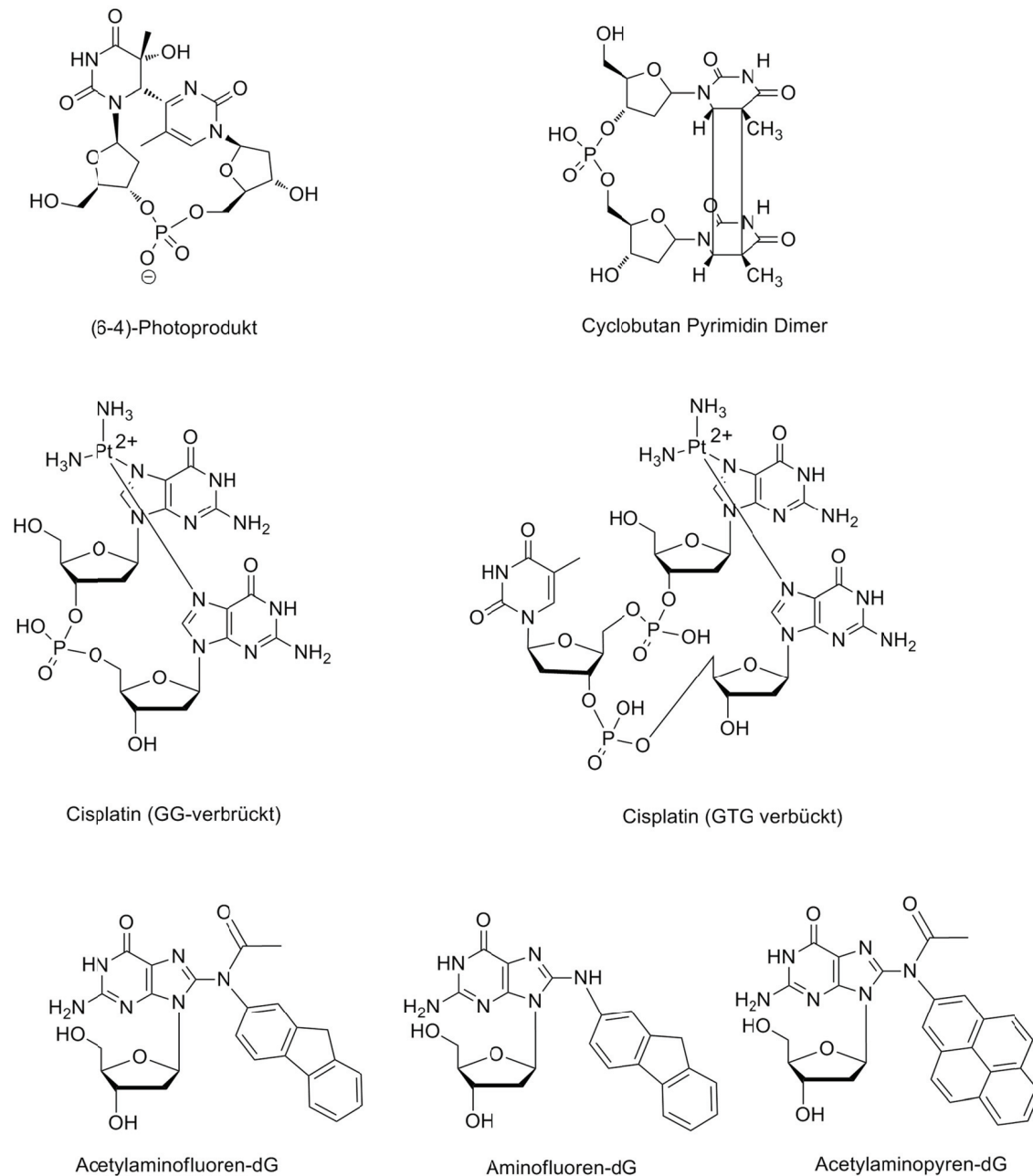


Abbildung 3.12: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Substrate der *NER*.

3.7.3.1 UV-Licht induzierte Schäden

Unter den Anteilen des Sonnenlichts, die unsere Atmosphäre durchdringen hat das energiereiche UV-Licht das höchste mutagene Potenzial. Das UV-Spektrum ist in drei Wellenlängenbereiche aufgeteilt: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) und UVC (200-290 nm). Unter ihnen sind die kurzwelligen UV-Bereiche (UVC) die Energiereichsten/Schädlichsten, die aber durch die

Ozonschicht größtenteils herausgefiltert werden.^[74] Die Bildung von DNA-Photoprodukten in menschlichen Hautzellen geschieht maximal bis zu einer Wellenlänge von 300 nm, welche mit dem Absorptionsspektrum der bedeutendsten DNA-Chromophoren korreliert (Thymin, Cytosin und 5-Methylcytosin). Prokaryoten und viele Eukaryoten können UV-Schäden sowohl durch *NER*, als auch durch spezifische Photolyasen entfernen (siehe Kapitel 3.3.1).^[75] Allerdings besitzen Menschen keine Photolyasen als Alternative zu der *NER*, so dass UV-Schäden nur durch *NER* repariert werden können.^[76]

Bei den wichtigsten UV-induzierten DNA-Schäden handelt es sich um Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), T(6-4)T-Photoprodukte, Dewar Photoprodukte und Sporenphotoprodukte. Die eigentliche Photoreaktion der Basen kann aus angeregten Singulett- oder Triplettzuständen erfolgen,^[77] wobei fast alle UV-Schäden zwischen benachbarten Pyrimidinbasen gebildet werden.^[78] Addukte zwischen Purinbasen bzw. Pyrimidin- und Purinbasen sind kaum bekannt und wenig untersucht, auch die Anzahl an Pyrimidinmonoaddukten ist ebenfalls sehr gering.^[79] Die Photoreaktionen sind extrem abhängig vom umgebenden Milieu^[80,81] (pH-Wert, Trockenheit, Photosensitizern, Salzen, usw.), so dass die Anzahl und Art der entstehenden Pyrimidindimere sich weiterhin im Fokus der Wissenschaft befinden.

3.7.3.1.1 Cyclobutan Pyrimidin Dimere

Das häufigste und am besten charakterisierte Photoprodukt ist der Cyclobutan Pyrimidin Dimer Schaden (CPD). Er entsteht durch eine $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition aus dem angeregten Triplettzustand der C5-C6-Doppelbindung benachbarter Pyrimidinbasen. Da Thymin die niedrigste Triplettenergie aufweist, stellt es den besten Akzeptor beim Energietransfer innerhalb der DNA dar.^[82] Diese chemische Eigenschaft führt theoretisch zu einer häufigeren Bildung von Thymidindimeren als Cytosindimeren, was auch durch experimentelle Untersuchungen bestätigt wurde. Dabei kam es zu einer Häufigkeitsverteilung der Photodimeren: $T=T > T=C > C=T > C=C$.^[83] Da jedoch festgestellt wurde, dass die $C \rightarrow T$ Transversion die häufigste Mutation bei der Replikation von Photodimeren ist, sagt diese Häufigkeitsverteilung jedoch nichts über die

biologische Relevanz aus.^[84-87] Für diesen beobachteten Effekt gibt es zwei mögliche Gründe. Zum einen findet die Desaminierung von C zu U im Photodimer viel schneller statt, als die Desaminierung eines C oder m⁵C, was auf den Verlust der Ringaromatizität zurückzuführen ist. Die Desaminierung findet *in vivo* innerhalb eines Tages statt^[88, 89] und steht in zeitlicher Konkurrenz zur *in vivo* Reparatur von Photodimeren und der Zellteilungsrate. Die entstandenen Uracil-enthaltenden Dimere verursachen nun eine Inkorporation von Adenosin als Gegenbase während der Replikation. Eine anschließende Replikation des Gegenstrangs führt zu einem Einbau von Thymidin gegenüber Adenosin und somit zur beobachteten C → T Transversion. Theoretisch können alle *cis/trans* und *syn/anti* Diastereomere entstehen, jedoch bilden sich aufgrund von sterischen Spannungen nur *syn*-Isomere aus. Folglich stellt das *cis-syn*-Diastereomer das Hauptprodukt der CPD (siehe Abbildung 3.13) dar. Im Gegensatz dazu bilden sich *trans-syn*-CPD nur in Einzelsträngiger DNA.

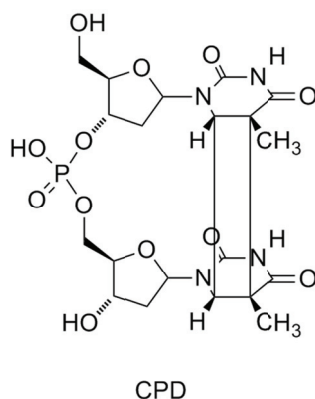


Abbildung 3.13: Darstellung des Cyclobutanpyrimidindimers (CPD).

3.7.3.1.2 (6-4)Photoprodukte

Das Pyrimidin(6-4)pyrimidon Addukt (6-4PP) ist der zweithäufigste und ebenfalls sehr gut untersuchte Photodimerschaden. Das (6-4)PP entsteht durch eine Paternó-Büchi-Reaktion zwischen der C5-C6-Bindung des 5'-Pyrimidins und der C4-Carbonylgruppe des 3'-Thymins (bzw. der 4-Iminogruppe eines 3'-Cytosins) über eine instabile Oxetan (bzw. Azetidin) Zwischenstufe. Diese Zwischenstufe ist oberhalb von -80°C nicht stabil und zerfällt unter Ringöffnung

in das jeweilige (6-4)Photoprodukt (siehe Abbildung 3.14).^[90, 91] Durch das zusätzliche Absorptionsmaximum von 326 nm des (6-4)PP kann dieses gut detektiert werden. Die Häufigkeitsverteilung des (6-4)PP unterscheidet sich deutlich von der des CPD: $T(6-4)C > T(6-4)T > C(6-4)C > C(6-4)T$.^[83, 92] Wie im Auch hier sagt die Quantität der entstandenen Schäden nur wenig über das Mutationspotential aus. Der $T(6-4)T$ Schaden zeichnet sich durch die höchste Mutationsrate aus.^[93] Die strukturellen Auswirkungen des CPD und (6-4)PP auf die DNA sind sehr unterschiedlich. CPD erzeugen nur eine leichte Biegung der Helix und keine starke Veränderung in der *Watson-Crick*-Basenpaarung.^[94-96] Im Gegensatz dazu entsteht durch das (6-4)PP eine starke Verzerrung der Helix und ein damit verbundener Verlust der Basenpaarung.^[97] Ob dies der Grund für die wesentlich bessere Reparatur von (6-4)PPs^[98-101] ist, bleibt in weiteren Experimenten herauszufinden.

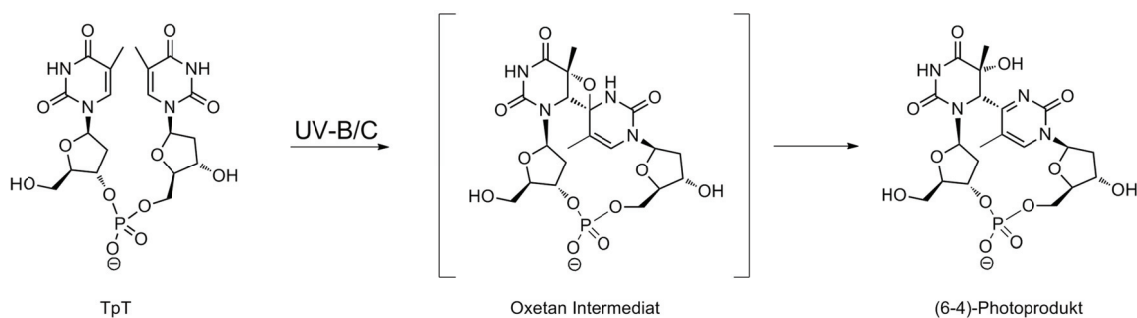


Abbildung 3.14: Bildung des (6-4)-Photoprodukts aus zwei benachbarten Thymidinen über eine Oxetan Zwischenstufe.

3.7.3.1.3 Dewar-Photoprodukt und Sporenphotoprodukt

Bei zwei weiteren Photoprodukten, die durch UV-Belichtung entstehen, handelt es sich um das Dewar-Photoprodukt und das Sporenphotoprodukt. Die Bildung des Dewar-Photoproduktes kann durch die Umwandlung des (6-4)PP durch Belichtung mit UV-Licht photochemisch bei einer Wellenlänge von 312 nm hervorgerufen werden und konnte bisher nur in Säugetierzellen nach Belichtungen nachgewiesen werden.^[102, 103] Das Sporenphotoprodukt wurde bisher ausschließlich in Sporen gefunden und entsteht durch die Belichtung von zwei benachbarten Thymidinen.^[104, 105]

3.7.3.2 DNA Addukte durch Elektrophile Moleküle

Bei der großen Mehrzahl an Karzinogenen handelt es sich um elektrophile Moleküle, die teilweise durch Aktivierung im Metabolismus entstehen. Sie reagieren mit den nukleophilen Atomen/Gruppen der DNA, zu denen die Phosphodiester-Bindungen, N7 und C8 des Guanins, N3 des Adenins und die exocyclischen Aminogruppen des Guanins (N2) und Adenins (N6) zählen. Die N7 Position zeichnet sich durch eine besonders hohe Reaktivität aus, da sie eine hohe Elektronendichte und eine gute Zugänglichkeit vereint. Ob die Reaktivität des C8 aus einer schnellen Elektronenumlagerung mit N7 entsteht, ist im Moment Gegenstand der Diskussion.^[106]

3.7.3.2.1 Cisplatin

Cis-Diaminodichloroplatin (*cis-DDP* oder *Cisplatin*) ist eines der am häufigsten benutzten Chemotherapeutika (*Zytostatikum*) für die Behandlung einer Vielzahl von Tumoren. Bei Cisplatin handelt es sich um einen neutralen quadratisch-planaren Platin(II)-Komplex, der von zwei relativ inerten Ammoniumgruppen und zwei labilen Chloridliganden in *cis*-Stellung koordiniert ist.^[107] Intravenös verabreicht, bleibt Cisplatin stabil im Blut, bis es in das Cytoplasma der Zellen diffundiert und dort, aufgrund der geringeren Salzkonzentration, die Chloridliganden gegen Wasser oder Hydroxid-Ionen ausgetauscht werden. Diese Substitution führt zu einem nun aktivierten und geladenen Elektrophil, das eine Reaktion mit den nukleophilen Gruppen der DNA eingeht und es zu der Bildung von Monoaddukten, *intrastrang* oder *interstrang Crosslinks* mit den Basen kommt. Dies führt zur Entstehung von Punktmutationen während der DNA Replikation. Neben diesen Einflüssen führt *Cisplatin* auch zur Hemmung der DNA-Reparatur und der Telomeraseaktivität. Durch diese Wirkungsprinzipien des *Cisplatin* kommt es zur Aktivierung der Apoptose in sich schnell-teilenden Zellen, wie es bei Krebszellen der Fall ist. Die Platinierung führt gewöhnlicherweise zu *intrastrang* N7-N7-*Crosslinks* zwischen benachbarten Pyrimidinen. 1,2-d(GpG) Komplexe bilden ca. 65 % aller durch *Cisplatin* erzeugten DNA-Schäden, 1,2-d(ApG) bilden ca. 25 % und ein

kleinerer Anteil (5-10 %) führt zu 1,3-d(GpNpG)-Addukten, bei denen sich ein Nukleotid zwischen den verbrückten Guaninen befindet (siehe Abbildung 3.15).^[107, 108] Die 1,2- und 1,3-Addukte führen zu einer starken Verzerrung der Doppelhelix, wobei die 1,3-Addukte eine stärkere Verzerrung aufweisen und folglich bessere Substrate für die *NER* sind.^[98, 109, 110] Aufgrund der besseren Wirkung werden heutzutage zunehmend neuartige Platinderivate, wie Oxaliplatin, Satraplatin und Carboplatin bei der Bekämpfung verschiedener Krebsarten eingesetzt.

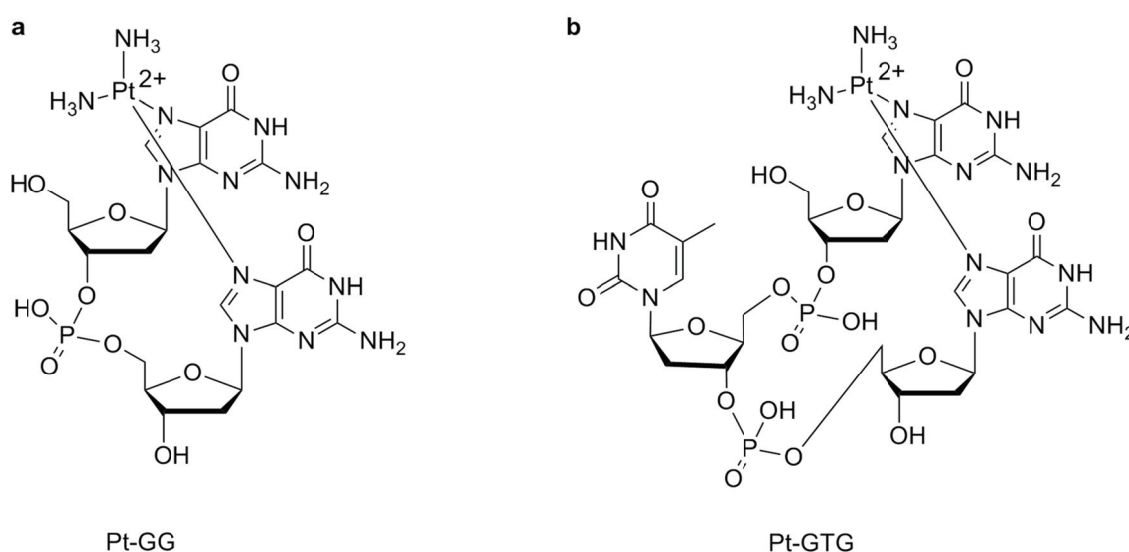


Abbildung 3.15: (a) Cisplatin verbrücktes GG-Dinukleotid. (b) Cisplatin verbrücktes Trinukleotid GTG.

3.7.3.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Bereits vor 200 Jahren wurde festgestellt, dass zwischen der zunehmenden Menge an Abgasen durch die Industrialisierung und der Entstehung von Krebs eine Korrelation besteht.^[111] Heutzutage stellen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie sie in Zigarettenrauch, Automobil- und Industrieabgasen vorkommen eine ernsthafte Bedrohung für unsere Gesundheit dar.^[112, 113] Benzo[a]pyren (B[a]P, siehe Abbildung 3.16 a), ursprünglich in Steinkohleteer entdeckt, stellt den Prototypen unter den karzinogenen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen dar und wurde daher ausführlich untersucht.^[111] Bei einem weiteren sehr potenten Karzinogen handelt es sich

um Benzo[*c*]phenanthren (B[*c*]Ph). Normalerweise handelt es sich bei diesen Molekülen um chemisch unreaktive planare Stoffe, die aber durch den metabolischen Abbau im Stoffwechsel in reaktive Phenole, Dihydrodiole und elektrophile Epoxide umgewandelt werden (siehe Abbildung 3.16 c). Diese aktivierten Moleküle können nun in die DNA interkalieren und u. a. mit der exozyklischen Aminogruppe des Guanins reagieren.^[114]

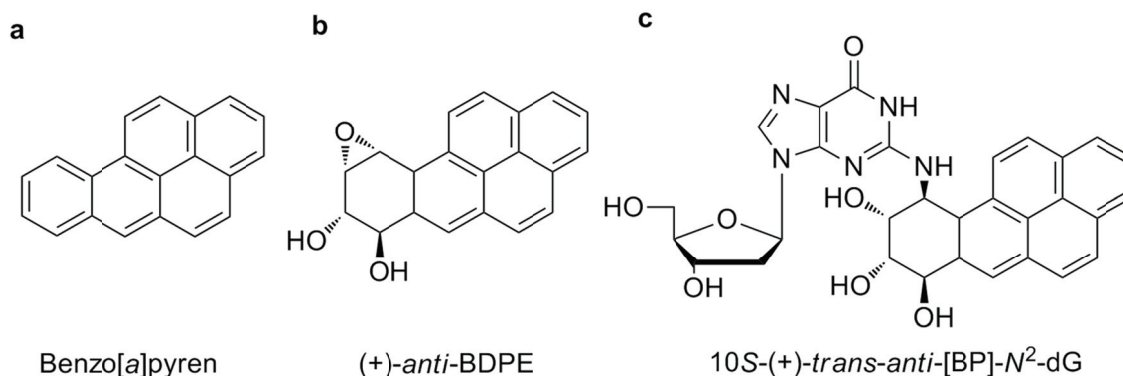


Abbildung 3.16: (a) Es handelt sich um den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo[*a*]pyren. (b) Durch metabolische Aktivierung (P450 Monooxygenase) umgewandeltes Diolepoxid (+)-*anti*-BDPE. (c) Aus **b** gebildetes Addukt mit dG.

3.7.3.2.3 Arylamin enthaltene Karzinogene

Aminofluoren (AF) wurde ursprünglich als Insektizid entwickelt, aber aufgrund der karzinogenen Wirkung auf den menschlichen Organismus sehr bald verboten. Stattdessen wurde dieses Molekül, das zur Klasse der aromatischen Amine gehört (v.a. in Zigarettenrauch und Grillgut zu finden), als Modellverbindung für DNA Reparatur eingesetzt.^[115] Auch dieses Molekül wird im Metabolismus aktiviert, indem es in *N*-hydroxy, *N*-acetoxy oder *N*-sulfoxy Verbindungen umgewandelt wird. Sie reagieren in einer Heterolyse der *N*-O-Bindung zu einer sehr reaktiven Arylnitrenium Zwischenstufe, welche Addukte mit der C8 Position und in geringerem Ausmaß mit N2 von dG eingeht.^[116, 117] Das dG-AF Addukt kann zwei unterschiedliche Konformationen bezüglich der glykosidischen Bindung eingehen. In der ersten verweilt das modifizierte dG in der *anti*-Konformation, wobei der Fluorenring in die große Furche zeigt und die *Watson-Crick*-Basenpaarung vorhanden bleibt. Bei dieser Konformation handelt es sich um das Hauptprodukt. In einer zweiten interkaliert der Fluorenring in die

DNA und dG-AF wird in die große Furche gedreht, in der es eine *syn*-Konformation eingeht.^[118] Zwei weitere wichtige DNA-Addukte sind Acetylaminofluoren (AAF)- und Acetylaminopyren (AAP)-Addukte (Abbildung 3.17). Diese Addukte liegen aufgrund der sterisch anspruchsvollen Acetylgruppe meistens in der *syn*-Konformation vor,^[119] was in zahlreichen NMR-Strukturen bestätigt wurde.^[118]

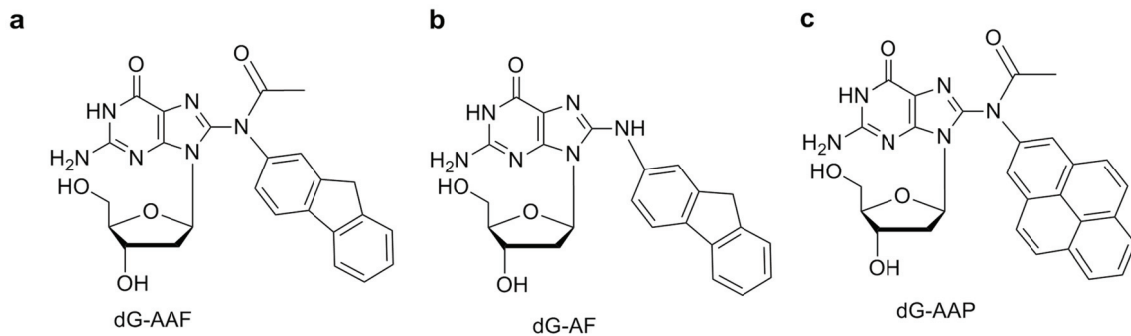


Abbildung 3.17: Verschiedene Adduktschäden. (a) C8-dG-Acetylaminofluoren-Addukt. (b) C8-dG-Aminofluoren-Addukt. (c) C8-dG-Acetylaminopyren-Addukt.

3.7.4 Prokaryotische Nukleotidexzisionsreparatur

Im Jahr 1964 wurde zum ersten Mal entdeckt, dass UV-Licht-induzierte DNA Schäden aus der DNA ausgeschnitten werden und eine Neusynthese von kurzen DNA Fragmenten an dieser Stelle stattfindet.^[120-122] Anschließend wurden in Prokaryoten die verantwortlichen Gene *uvrA*, *uvrB* und *uvrC* identifiziert.^[123] Die UvrABC Proteine erkennen geschädigte DNA und schneiden diese Nukleobasen in einer Mehrstufenreaktion heraus. (Abbildung 3.18) Unter normalen Wachstumsbedingungen sind lediglich ca. 25 Moleküle UvrA und ca. 250 Moleküle UvrB je *E. coli* Zelle vorhanden, wobei die Expressionsrate von UvrA und UvrB unmittelbar an die SOS-Antwort der Zellen gekoppelt ist.^[123] Nach der SOS-Induktion erhöht sich die Anzahl der UvrA-Moleküle um den Faktor 10 und im Fall von UvrB um den Faktor 4. Die Anzahl der Moleküle von UvrC ist nicht an die SOS-Antwort gekoppelt und beläuft sich im Durchschnitt auf weniger als 10 Moleküle pro *E. coli* Zelle.^[124]

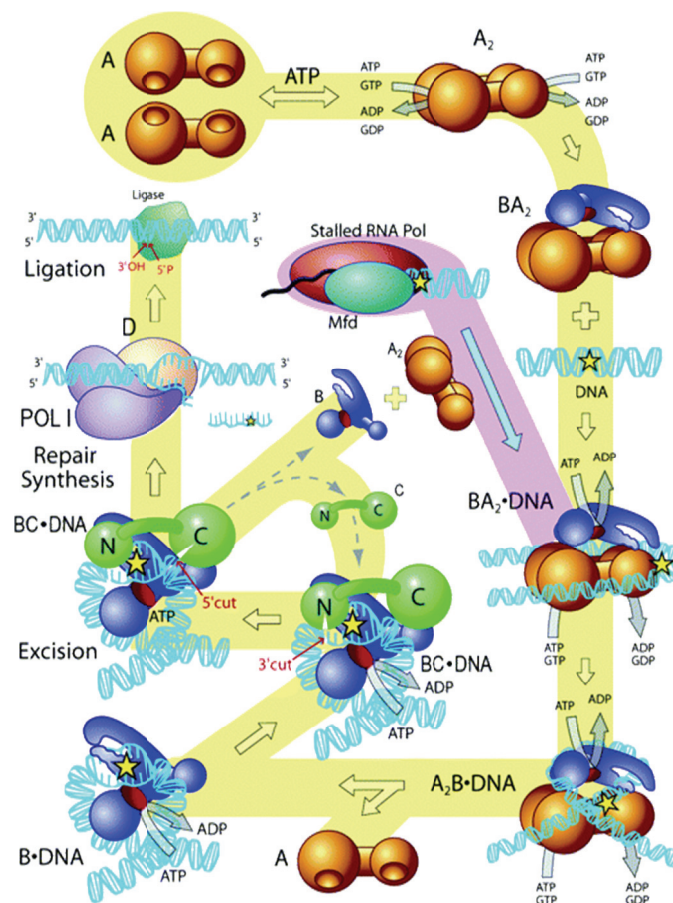


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der NER in *E. coli*. Sowohl die transkriptionell gekoppelte Reparatur (TCR), als auch der globale Reparaturweg gehen von einem A_2B -Komplex aus.^[125]

In oben stehender Abbildung ist eine schematische Darstellung der prokaryotischen *NER* aufgeführt. Als erster Reparaturschritt findet eine ATP-abhängige Dimerisierung von UvrA (A_2) statt.^[126] Anschließend kommt es zu einer Tri- oder Tetramerisierung mit einem oder zwei UvrB-Molekülen (B_2A , B_2A_2).^[127] Die Diskriminierung zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA könnte prinzipiell durch UvrA alleine geschehen, jedoch kommt es zu einer höheren Spezifität, bzw. stärkeren Bindung zu geschädigter DNA, wenn UvrA und UvrB einen Komplex bilden. Dies deutet auf einen Mehrstufen-Mechanismus in der Schadenserkennung hin. Bis heute konnte noch nicht vollständig geklärt werden, wie UvrA die Diskriminierung zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA vollzieht.^[128] Es wird vermutet, dass sowohl

elektrostatische Interaktionen, als auch hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen.^[129] Der Komplex UvrA₂B (A₂B) bzw. UvrA₂B₂ (A₂B₂) bindet an geschädigte DNA, wobei UvrA die direkte Bindung zum Schaden vollzieht und den Transfer der DNA an das UvrB-Molekül durchführt. UvrB weist in Gegenwart von UvrA und der geschädigten DNA eine ATPase-Aktivität auf, die für die Schadenserkennung ebenso notwendig ist. Die Erkennung geschädigter DNA und die Anbindung der DNA an UvrB führen zu weiterem ATP-Verbrauch und zur Spaltung des Komplexes.^[130] Zurück bleibt ein stabiler Komplex aus UvrB und DNA. Basierend auf mehreren Co-Kristallstrukturen von UvrB und geschädigter DNA wird vermutet, dass UvrB für die Schadenerkennung wichtig und für die Verifizierung des Schadens essentiell ist.^[131] Es kommt hierbei zu einem Herauskappen des geschädigten Nukleotids.^[132-134] Anschließend bindet UvrC an den Komplex (= BC·DNA). Nachdem UvrB weiteres ATP gebunden hat, erfolgt eine Phosphodiester-Spaltung zwischen dem vierten oder fünften Nukleotid auf der 3'-Seite des Schadens. Der zweite Schnitt findet an der 5'-Seite im Abstand von 8 Nukleotiden statt.^[135] Anschließend dissoziiert UvrC von der DNA und UvrD (DNA Helikase II) entfernt den ausgeschnittenen Einzelstrang. Nun füllt die DNA Polymerase I die Lücke wieder auf, während sich UvrB von der nun ungeschädigten DNA ablöst.^[136] Nun wird das neusynthetisierte DNA-Fragment durch die DNA Ligase mit dem parentalen Strang verbunden, um den *NER*-Pfad abzuschließen. Eine Transkriptions-gekoppelte *NER*, wie sie in Eukaryoten vorkommt, existiert nicht. Allerdings kann UvrA gezielt durch den Faktor Mfd an die Stelle einer durch Schäden blockierten RNA Polymerase rekrutiert werden.

Bisher wurde das UvrABC-System nur in Prokaryoten und Archaeobakterien gefunden und es wurden auch keine Sequenzhomologien mit anderen Reparaturproteinen festgestellt, bis auf eine kleine Region am C-Terminus von UvrC, welches dem ERCC1-Protein ähnlich ist.^[137] Dieses Protein ist in der maßgeblich an der eukaryotischen *NER* beteiligt.

3.7.5 Eukaryotische Nukleotidexzisionsreparatur

Bei der Eukaryotischen Nukleotidexzisionsreparatur handelt es sich, wie im Falle der Prokaryotischen *NER* (siehe Kapitel 3.7.4), auch um einen *cut-and-patch*-Reparaturweg. Der Reparaturkomplex der eukaryotischen *NER* besteht aus ca. 30 unterschiedlichen Proteinen, die eine außerordentliche Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden erkennen und eliminieren können. Aufgrund der Komplexität konnte bisher der genaue Erkennungsmechanismus der *NER* nicht vollständig geklärt werden. Es konnten zwar alle beteiligten Proteine sowie bestimmte Details des Mechanismus identifiziert werden, jedoch ist der genaue Ablauf der Schadenserkenkung noch nicht komplett verstanden. In den nächsten Kapiteln wird der Mechanismus mit der kontroversen Diskussion der eukaryotischen *NER* dargestellt. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Schadenserkenkung.

3.7.5.1 Mechanismus der NER

Das *NER*-System eliminiert DNA-Schäden durch das Herausschneiden eines Oligonukleotidfragments mit einer Länge von ca. 24-32 Basen^[138] um den Schaden und ersetzt dieses durch neusynthetisierte DNA mit anschließender Ligation. Nachdem verschiedene Modelle für den Mechanismus vorgeschlagen wurden, konnte die Hypothese eines *cut and patch*-Mechanismus in 5 Schritten bestätigt werden: (i) Schadenserkenkung, (ii) Öffnung der Doppelhelix um den Schaden, (iii) Ausschneiden und Entfernen des geschädigten Fragments (ca. 24-32 Nukleotide), (iv) DNA-Synthese und schließlich (v) Ligation.^[139, 140] Es wurde gezeigt, dass eukaryotische *NER* aus zwei unterschiedlichen Subwegen besteht, der globalen Genomreparatur und der Transkriptions-gekoppelten Reparatur.^[100] Die globale Genomreparatur (*GGR*), auf die hier hauptsächlich eingegangen wird, findet an jedem Ort des Genoms statt. Die Effizienz hängt von der Art des Schadens ab, wobei (6-4)PP im Vergleich viel schneller als CPD eliminiert werden.^[141]

Im Gegensatz dazu werden in der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (*TCR*) Schäden entfernt, die die RNA Polymerase beim Ablesen aktiver Gene

blockieren. Anders als bei der *GGR*, werden in diesem Fall unterschiedliche Schäden mit ähnlicher Effizienz beseitigt.^[142] Dies sorgt für eine schnelle Wiederherstellung der Transkriptions-Aktivität und der Aufrechterhaltung der zelluläre Funktionen.^[143, 144] Die Blockierung der RNA Polymerase während der Elongation durch geschädigte DNA initiiert die *NER* und das CSB Protein wird an diese Stelle rekrutiert. Die primäre Schadenserkennung findet also durch die Blockierung oder Verlangsamung der Polymerase statt.^[145, 146] Unter ATP-Hydrolyse entsteht ein stabiler CSB-RNAP-DNA Komplex. Falls es sich um einen kleinen Schaden handelt, erlaubt CSB der Polymerase den Schaden zu überlesen.^[147, 148] Handelt es sich hingegen um UV-induzierte, Cisplatin oder große Addukt-Schäden, so ist das Überlesen für die Polymerase nicht möglich und es kommt zu einer Rekrutierung weiterer Proteine, wie CSA,^[149] TFIIH^[150] und XPG.^[151] Anschließend wird wie bei *GGR* die Doppelhelix entwunden und das Oligofragment herausgeschnitten.

Mittlerweile ist man sich sicher, dass folgende Proteine bei der Schadenserkennung der humanen *GGR* involviert sind: XPA (Hefe: Rad14), XPC (Hefe: Rad4), TFIIH, RPA und UV-DDB.^[101, 152] UV-DDB (*UV-damaged DNA-binding protein*) weist eine außerordentliche Affinität zu UV-geschädigter DNA auf.^[153] Es bindet sowohl (6-4)PP, als auch CPD. Letztere werden durch XPA und XPC nur schwach erkannt.^[154] Somit kann UV-DDB als primärer Schadenssensor für UV-Schäden betrachtet werden, wobei auch eine geringe Affinität zu *abasic sites* und einer zweifachen Fehlpaarung beschrieben wurde.^[154, 155] Bei TFIIH handelt es sich um einen Komplex aus 10 Untereinheiten, dem zwei eindeutige Schritte im Mechanismus zugeordnet werden können. Erstens wird TFIIH durch Protein-Protein-Interaktionen mit XPC-HR23B durch einen ATP-abhängigen Schritt an die geschädigte Stelle rekrutiert.^[156, 157] In einem zweiten ATP-abhängigem Schritt kommt es zu einem Aufschmelzen der DNA, welcher es erlaubt, dass weitere Proteine an die geschädigte Stelle binden. Dies ist der erste katalytische und irreversible Schritt der Kern-Reaktion, da sie in einer neuen Struktur endet und nun weitere Proteine rekrutiert. Es handelt sich hierbei um „*kinetic proofreading*“, ein Prozess, der sich dadurch auszeichnet, dass eine Zwischenstufe mit mittlerer Spezifität in eine mit größerer Spezifität umgewandelt wird.^[101, 158]

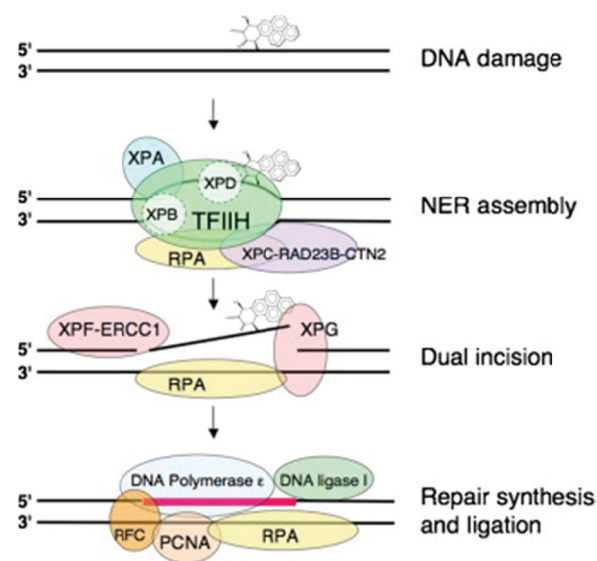


Abbildung 3.19: Schema des humanen globalen Genom *NER* Pfades. Der geschädigte Strang trägt ein polyzyklisches aromatisches Kohlenwasserstoff Addukt.^[164]

Bei RPA handelt es sich um ein Trimer, von dem ursprünglich gedacht wurde, dass es nur eine Rolle während der Replikation und Rekombination spielt.^[159] Jedoch wurde auch berichtet, dass RPA den ungeschädigten Strang in einer offenen DNA Helix bindet und die Endonuklease-Aktivitäten von ERCC1-XPF und XPG stimuliert.^[160] Des weiteren wurde vorgeschlagen, dass RPA geschädigte DNA bindet.^[161, 162] Aber mittlerweile manifestiert sich die Tatsache, dass RPA eher einzelsträngige DNA in einer offenen Helix im Zusammenspiel mit anderen Proteinen (z.B. XPA) erkennt.^[162, 163] Auf die beiden anderen Proteine der Schadenserkennung, Rad4/XPC und Rad14/XPA wird in den Kapiteln 3.7.5.3 und 3.7.5.4 genauer eingegangen. In Abbildung 3.19 ist das Schema des humanen *NER*-Weges aufgeführt. Nachdem der Schaden erkannt wurde, kommt es zu einem Multiprotein-Komplex, welcher nun die Öffnung der Doppelhelix durch die Helikasen XPB und XPD vorantreibt. Anschließend kommt es zu einem zweifachen Schnitt durch die Endonukleasen XPF-ERCC1 und XPG und zu einer Neusynthese durch die DNA Polymerase ϵ . Die Ligation des neusynthetisierten Strangs geschieht durch die DNA Ligase I.

In Tabelle 3.1 sind alle an der *GGR* beteiligten Gene aufgeführt, wobei noch nicht für jedes Protein die genaue Funktion aufgeklärt worden ist.

Tabelle 3.1: Alle an der humanen GGR beteiligten Gene, ihre ERCC Äquivalente und die daraus resultierenden Krankheiten. Abkürzungen: GGR: Globale Genom Reparatur, CAK: CDK-aktivierende Kinase, CDK: Cyclin abhängige Kinase, DSBR: Doppelstrangbruchreparatur, ODR: Reparatur der oxidativen Schäden, ERCC1: Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1, XP: Xeroderma Pigmentosum, CS: Cockayne Syndrom, TTD: Trichothiodystrophie.

Gen	Protein Untereinheit	Proteingröße (AS)	Funktion	Interaktions-partner	Krankheit
XPC-HR23B					
<i>hHR23B</i>	HR23B	43 kDa (409)	Schadenserkennung	TFIIH	XP (GGR)
<i>XPC</i>	XPC	106 kDa (940)	Plattform	XPA	
<i>CEN2</i>	CEN2	20 kDa (172)		DDB	
DDB					
<i>DDB1 (p127)</i>	DDB1	127 kDa (1140)	CPD-Erkennung	XPC	XP (leicht)
<i>DDB2 (p48)</i>	DDB2	48 kDa (428)	Chromatin Remodelling	RPA	
XPA					
<i>XPA</i>	XPA	31 kDa (273)	Schadenserkennung Strukturrolle? Große Addukte	XPC RPA TFIIH ERCC1	XP
RPA					
<i>RPA1</i>	RPA70	68 kDa (616)	Bindung ssDNA	XPA	
<i>RPA2</i>	RPA32	30 kDa (270)	Bindung geschädigter DNA?	XPG	
<i>RPA3</i>	RPA14	14 kDa (121)		PCNA/RFC	
TFIIH					
<i>XBP (ERCC3)</i>	XBP	89 kDa (782)	3'→5' DNA Helikase	XPC	XP
<i>XPB (ERCC2)</i>	XPB	87 kDa (760)	5'→3' DNA Helikase	XPA	XP/CS
<i>GTF2H1 (TFB1)</i>	p62	62 kDa (548)	TFIIH Untereinheit	XPG	TTD
<i>GTF2H2</i>	p44	44 kDa (395)	DNA Bindung?	XPF	
<i>GTF2H3 (TFB4)</i>	p34	34 kDa (308)	DNA Bindung?		
<i>GTF2H4 (TFB2)</i>	p52	52 kDa (462)	TFIIH Untereinheit		
<i>GTF2H5 (TTDA)</i>	p8	8 kDa (71)	Stabilisierung		
<i>MNAT1 (TFB3)</i>	Mat1	36 kDa (309)	CAK-Komplex		
<i>CDK7</i>	Cdk7	39 kDa (346)	Phosphoryliert RNA		
<i>CCNH</i>	CyclinH	38 kDa (323)	PolII und andere		
ERCC1-XPF					
<i>ERCC1</i>	ERCC1	33 kDa (297)	5'-Endonuklease	XPA	XP
<i>XPF (ERCC4)</i>	XPF	103 kDa (905)		TFIIH	DSBR?
XPG					
<i>XPG (ERCC5)</i>	XPG	133 kDa (1186)	3'-Endonuklease	RPA TFIIH PCNA?	XP XP/CS ODR?
RFC					
<i>RFC1</i>	RFC1	128 kDa (1148)	ATP-abhängiges laden von PCNA	PCNA	
<i>RFC2</i>	RFC2	39 kDa (354)		RPA	
<i>RFC3</i>	RFC3	41 kDa (356)			
<i>RFC4</i>	RFC4	40 kDa (363)			
<i>RFC5</i>	RFC5	38 kDa (340)			
PCNA					

3 Einleitung

<i>PCNA</i>	PCNA (Trimer)	3 x 29 kDa (3 x 261)	Sliding clamp	RFC Polδ XPG?	
Polδ					
<i>p125</i>	p125	124 kDa (1107)	DNA Polymerase	PCNA	
<i>p66</i>	p66	51 kDa (466)			
<i>p50</i>	p50	51 kDa (469)			
<i>p12</i>	p12	12 kDa (107)			
Polε					
<i>p261</i>	p261	261 kDa (2286)	DNA Polymerase	PCNA	
<i>p59</i>	p59	60 kDa (527)			
<i>p17</i>	p17	17 kDa (147)			
<i>p12</i>	p12	12 kDa (117)			
Ligase I					
<i>LIGI</i>	Ligase I	102 kDa (919)	DNA Ligation	PCNA	XP-ähnlich

3.7.5.2 Schadenserkennung in der eukaryotischen *NER*

Anfänglich wurden zwei gegensätzliche Theorien zum Mechanismus der Schadenserkennung vorgeschlagen: ‚*XPC zuerst*‘ oder ‚*XPA zuerst*‘.^[101] In dem ‚*XPC zuerst*‘ Modell stellt XPC den primären Schadenssensor dar, welcher geschädigte von ungeschädigter DNA unterscheidet und weitere *NER*-Proteine rekrutiert.^[100, 165] In zahlreichen Bindungsstudien (z. B. *EMSA*) und *in vivo* Experimenten konnte die Bindungsaffinität von Rad4/XPC zu UV-induzierter und AAF geschädigter DNA gezeigt werden.^[100, 140, 166-168] In letzter Zeit wurden häufiger *Photoaffinitäts-Crosslinking* Experimente durchgeführt, die gezeigt haben, dass sowohl XPC-HR23B/Rad4-Rad23, aber auch XPA/Rad14 eine hohe Affinität zu geschädigter DNA aufzeigen und diese auch binden.^[169-171] Zusätzlich zeigten geschädigte Plasmide in Zellextrakten, falls diese mit XPC-HR23B vorinkubiert wurden eine schnellere Reparaturrate. Bei Vorinkubation der geschädigten Plasmide mit XPA-RPA wurde hingegen eine langsamere Reparatur festgestellt.^[172] In anderen Experimenten hingegen wurde festgestellt, dass die Reparatur effektiver ist, falls geschädigte DNA mit XPA-RPA vorinkubiert wurde. Diese gegensätzlichen Ergebnisse sprechen dafür, dass XPC, XPA und RPA in einem kooperativen Modus agieren und weitere *NER*-Proteine rekrutieren.^[158] Der Vorteil dieser konzertierten Aktion wäre, dass die teilweise geringe Schadensaffinität von einzelnen Proteinen kompensiert wird und es zu einer Affinitätssteigerung gegenüber geschädigter DNA kommen

kann. Daher wurde von *Naegeli et al.* ein sogenannter zweiteiliger DNA Schadenserkennungs-mechanismus in der *GGR* vorgeschlagen.^[164] Bei dieser dritten Theorie wurde angenommen, dass die DNA-Schäden zufällig durch XPC/Rad4, XPA/Rad14 und RPA gebunden werden und es zu einem Vierfachen-Bindungskomplex kommt. In Abbildung 3.20 ist dieser Komplex dargestellt. Man erkennt deutlich, dass mehrere Proteine an der Schadenserkennung beteiligt sind, deren genaues Zusammenspiel jedoch unklar ist.

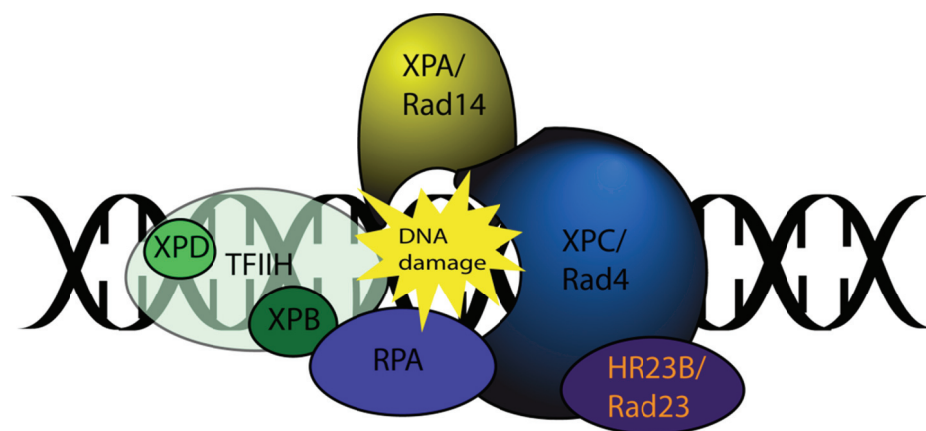


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der an der NER Schadenserkennung beteiligten Proteine.

3.7.5.3 Rad4/XPC und Rad23/HR23B

Der *rad4 open reading frame* codiert für ein 87 kDa Protein in *S. cerevisiae*.^[173] Rad4 spielt eine zentrale Rolle in der primären Schadenserkennung während der *NER*. Es bindet geschädigte DNA und rekrutiert auch weitere Proteine an die geschädigte Stelle. Dieses Protein kann in unterschiedliche funktionelle Einheiten eingeteilt werden. Eine Region von 370 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins weist eine 26 bzw. 38 %ige Sequenzidentität zu dem humanen bzw. *Drosophila* XPC Genprodukt auf.^[174] Diese konservierte Region ist funktionell sehr wichtig, da UV-sensitive Varianten Veränderungen in diesem Bereich aufweisen. Rad4 kommt *in vivo* nur als Komplex mit Rad23 vor. Bei Rad23 handelt es sich um ein 42 kDa Protein, das ebenfalls zahlreiche

konservierte Bereiche aufweist.^[175] Das humane homologe Protein heißt hHR23B und besitzt ähnliche Eigenschaften wie Rad23. Der N-terminale Bereich von Rad23 zeigt Homologien zu Ubiquitin und Ubiquitin ähnlichen Domänen (UbL). Des Weiteren gibt es zwei Bereiche, die mit Ubiquitin wechselwirken können (UbA). Die UbL Domäne ist nötig für eine maximale Effizienz der *NER*, da diese die Interaktion von Rad23 mit dem 26S Proteasom koordiniert. Rad23 interagiert also nicht nur mit Rad4, sondern spielt in Ubiquitinierungsprozessen während der *NER* eine Rolle.^[176] Bereits 1998 konnte durch *electrophoretic mobility shift assays* mit AAF- und CPD geschädigter DNA das Bindungsverhalten des Rad4/Rad23-Komplexes nachgewiesen werden. Rad4 ist hierbei für die Bindung geschädigter DNA verantwortlich, da Rad23 alleine nicht in der Lage ist geschädigte DNA zu binden.^[168, 177] Bei diesen Experimenten wurden allerdings keine definierten DNA Schäden verwendet, sondern DNA Fragmente, die unspezifische DNA Schäden aufweisen. Aus diesem Grund können keine präzisen Aussagen über das Bindungsverhalten von Rad4/XPC, sowie deren Bindungskonstanten getroffen werden. Eine N- sowie C-terminal verkürzte Version von Rad4 zeigte dasselbe Bindungsverhalten in *electrophoretic mobility shift assays* zu CPD-enthaltender DNA wie das gesamte Protein. Die Kristallstruktur der verkürzten Version von Rad4, bei der es sich nur um die DNA-bindende Domäne handelt, wurde kürzlich in Komplex mit CPD-enthaltender DNA gelöst (Abbildung 3.20).^[178] Es wurde gezeigt, dass lokale Instabilitäten des *Watson-Crick*-Basenpaares durch die Insertion einer β -Haarnadelschleife erkannt und in dessen Folge die Basen aus der DNA gedreht werden (*base flipping*). Erstaunlicherweise besteht zwischen dem Protein und den geschädigten Nukleotiden keine direkte Interaktion, nur die gegenüberliegenden ungeschädigten Basen werden durch Rad4 kontaktiert. Es bleibt fraglich, ob Ursache hierfür die starke Verkürzung von Rad4 ist, oder Rad4 tatsächlich keine Wechselwirkungen mit dem Schaden eingeht. Ebenso ist der genaue Erkennungsmechanismus des humanen Homologen XPC noch nicht völlig geklärt. Bisher konnte nur eine Bindung von XPC an geschädigte DNA gezeigt werden.^[100, 166, 179-181]



Abbildung 3.21: Struktur des Rad4/Rad23-DNA Komplexes. TGD (Transglutaminase Homologe Domäne) goldfarben, BHD1 (*β-hairpin domain*) magenta, BHD2 cyan, BHD3 rot, R4BD (Rad4-bindende Domäne von Rad23) grün und die DNA in grau dargestellt.^[178]

3.7.5.4 Rad14/XPA

Das Protein Rad14 wurde 1992 zum ersten Mal erwähnt und ist an der primären Erkennung und Bindung geschädigter DNA beteiligt.^[182] Rad14 defiziente Mutanten zeigen hohe Sensitivität gegenüber UV-Strahlung und Patienten mit XPA-Defiziten zeigen die stärksten Auswirkungen dieser Krankheit.^[183] Es ist ein Teil des Nukleotidexzisions-Reparatur Faktors 1 (NEF 1), zu dem auch noch der Komplex Rad1-Rad10 zählt^[184] und wird mit systematischem Namen YMR201C bezeichnet. Es handelt sich um ein Protein der Größe 43 kDa mit 371 Aminosäuren und einem isoelektrischen Punkt von 7.31. In Abbildung 3.22 ist der chromosomale Kontext von Rad14 schematisch dargestellt. Darauf erkennbar ist, dass das auf dem Chromosom VIII liegende Gen durch ein Intron getrennt wird. Es konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Exon für die DNA-Bindung nicht nötig ist (Kapitel 6.3). Rad14 besitzt ein für die DNA-Bindung verantwortliches Zinkfinger-Motiv. Normalerweise kommen in einer Zelle im Durchschnitt 1030 Moleküle Rad14 vor.^[185]

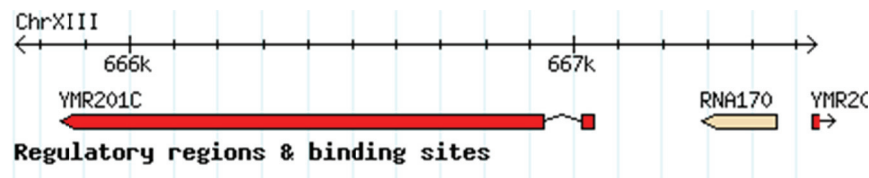


Abbildung 3.22: Regulatorische Regionen und Bindungsstellen von Rad14.

Der DNA-bindende Bereich ist bei Menschen, Maus, Krallenfrosch (jeweils XPA) und Hefe (Rad14) stark konserviert. In Abbildung 3.23 ist dieser Bereich mit den am Zinkfinger-Motiv beteiligten Cysteinen dargestellt. Bisher konnte die Affinität von Rad14 nur zu nicht definierter UV-geschädigter DNA gezeigt werden, wobei es sich hierbei um belichtete DNA handelte, welche unterschiedliche UV-Schäden aufweisen kann.^[186, 187]

<i>Human</i>	GPVMEFDYVICEECGKEF.MDSYLMNHFDLPTCDNC.RDADDKHKL
<i>Mouse</i>	GPVMEFDYTYICEECGKEF.MDSYLMNHFDLPTCDSC.RDADDKHKL
<i>Xenopus</i>	GPVLECDYLYICEECGKDF.MDSYLSNHFDLAVCDSC.RDAEEKHKL
<i>Yeast</i>	PPEHISKAPKCIETCHINIEMDPVLHDVFKLQVCKQCSKEHPEKYAL

Abbildung 3.23: Das translatierte Rad14 Gen aus *S. cerevisiae* zeigt im Bereich des DNA-bindenden Fragments hohe Homologien mit dem Humanen, Mäuse und Krallenfrosch XPA Gen. Bei dieser Region hoher Homologie handelt es sich um konservierte Reste des Zinkfinger-Motifs. In Rot sind die daran beteiligten Cystein-Reste dargestellt.^[111]

Bei dem humanen Homologen des Rad14 handelt es sich um das 31 kDa schwere XPA Protein, mit einer Sequenzidentität von 26 %. Das humane XPA Gen ist auf dem Chromosom 9 (9q34.1) lokalisiert und in 6 Exons unterteilt.^[188] Typischerweise enthält eine humane Zelle 150000 bis 200000 Moleküle XPA.^[189] Die Affinität zu geschädigter DNA ist ebenfalls vorhanden und es wurde gezeigt, dass XPA selektiv belichtete DNA,^[190, 191] AAF-^[190] und Cisplatin-Addukte,^[192] sowie fehlgepaarte DNA und Loops^[193] bindet.

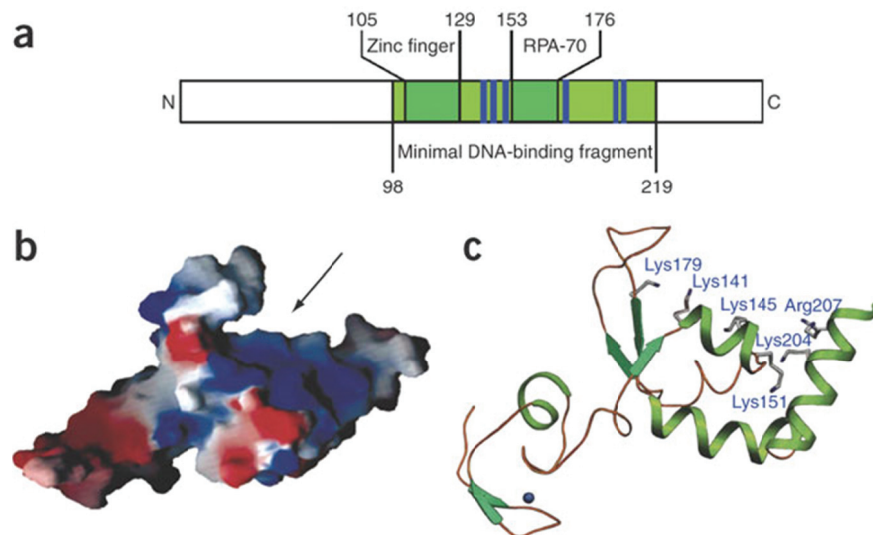


Abbildung 3.24: Struktur des humanen XPA Protein. (a) Minimales DNA-bindende Fragment; in blau sind positive Reste dargestellt. (b) Verteilung des elektrostatischen Potentials der Oberfläche; Blau: positiv; rot: negativ; der Pfeil kennzeichnet die mögliche DNA-Bindungsstelle. (c) Quartärstruktur des DNA-bindenden Fragments.^[193]

Ikegami et al. veröffentlichten eine NMR-Struktur des humanen XPA-Proteins (Abbildung 3.24).^[138] In **a** ist schematisch das minimale DNA-bindende Fragment von Rad14 dargestellt, wobei in Blau die positiv geladenen Bereiche markiert wurden, welche mit dem negativen Phosphatrückgrat der DNA interagieren können. In der Oberflächendarstellung (**b**), die nach dem elektrostatischen Potential der Seitenketten gefärbt ist, zeichnet sich deutlich eine positiv geladene Furche ab, an welcher vermutlich die DNA gebunden wird. Mangels struktureller Daten von XPA oder einem seiner Homologen in Komplex mit geschädigter DNA, ist noch keine genaue Aussage über den Bindungsmechanismus möglich. Abbildung 3.23 **c** zeigt die zugehörige Tertiärstruktur. Die zur positiven Ladung beitragenden Seitenketten sind hervorgehoben.

4 Aufgabenstellung

Glykosylasen, wie sie in der Basenexzisionsreparatur vorkommen, sind vor allem für die Entfernung von oxidativen Schäden verantwortlich. In der Einleitung wurde ausführlich beschrieben, dass der genaue Mechanismus der Schadenserkennung dieser Glykosylasen noch nicht im Detail verstanden ist. Probleme stellen die Verwendung mutierter Enzyme und die Zugänglichkeit geschädigter DNA dar. Daher soll in dieser Arbeit die Schadenserkennung, sowie das Entfernen der geschädigten Base durch die Formamidopyrimidin Glykosylase (Fpg/MutM) untersucht werden. Da bisher keine Kristallstruktur eines Wildtyp-Proteins bekannt ist, sollte hier die Kristallstruktur von Fpg (wt) in Komplex mit c8-oxo-dG geschädigter DNA und ungeschädigter DNA erzeugt werden. Ferner sollen Aktivitätsassays des Proteins (Wildtyp und Mutante) mit unterschiedlich geschädigten DNA Oligonukleotiden durchgeführt werden.

Rad4 und Rad14 sind vor allem für die Schadenserkennung in der Nukleotidexzisionsreparatur verantwortlich. Auch hier ist die genaue Aufgabe jedes einzelnen Proteins bei der Schadenserkennung noch nicht völlig klar. Bisher wurden größtenteils für die Experimente zur Aufklärung der primären Schadenserkennung DNA-Stränge verwendet, die undefinierte DNA-Schäden enthielten. Deswegen soll im zweiten Teil dieser Arbeit das Bindungsverhalten von Rad14 gegenüber Oligonukleotiden untersucht werden, die definierte DNA-Schäden aufweisen. Um eine Vorstellung auf atomarer Basis zu erhalten, soll eine verkürzte Version von Rad14 mit AAF-geschädigter DNA kristallisiert werden.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Lösemittel in BioChemica Qualität wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma/Aldrich/Fluka (Deisenhofen) bezogen.

5.1.2 Spezielle Anwendungen

Tabelle 5.1: Isolierungs- und Präparationssysteme.

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
DNeasy Kit	Präparation von genomischer DNA	Qiagen, Hilden
MinElute PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten	Qiagen, Hilden
MinElute Gel Extraction Kit	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
PeqGold GelPure Kit	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	Peqlab, Erlangen
PeqGold Plasmid Miniprep Kit I	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	Peqlab, Erlangen
MinElute Reaction Cleanup Kit	Reinigung enzymatischer Reaktionen	Qiagen, Hilden
QIAquick Midiprep Kit	Präparation großer Plasmidmengen aus <i>E. coli</i>	Qiagen, Hilden
TOPO [®] Cloning	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe
Stargate [®] Cloning	Klonierung	Iba, Göttingen
Gateway [®] System	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme sowie Polymerasen wurden vorwiegend von den Firmen New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.), Invitrogen (Karlsruhe) und Stratagene (Amsterdam) bezogen. Andere DNA modifizierende Enzyme, Ligasen und DNasen stammen von den Firmen NEB und Sigma-Aldrich.

5.1.4 Plasmide

Tabelle 5.2: Verwendete Plasmide ohne Insert.

Bezeichnung	Größe	Resistenzen/ Promoter	Affinitätstag	Hersteller
pDest 007	4876 bp	Amp, Cm, <i>ccdB</i> , <i>tet</i>	N-terminaler Strep-tagII	Hergestellt von Dr. Jan Carsten Pieck ^[24]
pDest 17	6354 bp	Amp, Cm, <i>ccdB</i> , T7	N-terminaler His ₆ -tag	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR201	4470 bp	Kan, Cm, <i>ccdB</i>	-	Invitrogen, Karlsruhe
pENTRY-IBA10	1775 bp	Kan	-	IBA, Göttingen
pPSG-IBA3	2806 bp	Amp, T7	C-terminaler Strep-tagII	IBA, Göttingen
pPSG-IBA25	3481 bp	Amp, T7	N-terminaler GST-tag	IBA, Göttingen
pKLAC1	9091 bp	Amp, LAC4, ADH2	-	NEB, Frankfurt a. M.

5.1.5 Oligonukleotide

In Tabelle 5.3 sind die für die Klonierungen verwendeten Primer aufgeführt. Alle Primer wurden vor der Verwendung über eine HPLC gereingt.

Tabelle 5.3: Verwendete Primer.

Primer	Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
1	5'-Fpg-Gateway	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgccagagttaccagaag
2	3'-Fpg-Gateway	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcttattttgctgacagaatggg
3	5'-Fpg-Stargate	aatgccagagttaccagaagtgaaa
4	3'-Fpg-Stargate	tcccttttgctgacagaatgggcaa
5	5'-Fpg-E6A	ccaatgccagaattaccagcagttgaaaccgtagaaga
6	3'-Fpg-E6A	tcttctaacgggttcaactgctggttaattctggcattgg
7	5'-Fpg-K131A	agtgattccctattttctgaacaaagcaattggaccagaaccgaccta
8	3'-Fpg-K131A	taggtcgggtctggtccaattgctttgttcagaaaatagggaaactact
9	5'-Fpg-K154A	gcttttcgagagaaattaagaaaatcaacagcgaaaaataaacctatttact tgagcaaacc
10	3'-Fpg-K154A	ggtttgctcaagtaaataagggtttattttcgctgttgattttcttaatttctctcgaaa aagc
11	5'-Fpg-K257A	cggtgtggtgcagagattcaaaaaatagcagttgctggtcgag
12	3'-Fpg-K257A	ctcgaccagcaactgctatttttgaatctctgcaccacaacg
13	5'-Rad14	Pho-aatgactcccgaacaaaaggccaaactagaggctaacaggaa attagcaatag
14	3'-Rad14	Pho-tccaatgtcaatttcttcagtttctagcc
15	5'-Rad14-DBD	Pho-aatggcgccgaaatgtattgaatgt
16	3'-Rad14-DBD	Pho-tcccgtatttttctccctctgtg
17	5'-Δ9NRad14	Pho-aatggaggctaacaggaaattagcaatag
18	3'-Δ9NRad14	Pho-tccaatgtcaatttcttcagtttctagcc
19	5'-Rad4-His	ggcctcgagaaaagaatgaatgaagacctgccaag
20	3'-Rad4-His	gccggatcctcagtgatggtgatggtgatggtctgattcctctgacatctc
21	5'-Rad4-Hind	ggcaagcttatgaatgaagacctgccaag

22	5'-Rad23	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttcattggttagcttaaccttataaa atttcaag
23	3'-Rad23	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcagtcggcatgatcgctg

5.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 5.4: Verwendete Bakterienstämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
NEB Turbo	F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ <i>lacZ</i> M15/ <i>fhuA2</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV gal R(zgb-210::Tn10)</i> Tet ^R <i>endA1 thi-1</i> Δ(<i>hsdS-mcrB</i>)5	NEB, Frankfurt a. M.
DH5α	F' <i>Phi80 dlacZ Delta</i> M15 <i>Delta (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK-mK+) phoA supE44 lambda-thi-1</i>	Stratagene, Amsterdam
TOP10	F ⁻ <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araΔ139 (ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL10 Gold	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F ⁻ <i>proAB lacI</i> ^q <i>Z</i> ΔM15 Tn10(Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene, Amsterdam
Rosetta™ (DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1</i> pRARE (<i>argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL</i>) (Cm ^R)	Novagene, Schwalbach
Tuner™ (DE3)	F ⁻ <i>ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (Cm ^R)	Novagene, Schwalbach
BL2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagene, Schwalbach
B834(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm met</i> (DE3)	Novagene, Schwalbach
One Shot® ccdB Survival™	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araΔ139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2</i>	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.7 Hefestämme

Tabelle 5.5: Verwendete Hefestämme.

Hefe-Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>K. lactis</i> GG799	<i>MATα</i> , [pGKI1 ⁺]	NEB, Frankfurt a. M.
<i>S. cerevisiae</i> YPH499	<i>MATα</i> ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1- Δ 63 his1- Δ 200 leu2- Δ 1	Sigma, Deisenhofen

5.1.8 Geräte

Tabelle 5.6: Verwendete Geräte.

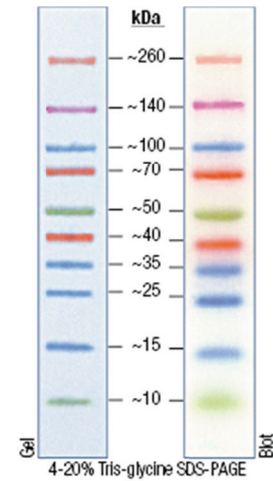
Geräte	Hersteller
Äkta Basic Chromatographie System	GE Healthcare, München
Äkta Purifier Chromatographie System	GE Healthcare, München
Agarose Gelelektrophoresekammer	Biorad, München
Autoklav Vakulab S3000	Systec, Gießen
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Carey UV-Spectrometer Bio100	Varian, Darmstadt
Elektrotransformator, Micropuls	Biorad, München
Elisa Reader, FP Spektrometer	Tecan, Crailsheim
Fluorimeter	Jasco, Gross-Umstadt
French Pressure Cell Press	Thermo, Dreieich
Gelscanner IDA	Raytest, Straubenhardt
Geldokumentationsgerät LAS3000	Raytest, Straubenhardt

Geltrockner 583	Biorad, München
Hochdruckhomogenisator	Avestin, Mannheim
HPLC	Waters, Eschborn
Inkubator 1S	Noctua, Wiesloch
Inkubator 44R	New Brunswick, Nürtingen
Kristallisationsroboter Hydra II	Thermo, Dreieich
Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg
Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Multicaster	Biorad, München
Nanodrop UV-Spectrometer	Peqlab, Erlangen
pH Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
PCR Realplex	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	Biorad, München
Sorvall Zentrifuge, Evolution RC	Kendro, Dreieich
Storm 860 TM	GE Healthcare, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschränke	Sanyo, Bad Nenndorf
Tischzentrifuge, 5415R	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blotter, Semi-Dry	Biorad, München
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waters Millipore System	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

5.1.9 DNA- und Proteinstandards

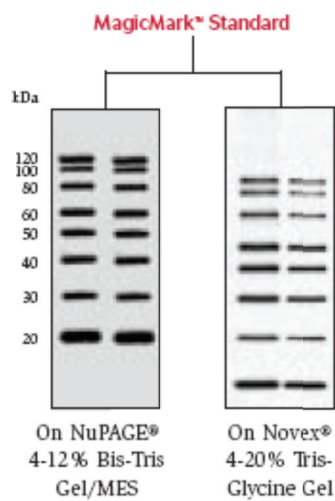
Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
Myosin	250	210	188	191	210
Phosphorylase	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12% Gel

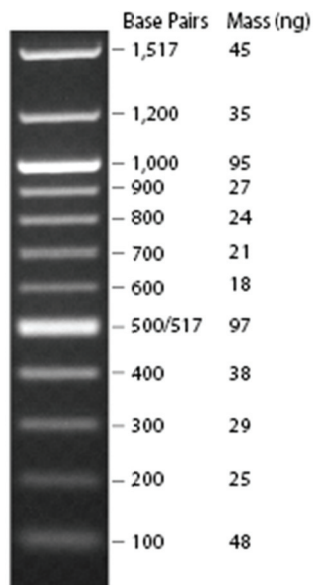


SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen

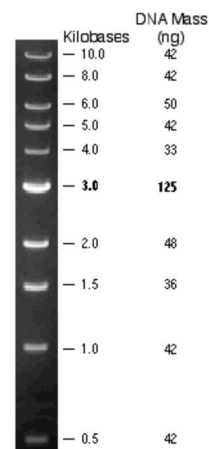
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas



MagicMark™ Protein Western Protein Standard, Invitrogen



100 bp DNA Ladder (100 – 1517 bp), NEB



DNA Ladder 1kb, NEB

5.1.10 Puffer, Medien und Stammlösungen

Tabelle 5.7: Verwendete Medien und Antibiotika- bzw. Induktionsstammlösungen.

Medien

LB-Medium	1.0% (w/v) Pepton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1.0% (w/v) NaCl, pH 7.5
TB-Medium	0.5% (w/v) Trypton, 1.0% (w/v) Hefeextrakt, 0.4% (v/v) Glycerin, 900 mL H ₂ O add 100 mL 0.17 M KH ₂ PO ₄ , 0.72 M K ₂ HPO ₄
SOC-Medium	2.0% (w/v) Pepton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.2 Nach autoklavieren: 5.0 mM MgCl ₂ , 2.0 mM Glucose
M17-Medium (modifiziert)	0.75 % (w/v) Casein Pepton, 0.75 % (w/v) Fleisch Pepton, 0.25 % (w/v) Hefextrakt, 0.05 % (w/v) Ascorbinsäure, 0.02 % (w/v) MgSO ₄ , pH 7.1 Nach autoklavieren: 1.2 mM CaCl ₂ , 45 mM Lactose

LeMaster ^[194]	siehe Literaturstelle
YPD	2.0% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose
YPG	2.0% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt Nach autoklavieren: 2.0% (w/v) Galaktose (mit 20% Stocklösung)
YCB Agar Medium mit 5 mM Acetamid	15 mL 1 M Natriumphosphat-Puffer, 5.85 g YCB Mediumpulver, 10 g Agar-Agar, 495 mL H ₂ O Nach autoklavieren: 5 mL 100x Acetamid- Stocklösung

Induktions- und Antibiotika-Stammlösungen

Anhydrotetracyclin	2 mg/mL in Dimethylformamid
Carbenicillin	100 mg/mL in Wasser
Chloramphenicol	34 mg/mL in Ethanol
Kanamycin	25 mg/mL in Wasser
IPTG	1 mM in Wasser

5.1.11 Datenbanken und Programme

EMBL	European Molecular Biology Laboratory Data Library Nucleotide Sequence Database Heidelberg http://www.embl-heidelberg.de http://www.ebi.ac.uk/clustalw
NCBI	National Center for Biotechnology Information USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Swiss-Prot	Department de Biochemie Medicale Centre Medical Universitaire Genf, Schweiz http://www.swissprot.com

Bioinformatik	Vector NTI 10, Invitrogen Lasergene DNA Star 5.0 (Seqman, Editseq, Seqbuilder, Protean, PrimerSelect), GATC Clone Manager, SciEd Central
Äkta	Unicorn 6.0, GE
Fluorimeter	Spectra Manager Version 1.54.03
Elisa-FP-Reader	X Fluoro Genius Pro, Tecan
AIDA	AIDA Advanced Image Data Analyzer Version 4.10
Storm860 TM	Imagequant Version 5.0, Molecular Dynamics
Statistik	SigmaPlot für Windows Version 11.0, Systat, Erkrath

5.1.12 Bioinformatische Anwendungen

5.1.12.1 Homologievergleiche und Alignments

DNA- und Proteinsequenzen der DNA bindenden Enzyme, sowie der Polymerasen wurden mittels der NCBI Datenbank gefunden. Homologievergleiche wurden sowohl mit dem NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), als auch mit Clustal X 1.8 bzw. der BLAST Search Funktion des Bioinformatik Programms Vector NTI 10 durchgeführt. Allgemeine Sequenzalignments wurden ebenfalls mit Vector NTI 10, Clustal x 1.8 und Lasergene DNA Star 5.0 durchgeführt.

5.1.12.2 Strukturvergleiche und Strukturabbildungen

Für die Darstellung der Kristallstrukturen bzw. der Strukturvergleiche wurden die Programme WinCoot 0.3.3, sowie Pymol 1.0r1, XDS, PHASER und SCALA verwendet.

5.1.12.3 Primerdesign und Klonierungsstrategien

Die Klonierungsstrategien, sowie die dafür benötigten Primer wurden in Vector NTI 10 und Lasergene DNA Star 5.0 entwickelt und dargestellt. Für das Design der Primer für die Punktmutationen wurde das QuickChange® Primer Design Programm von Stratagene verwendet.

5.1.12.4 Kalkulation der Proteinparameter

Physikalische und chemische Parameter der rekombinanten Proteine wie Molekulargewicht (MW), Isoelektrischer Punkt (pI), Extinktionskoeffizienten und Restriktionsschnittstellen wurden mit Vector NTI 10 und Lasergene DNA Star 5.0 ermittelt.

5.1.12.5 Vorhersage der Sekundärstrukturen

Für die Kristallisation von Rad14 wurde eine Vorhersage der Sekundärstruktur getroffen. Dies geschah mit JPred 3 (Protein Secondary Structure Prediction Server) der University of Dundee.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Bakterienkulturen

5.2.1.1 Anlegen einer Bakterienkultur

Die Anzucht der verwendeten Bakterienstämme erfolgte als Suspensions-schüttelkultur (225 rpm) in 5 mL LB-Medium in einem 13 mL Kulturröhrchen bei 37°C unter aeroben Bedingungen. Selektion resistenzvermittelnder Plasmide oder resistenter Bakterienstämme entstand durch Zusatz des entsprechenden Antibiotikums unter einer in Tabelle 5.7 angegebenen Konzentration. Die Animpfung mit einer Bakterienkultur erfolgte mittels einer sterilen Pipettenspitze, welche in die Bakterienkolonie auf der entsprechenden Platte gestochen und anschließend in das Medium überführt wurde.

5.2.1.2 Anlegen einer Bakterien Plattenkultur

Die Petrischalen wurden mit sterilem LB-Medium und 15 g/L Agar, bei einer Medientemperatur von ca. 37°C gegossen. Die Zugabe von temperaturlabilem Antibiotikum, in den bereits angegebenen Konzentrationen, erfolgte kurz vor dem Gießen. Das Animpfen der Platten erfolgte durch zwei unterschiedliche Methoden: Zum einen wurde das unterbrochene Ausstrichverfahren angewendet. Hierzu pickte man einen Klon mit einer Pipettenspitze und verteilte die anhaftenden Bakterien großzügig über die Platte. Zum anderen, um eine Selektion von Transformaten zu Nicht-Transformaten zu erreichen, wurde das komplette Flüssigkeitsvolumen auf einer Petrischale mit einem Drygalski-Spatel verteilt. Die Platten wurden bei 37°C über Kopf 12-16 h inkubiert, zur Lagerung mit einem Parafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

5.2.1.3 Bakterien-Stammmhaltung

Da Plattenkulturen nur eine begrenzte Haltbarkeit aufweisen, wurden die Bakterien in einer Glycerinkultur über längere Zeit aufbewahrt. Dazu wurden 850 µL Flüssigkultur in einem Cryo-Röhrchen mit 150 µL sterilem Glycerin

versetzt, durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen können nun bei -80°C über Jahre gelagert werden.

5.2.2 Hefe – Kulturen

5.2.2.1 Anlegen einer Hefekultur

Hierzu wurden die verwendeten Hefestämme in 5 mL eines geeigneten Mediums in einem Schüttelinkubator bei 30°C unter aeroben Bedingungen gezüchtet. Es muss, wie bei den Bakterien, darauf geachtet werden, dass der Selektionsdruck vorhanden bleibt.

5.2.2.2 Anlegen einer Hefe-Plattenkultur

Es besteht eine große Ähnlichkeit zur bereits in Kapitel 5.2.1.2 beschriebenen Bakterien-Plattenkultur. Der Unterschied jedoch besteht in der Verwendung Hefe-spezifischer Medien; um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten wurden oftmals *Drop-Out*-Medien anstelle von Antibiotika verwendet. Die Ausbildung der Hefekolonien nimmt mindestens zwei Tage bei 30°C in Anspruch. Anschließend können die mit Parafilm verschlossenen Agarplatten bei 4°C ca. 2 Wochen gelagert werden.

5.2.2.3 Anlegen einer Hefe-Dauerkultur

Hefen können ebenfalls in Glycerin bei -80°C über Jahre gelagert werden. Dazu wurden 850 µL Flüssigkultur mit 150 µL sterilem Glycerin versetzt, durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alternativ kann man auch eine Kolonie von einer Platte picken und diese in 1 mL 15 % (v/v) Glycerinlösung geben, schütteln und schockfrieren.

5.2.3 Transformation von *E. coli*

5.2.3.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Stämme wurden 500 mL LB-Medium nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika mit 5 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 37°C inkubiert. Ab dann erfolgten alle Arbeiten bei ständiger Kühlung auf 4°C und unter sterilen Bedingungen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in vorgekühlten Zentrifugenbechern bei 4°C und bei 8000 x g 30 min lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in 40 mL eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert, wiederum über 15 min bei 8000 x g zentrifugiert und in 20 mL eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 8000 x g über 15 min wurde das Pellet in 1 mL eiskaltem, sterilem 10%igem Glycerin aufgenommen und in 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

5.2.3.2 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Zur Vorbereitung wurde eine Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt und 1 mL SOC-Medium auf 37°C vorgewärmt. Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 ng bis 1000 ng der zu transformierenden DNA versetzt und vermischt. Anschließend wurde 1 min auf Eis inkubiert, schnell in die Elektroporationsküvette überführt und ein Spannungsimpuls von 2.5 kV angelegt. Nur bei Spannungen, die länger als 3 ms gehalten werden ist die Transformation als erfolgreich zu beurteilen, optimal sind 5-6 ms. Im Anschluss erfolgte die sofortige Zugabe von 1 mL SOC-Medium und die Überführung in ein *snap cap* oder ein 1.5 mL Reaktionsgefäß. Nach 60 min Schütteln bei 37°C wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge mit 4000 x g für 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden schließlich über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert.

5.2.3.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen wurden 500 mL LB-Medium mit einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C 10 min lang bei 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 mL eiskalter CaCl₂-Lösung (50 mM) resuspendiert. Nach einer 90 minütigen Inkubation auf Eis wurden diese bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 16 mL eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4000 rpm für 10 min wurden die Zellen in 2 mL eiskalter steriler 10%igen Glycerin-Lösung resuspendiert, in 50 µL Aliquots überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.2.3.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten 50 µL Aliquots wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 1000 ng DNA versetzt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte ein 2-minütiger Hitzeschock bei 37°C und danach eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Schließlich wurden die Zellen mit 1 mL SOC-Medium versetzt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Tischzentrifuge mit 4000 x g für 5 min sedimentiert und das verbleibende Pellet auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

5.2.3.5 Transformation ultrakompetenter XL10-Gold Zellen (Stratagene)

Ultrakompetente XL10-Gold-Zellen werden für schwierige Transformationen von großen Plasmiden oder Ligationen verwendet, sie besitzen aber auch die Fähigkeit linearisierte Fragmente in zirkuläre zu ligieren. Für die Transformation wurde ein Kulturröhrchen auf Eis vorgekühlt und SOC-Medium auf 42°C vorgewärmt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in ein *snap cap* überführt, mit 4 µL β-Mercaptoethanol versetzt, leicht geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert, während alle 2 min leicht geschüttelt wurde. Nun wurden 0.1-50 ng auf Eis gelagerte DNA oder 2 µL einer Ligation zu den Zellen gegeben,

leicht geschüttelt und 30 min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurde das *snap cap* exakt 30 s in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden 0.9 mL 37°C warmes SOC-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C bei 225 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Pellet auf Agar-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte wiederum bei 37°C für 12 bis 16 h.

5.2.4 Transformation von Hefe

Im Gegensatz zu *E. coli* werden die kompetenten Hefe-Zellen normalerweise nicht bei -80°C gelagert, sondern die Transformation sofort durchgeführt. Durch eine längerfristige Lagerung der kompetenten Hefen-Zellen sinkt die Transformations-effizienz erheblich bzw. bleibt komplett aus.

5.2.4.1 Ein-Schritt Hefe Transformation

Dieses *one-step* Protokoll ist ein schnelles Verfahren um Plasmid-DNA in Hefen zu transformieren. Dazu wurde 1 mL einer Hefekultur mit einer Zelldichte von mindestens 10^8 Zellen pro mL benötigt. Zuerst wurde *salmon sperm DNA* (Sigma, Nr. 31149), als *carrier-DNA* verwendet, für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 mL der Hefekultur bei 4000 x g zentrifugiert, in 100 µL *one-step* buffer (0.2 M LiAc, 40% PEG 3350, 100 mM DTT) resuspendiert und gevortext. Nach Zugabe von 20 µg ssDNA und 100-500 ng der zu transformierenden DNA wurde die Mischung abermals gevortext und 30 min bei 45°C inkubiert. Nun wurde 1 mL YPD-Medium zugegeben, gevortext und 10 s bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL YPD-Medium resuspendiert und 100 µL davon wurden auf die entsprechenden Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30°C.

5.2.4.2 Hoch Effizienz Hefe Transformation

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz ist ein modifiziertes Verfahren nötig. Dazu wurden 50 mL YPD-Medium mit der Menge einer Übernachtskultur angeimpft, so dass die Start OD₆₀₀ bei 0.25 lag. Die Zellen wurden nun bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert, bei 2500 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 mL sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min wurden die Zellen in 1 mL 100 mM LiAc resuspendiert und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit einer Tischzentrifuge bei 13000 x g für 15 s zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet in 400 µL 100 mM LiAc gelöst. Die Suspension wurde gevortext und in 50 µL Proben aliquotiert. Nebenbei wurde ssDNA für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis inkubiert. Die Aliquots wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zu den pelletierten Zellen wurde in folgender Reihenfolge zugegeben: 240 µL PEG-3350 (50% w/v), 36 µL 1 M LiAc, 25 µL ssDNA (2mg/mL), 50 µL ddH₂O und zuletzt 0.1-10 µg Plasmid-DNA. Es ist zu beachten, dass PEG-3350 zuerst zugegeben wird, da dieses die Zellen vor den toxischen Effekten des hoch konzentrierten LiAc abschirmt. Der Transformations-Mix wurde nun ca. 1 min gevortext, bis sich das Pellet komplett gelöst hatte und anschließend bei 30°C 30 min inkubiert. Die Zellen wurden nun einem Hitzeschock über 42°C für 20 min ausgesetzt, dann bei 6000 x g für 15 s zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in 1 mL ddH₂O resuspendiert und jeweils 100 bzw. 300 µL auf den selektiven Platten ausplattiert.

5.2.4.3 Transformation von *K. lactis*

Für die Transformation von DNA in *K. lactis* GG799 kompetenten Zellen, wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 620 µL NEB *Yeast Transformation Reagent* versetzt. Nach einer kurzen Durchmischung (nicht vortexen) wurde 1 µg des mit *SacII* linearisierten pKLAC1-Vektors, in den zuvor das Gen kloniert wurde, zu den Zellen gegeben. Nach kurzem Schütteln wurde die Mischung 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend einem 1-stündigem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt. Die Zellen wurden bei 7000 rpm für 2 min in einer Mikrozentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in

1 mL sterilem YPG-Medium resuspendiert, wiederum bei 7000 rpm für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Pellet in 1 mL YPG-Medium resuspendiert und in einem 14 mL Kulturröhrchen bei 250 rpm bei 30°C für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in ein steriles 1.5 mL Reaktionsgefäß transferiert, wiederum sedimentiert und das Zellpellet in 1 mL 1x PBS-Puffer zum Waschen resuspendiert. 100 µL der Zellsuspension wurden mit 50 µL sterilem bidest. H₂O versetzt und auf YCB-Agar (mit 5 mM Acetamid) ausgestrichen. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 30°C bildeten sich Kolonien aus.

5.2.5 Induktion der Proteinexpression von Fpg in *E. coli*

Von einer Agarplatte wurde ein Klon entnommen und damit eine 5 mL Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die ÜNK wurde bis zum nächsten Morgen bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Das als Vollmedium verwendete TB- oder LB-Medium wurde im Verhältnis 1:200 mit einer ÜNK überimpft und weiterhin bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0.6 wurde mit 1.0 mM IPTG der Promotor induziert; die Proteinexpression fand bei 30°C für 4 h statt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation im SLA-3000 Rotor (8 min, 8000 rpm) sedimentiert und mittels einer *French-Press* oder einem Durchflusshomogenisator (siehe Kapitel 5.2.8 und 5.2.9) aufgeschlossen bzw. -20°C gelagert. Die Proteinexpression von Fpg wurde für alle C-terminalen Strep-*tagII* und MBP-*tag* Varianten nach diesem Schema durchgeführt. Für die Induktion der Expression der Formamidopyrimidin Glykosylase mit N-terminalem Strep-*tagII* wurde 0.2 nM Anhydrotetracyclin verwendet und wie bereits beschrieben exprimiert.

5.2.6 Induktion der Proteinexpression von Rad14 in *E. coli*

Um Rad14 in *E. coli* zu exprimieren wurde von einer Agarplatte ein Klon entnommen und damit eine 5 mL Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die ÜNK wurde bis zum nächsten Morgen bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Das LB-Medium wurde im Verhältnis 1/200 mit einer ÜNK überimpft und weiterhin bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 1.0 wurde mit 1 mM IPTG der Promotor induziert; die Proteinexpression fand bei 25°C für 3 h statt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation im SLA-3000 Rotor (8 min, 8000 rpm) sedimentiert und mittels French-Press (siehe Kapitel 5.2.8) aufgeschlossen oder bei -20°C gelagert. Die Expression war für alle Rad14-Varianten identisch.

5.2.7 Hefe Induktion

Da *K. lactis* einen Galactose induzierbaren *LAC4*-Promoter aufweist, wurde jeweils eine Kolonie in 1 mL YPG-Medium überführt und ü.N. bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde eine größere Kultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und für zwei Tage in YPG-Medium bei 30°C inkubiert.

5.2.8 Aufschluss mit der French-Press

Sowohl Bakterien, als auch Hefen können mit der *French-Press* aufgeschlossen werden. Für Expressionsansätze bis zu 4 L wurden die pelletierten Zellen in dem jeweiligen Puffer und einer Tablette *Protease Inhibitor Complete* (Roche) resuspendiert und in den eisgekühlten Zylinder der *French-Press* gegeben, der maximal 30 mL fassen kann. Zuvor wurden alle Teile der *French-Press* die mit

der Zellsuspension in Berührung kommen auf Eis vorgekühlt. Der Stempel wurde langsam bei einem maximalen Druck von 1500 psi nach unten bewegt, wodurch die Zellsuspension auf einen Zapfen trifft und dort durch dort auftretende Scherkräfte zerplatzen. Durch ein Ventil wurden die aufgeschlossenen Zellen in ein auf Eis gelagertes Gefäß abgeführt. Dieser Vorgang wurde 4- bis 5-mal wiederholt. Der Zellaufschluss wurde bei 18000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte anschließend das gewünschte Protein isoliert werden.

5.2.9 Aufschluss im Durchflusshomogenisator

Der Durchflusshomogenisator wurde zum Aufschluss großer Expressionsansätze von 5 L bis 10 L verwendet (Bakterien und Hefe). Das Bakteriensediment der Proteinexpression wurde im jeweiligen Puffer mit einer Tablette *Protease Inhibitor Complete* (Roche) resuspendiert. Zum Kühlen des Systems wurde eiskalter Puffer durch den Homogenisator gepumpt. Der Homogenisator wurde aus der N₂-Hausleitung gespeist und hatte einen Eingangsdruck von 200 psi, welcher sich in der Homogenisatorkammer während des Aufschlusses auf 10000-15000 psi erhöht. Die Zellsuspension wurde in die Vorlagenkammer gegeben und durch Betätigung des Durchgangsventils durch den Homogenisator gepumpt. Dieser Vorgang wurde 2- bis 3-mal wiederholt. Der Zellaufschluss wurde bei 18000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Reinigungsschritte verwendet.

5.2.10 Alternative Hefe-Aufschluss-Methoden

Eine andere Methode des Aufschlusses von Hefe stellt die Verwendung von Glasperlen dar. Sie ist ebenfalls zum Aufschluss von großen Mengen geeignet, aber es können auch kleine Zellvolumina schnell und effizient aufgeschlossen werden. In diesem Fall wurden die Zellen (bis zu 5 mL) 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, mit 1 mL kaltem, sterilem ddH₂O gewaschen, in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µL 80°C vorgewärmten SDS-Auftragspuffer resuspendiert. Anschließend wurde 30 s gevortext und 100 µL in HCl gewaschene und gebackene Glasperlen (400-600 µm) zugegeben. Nun wurde 1 min gevortext, 2 min bei 95 °C inkubiert, wiederum 1 min gevortext und noch mal 2 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden die Glasperlen 5 min bei 13000 x g abzentrifugiert und 15 µL des Überstandes auf ein Gel aufgetragen.

Eine weitere Methode stellt der Zellaufschluß mit der Kugelmühle dar. Die Mahlbehälter einer Kugelmühle führen in horizontaler Lage kreisbogenförmige Schwingungen aus. Durch die Trägheit der Kugeln schlagen diese mit hoher Energie auf das an den abgerundeten Stirnflächen befindliche Probengut auf, wodurch dieses zerkleinert wird. Aufgrund der Becherbewegung und des Bewegungsablaufes der Kugeln findet gleichzeitig eine intensive Mischung statt. Durch Verwendung mehrerer kleiner Kugeln kann der Grad der Durchmischung noch erhöht werden. Bei der Verwendung von vielen kleinen Kugeln (z.B. Glasperlen) können z.B. auch eukaryotische Zellen aufgeschlossen werden. Dabei sorgt die große reibende Schlagwirkung zwischen den Kugeln für effektive Zellaufschlüsse.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 DNA – Isolierung

5.3.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte mit dem DNeasy Kit von Qiagen. Die Hefezellen wurden über Nacht in YPD-Medium bei 30°C inkubiert und bei 7500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600 µL Sorbitol-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 U *Lyticase* zugegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Spheroplasten wurden 10 min bei 300 x g zentrifugiert und in 180 µL ATL Puffer aufgenommen. 20 µL *Proteinase K* wurden zugegeben und unter gelegentlichem Schütteln bis zur vollständigen Lyse bei 55°C für 3 h inkubiert. Die komplette Lyse ist an der heller werdenden Flüssigkeit zu erkennen. Nun wurde 15 s gevortext, 200 µL Puffer AL zugegeben, gevortext und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 200 µL EtOH zugegeben, durch Vortexen intensiv gemischt und auf eine DNeasy Mini Spin-Säule gegeben. Nach Zentrifugieren bei 6000 x g für 1 min wurde der Durchbruch verworfen, die Säule in einen neuen 2 mL Behälter überführt und mit 500 µL Puffer AW1 gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min, der Durchbruch wurde erneut verworfen, die Säule in einen neuen 2 mL Behälter überführt und überschüssiges EtOH mit 500 µL Puffer AW2 ausgewaschen. Anschließend wurde 3 min bei 13000 x g zentrifugiert, die Säule in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µL Puffer AE eluiert, für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert und der letzte Schritt wiederholt.

5.3.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *L. lactis*

Die genomische DNA aus *Lactococcus lactis* (Subspezies cremoris SK 11) konnte mit dem DNeasy Kit von Qiagen isoliert werden. Hierfür wurden die Zellen im M17-Medium über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend 4000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180 µL Puffer EL und 90 µL Lysozym-Lösung wieder aufgenommen

und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µL Puffer AL sowie 25 µL Proteinase K. Die Probe wurde gevortext und für weitere 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µL absoluter EtOH zugegeben, gevortext und die Lösung auf eine DNeasy Mini Spin-Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 8000 rpm, wobei der Durchbruch verworfen wurde. Die Säule wurde dann in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µL Puffer AW1 gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 8000 rpm wurde der Durchbruch abermals verworfen und die Säule erneut in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß gegeben. Überschüssiges EtOH wurde durch Zugabe von 500 µL Puffer AW2 und anschließender Zentrifugation für drei Minuten bei 13000 rpm entfernt. Der Durchbruch wurde wieder verworfen und die Säule in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 100 µL Puffer AE auf die Säule mit anschließender Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm erfolgte schließlich die Elution. Dieser Letzte Schritt wurde nochmals wiederholt und letztendlich die isolierte DNA-Konzentration gemessen.

5.3.1.3 Midi-Plasmidpräparation von *E. coli*

Tabelle 5.8: Puffer für Plasmidisolierung.

Puffer I pH 8.0	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 mg/mL RNase A
Puffer II	200 mM Natriumhydroxid 1 % (w/v) SDS
Puffer III pH 5.5	3 M Kaliumacetat
DNA-Waschpuffer pH 6.5	1.0 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) Ethanol
Elutionspuffer-Puffer pH 8.5	10 mM Tris

Die Herstellung großer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAquick Midiprep Kit von Qiagen. Dazu wurden 50 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 5 mL einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 4 mL Puffer P1 resuspendiert. Das in dem Puffer P1 enthaltene EDTA komplexiert zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}), die für die Stabilität der bakteriellen Zellwand wichtig sind und diese dadurch destabilisiert werden. Durch die ebenfalls enthaltene RNase wird ein Großteil der bakteriellen RNA degradiert. Nach maximal 15 min wurden 4 mL des Lysepuffer P2 zugegeben, der aufgrund seiner stark basischen Eigenschaft chromosomale DNA, sowie Proteine denaturiert. Ebenfalls enthaltenes SDS löst als Detergenz die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände. Die Dauer der Inkubation ist für die Qualität der Plasmid-DNA wichtig, sie muss so gewählt werden, dass möglichst viel Plasmid-DNA, aber keine chromosomale DNA freigesetzt wird. Es wurde 4-mal invertiert, wobei eine klare Lösung entstand, welche exakt 4.5 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 4 mL eiskaltem Puffer P3 neutralisiert; nach 5-maligem Invertieren ist ein weißer Niederschlag zu erkennen, der 10 min auf Eis inkubiert wurde. Bei dem Niederschlag handelt es sich um einen schwerlöslichen Komplex aus dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats mit chromosomaler DNA und den daran gebundenen Proteinen. Der Niederschlag entsteht erst nach Zugabe von P3, da das Kaliumsalz einen schwerlöslicheren Komplex bildet als das in P2 vorhandene Natriumsalz. Anschließend wurde 45 min bei 4000 x g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand der die Plasmid-DNA enthält abgenommen und noch mal für 10 min zentrifugiert. Nachdem eine Qiagen Tip 100-Säule mit 4 mL eiskaltem Puffer QBT äquilibriert worden war, wurde der Überstand auf die Säule gegeben und zweimal mit je 10 mL Puffer QC gewaschen. Schließlich wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 5 mL Puffer QF eluiert, mit 3.5 mL *i*PrOH gefällt, 30 min bei 13000 x g zentrifugiert und mit 5 mL 70%igem EtOH gewaschen. Wiederum wurde für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert, das DNA-Pellet 1 h bei RT getrocknet und in 500 µL sterilem ddH₂O gelöst.

5.3.1.4 Mini-Plasmidpräparation von Plasmid DNA mittels Peqlab-Plasmid-Isolationskit

Die während der Klonierung erzeugten Plasmidkonstrukte wurden zunächst aus den zur Amplifikation herangezogenen *E. coli* Zellen isoliert. Dazu wurden 5 mL LB-Medium in einem 13 mL *Snap-Cap* mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien zentrifugiert (4000 rpm, 10 min), das Medium verworfen und das entstandene Sediment in 250 µL Puffer I resuspendiert. Diese 250 µL wurden in ein 1.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 250 µL Puffer II hinzugegeben und dreimal invertiert. Diese Reaktion wurde 2 min inkubiert und mit 350 µL Puffer III, nachdem dreimal invertiert wurde, abgestoppt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß in einer Tischzentrifuge mit 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine *HiBind*-Miniprep-Zentrifugensäule überführt und 1 min mit 10000 rpm zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde zweimal mit 750 µL DNA-Waschpuffer überschichtet und anschließend mit 10000 rpm 30 s erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut, zum vollständigen Entfernen des Puffers, 1 min mit 10000 rpm zentrifugiert. Die DNA auf der Säule wurde nun bei Raumtemperatur getrocknet und mit 30-40 µL Elutionspuffer 1 min bei 10000 rpm in der Tischzentrifuge eluiert. Die so isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

5.3.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit dem Qiagen Minelute Gel-Extraktions Kit

Tabelle 5.9: Puffer für DNA Extraktion aus Agarosegelen.

QG-Puffer	Zusammensetzung unbekannt
PE-Puffer pH 6.5	1.0 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) Ethanol
EB-Puffer pH 8.5	10 mM Tris

Die zu isolierende DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend nach dem Herstellerprotokoll weiterbehandelt. Dazu wurde die ausgeschnittene Bande in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, gewogen und mit dem dreifachen des Gewichtes an QG-Puffer behandelt. Im Anschluss wurde das Agarosegelstück im Thermoblock bei 50°C für 10 min inkubiert, so dass es sich vollständig auflöst. Zur pH-Wert-Kontrolle ist dem QG-Puffer Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt. Bei pH-Werten >7 konnte der pH mit 3 M Natriumacetat korrigiert werden. Isopropanol wurde im Verhältnis 1:1 zum Gelvolumen hinzugegeben und durch mehrmaliges invertieren gemischt. Die Probe wurde nun auf die Säule aufgetragen und 30 s bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die gebundene DNA 2-mal mit je 750 µL PE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde dazu jeweils 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun wieder getrocknet und die gebundene DNA mit 10 - 15 µL EB-Puffer eluiert.

5.3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Tabelle 5.10: Puffer für Agarosegelelektrophorese.

TAE-Laufpuffer	40 mM Tris-HOAc pH 7.5 1 mM EDTA
TAE-Gelpuffer	20 mM Tris-HOAc pH 7.5 0.5 mM EDTA
EtBr	1 mg/mL

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer Größe und Konformation durch Agarosegelelektrophorese getrennt werden. Es handelt sich hierbei um DNA-Fragmente der Größe von 0.1 bis 25 kbp. Es liegt eine Spannung von ca. 110 V längs der Laufrichtung an. Die DNA Fragmente wandern durch ein Agarosepolymer zur Anode und werden dabei in ihrer Laufgeschwindigkeit

beeinflusst (Siebeffekt). Kleine, kompakte DNA-Moleküle wandern dabei schneller als große, linearisierte DNA-Moleküle. Es wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße 0.8-2.0%ige Agarosekonzentrationen verwendet. Dem flüssigen Agarosegel wurden 0.1 µL EtBr/1 mL Agarosegel hinzugesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ist in der Lage in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Die Detektion erfolgt nach Anregung ($\lambda_{\text{abs}} = 300 \text{ nm}$) bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$. Die zur Ermittlung der Fragmentgröße verwendeten Standards sind in Kapitel 5.1.9 dargestellt.

5.3.2 DNA – Reinigung

5.3.2.1 QIAquick PCR Purification Kit

Um die DNA nach einer PCR-Reaktion von überschüssigen Salzen, insbesondere MgCl_2 , dNTPs und Polymerasen zu reinigen wurde der QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurde der Ansatz mit dem 5-fachen Volumen an PB Puffer versetzt, auf die QIAquick-Säule aufgetragen und mit einer Tischzentrifuge bei $13000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und die Säule mit 750 µL PE Puffer gewaschen, 1 min bei $13000 \times g$ abzentrifugiert, der Durchbruch verworfen und erneut zentrifugiert, um die letzten Reste des EtOH zu entfernen. Anschließend wurde die Säule in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 10 µL EB Puffer eluiert.

5.3.2.2 Reinigung nach enzymatischem Restriktionsverdau

Um dsDNA nach enzymatischen Reaktionen von Enzymen, Primern, Nukleotiden oder Salzen zu reinigen wurde der MinElute Reaction Cleanup Kit von Qiagen verwendet. Mit Hilfe dieses Kits können DNA-Fragmente der Größe von 70 bp bis 4 kb gereinigt werden. Zu einem Reaktionsvolumen von 20 µL wurden 300 µL ERC Puffer hinzugegeben, vermischt, auf eine Minelute Säule überführt und die DNA durch einen Zentrifugationsschritt bei $13000 \times g$ für 1 min an die Säule gebunden. Im Anschluß wurde die DNA mit 750 µL PE Puffer

gewaschen, 1 min zentrifugiert, der Durchbruch verworfen, und noch einmal für eine Minute zentrifugiert, um restliches EtOH zu entfernen. Die Säule wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 10 µL EB Puffer oder ddH₂O eluiert. Eine Elution mit H₂O bietet den Vorteil, dass nachfolgende enzymatische Reaktionen durch das im EB Puffer vorhandene EDTA nicht gestört werden.

5.3.2.3 Phenol - Extraktion

Bei der Phenol-Extraktion wurden Proteine und DNA durch ihre unterschiedliche Löslichkeit in Phenol bzw. Wasser voneinander getrennt. Hierzu wurde zu dem Ansatz, welcher die trennenden Komponenten enthielt, die gleiche Volumenmenge an TE-gepuffertem Phenol zugegeben und gut gemischt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurden die beiden Phasen getrennt und anschließend die untere organische Phase entfernt und verworfen. Auf die wässrige Phase wurde dieselbe Volumenmenge an 1:24 Isoamylalkohol/Chloroform gegeben, wiederum gut gemischt und wie oben beschrieben erneut zentrifugiert. Nach dem Entfernen der unteren organischen Phase wurde nochmals für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert um den Rest an organischer Phase abzunehmen. Anschließend wurde die DNA nach Kapitel 5.3.2.4 gefällt.

5.3.2.4 Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA

Um in einer wässrigen Phase DNA zu konzentrieren, wurde das 0.7 fache Volumen Isopropanol und das 0.1 fache Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) zugegeben. Alternativ wurde das 2.5 fache Volumen Ethanol und das 0.1 fache Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) zugegeben. Die Fällung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde jeweils für 30 min bei 13000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment zweimal mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellett wurde luftgetrocknet und je nach gewünschter Konzentration in ddH₂O oder TE gelöst.

5.3.2.5 Entsalzen von kurzen Oligonukleotiden mittels Sep-Pak

Das Entsalzen von Oligonukleotiden geschah mit C18 Sep-Pak Säulen von Waters (WAT051910). Zuerst musste die Säule konditioniert werden, indem 5-10 mL Acetonitril langsam durch die Säule gedrückt wurde. Anschließend wurde die Säule mit 20 mL ddH₂O gespült und durch Luftdurchdrücken getrocknet. Dann wurde langsam die DNA-Lösung auf die Säule gegeben (1 mL/min, max. 1 mL) und das Salz durch 5 mL bidest. H₂O gewaschen. Nun konnte die DNA mit einem Gemisch aus 80:20 Acetonitril/bidest. H₂O (3-5 mL) eluiert werden.

5.3.2.6 Reinigung von Oligonukleotiden mittels HPLC

Die Aufreinigung gekaufter oder selbst synthetisierter Oligonukleotide erfolgte mit 0.1 M TEAA in Wasser pH 7.0 (Puffer A), TEAA 0.1 M pH 7.0 in Wasser/Acetonitril 20:80 (Puffer B) und einem Gradienten von 5 – 22 % Puffer B in 50 min mit einer Flussrate von 5 mL/min durch eine Machery – Nagel Nucleodur 100-5 C18. Um die analytische Reinheit der Fraktionen sicherzustellen, wurden diese per HPLC mit demselben Puffersystem und Gradienten auf einer Macherey – Nagel Nucleodur 120-3 C18 kontrolliert und durch MALDI - TOF und ESI - MS analysiert.

5.3.2.7 Bestimmung der DNA Konzentration

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde das NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Pepqlab), sowie das BioPhotometer (Eppendorf) verwendet. Die Quantifizierbarkeit von Nukleinsäuren beruht auf folgender Beziehung:

$$1A_{260} = 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} dsDNA = 33 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} ssDNA = 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ in H}_2\text{O}$$

Der Reinheitsgrad der DNA kann über das 260/280nm Verhältnis bestimmt werden. Liegen die Werte im Bereich von 1.8 und 2.0 liegen keine bis wenige

Verunreinigungen vor. Werte oberhalb des Bereiches deuten auf RNA-Verunreinigungen, Werte unterhalb dieses Bereiches, auf Proteine oder Aromaten (Phenol) hin. Für die Messung wurden 2 µl der unverdünnten Probe auf die Messplatte des Spektrometers pipettiert.

5.3.3 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

5.3.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und bei dem enzymspezifischen Temperaturoptimum durchgeführt. Das Restriktionsenzym wurde mit 5-10 U pro µg DNA eingesetzt. In nachfolgender Tabelle ist ein Beispielansatz für einen Restriktionsverdau dargestellt.

Tabelle 5.11: Beispielansatz für einen Restriktionsverdau.

Restriktionsenzym 1 (10 U/µL)	1 µl
Restriktionsenzym 2 (10 U/µL, nur bei Doppelrestriktion)	1 µl
DNA (10 ng bis 1µg)	x µl
10x Puffer	2 µl
evtl. BSA, von Enzym abhängig (1 mg/mL)	2 µl
HPLC-H ₂ O	y µl
Gesamt	20 µl

Die Inkubationszeit betrug normalerweise 1 h. Bei gleichzeitiger Doppelrestriktion musste darauf geachtet werden, dass der verwendete Puffer für beide Enzyme eine maximale Aktivität zur Folge hatte, was aus den Herstellerangaben hervorging. Die Kontrolle der Restriktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

5.3.3.2 Klenow – Fill – In Reaktion

Um *sticky ends* mit dNTP aufzufüllen, wurde das *Klenow*-Enzym verwendet. Es handelt sich hierbei um das große Fragment der DNA Polymerase I, welches ein proteolytisches Produkt der Pol I ist, das die Polymeraseaktivität und 3'→5'-Exonukleaseaktivität noch besitzt, aber die 5'→3'-Exonukleaseaktivität verloren hat. Für einen Ansatz wurde die DNA mit 1 µL *Klenow*-Fragment und je 10 mM dNTP in einem geeigneten Reaktionspuffer versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend kann durch eine 20 minütige Inkubation bei 65°C das Enzym inaktiviert werden.

5.3.3.3 Dephosphorylierung von DNA

Selbstligation des linearisierten Plasmids wurde durch Dephosphorylierung der 5'-Enden unterdrückt. Dazu wurden 10 U *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) oder *Antarctic Phosphatase* nach der Restriktion in die gereinigte Reaktionslösung gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Da CIAP nicht durch Hitze inaktiviert werden kann, wurde die Reaktion durch Auftragen auf ein Agarosegel oder durch ein MinElute Reaction Cleanup Kit gereinigt. Die Verwendung der *Antarctic Phosphatase* bietet den Vorteil, dass diese bei 65°C in 5 min inaktiviert werden kann.

5.3.3.4 Phosphorylierung von DNA

Um DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können, müssen diese an ihrem 5'-Ende eine Phosphatgruppe besitzen. Die Phosphorylierung des 5'-Endes wurde durch die T4-Polynukleotid *Kinase* katalysiert. Diese transferiert die Phosphatgruppe der γ-Position von ATP an das 5'-Hydroxylende von ds- und ssDNA. Hierzu wurden 300 pmol DNA mit 10 U T4-Polynukleotid *Kinase* in 20 µL Reaktionsvolumen und 1 mM ATP bei 37°C für 4 h inkubiert und bei 65°C für 20 min Hitze inaktiviert.

5.3.3.5 Ligation von Plasmid DNA

Für Ligrationsreaktionen wurde die *T4 Ligase* (low oder high concentrated) von NEB eingesetzt. Die Verwendung der richtigen Konzentration der *Ligase* ist ein wichtiger Faktor bei einer erfolgreichen Ligation. Eine Ligation wurde in 20 µL Endvolumen in Ligasepuffer durchgeführt. Normalerweise betrug die Dauer der Ligation 16 h mit 1 U *Ligase* bei 16°C, im Falle der high concentrated *T4 Ligase*, verkürzte sich die Reaktionszeit auf 10 min. Noch wichtiger ist die Konzentration der DNA-Fragmente. Diese wurden in einer Konzentration eingesetzt, die von der Größe der Fragmente und der Art der Ligation abhängig ist. Für *blunt-end* Ligationen betrug das Verhältnis von Insert zu Vektor 5:1 und für *sticky ends* Ligationen 3:1. Ein Ansatz enthielt ca. 100 bis 1000 ng DNA und 1 U *Ligase*. Die ligierte DNA wurde im Anschluss direkt in die Bakterien transformiert.

5.3.4 PCR – Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction, PCR*) ermöglicht die gezielte Amplifikation von DNA-Sequenzen. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Duplikation der DNA-Sequenz unter Verwendung von zwei Primern, die komplementär zu den Enden der Templat-DNA sind. Nach einer Denaturierung der dsDNA bei 95°C entsteht ssDNA. Die Temperatur wird gesenkt, so dass sich die Primer, die in höheren Konzentrationen vorliegen, an die DNA-Matrix anlagern können (Annealing). Eine thermophile Polymerase kann an der 3'-OH-Gruppe des hybridisierten Primers binden und eine vom 5'- zum 3'-Ende komplementären Sequenz der Target-DNA synthetisieren (Extension). Die Primer müssen so orientiert sein, dass die Synthese der DNA-Moleküle aufeinander zu läuft. Die 25-100 fache Wiederholung dieses Zykluses ermöglicht eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnitts. Die Temperatur des Hybridisierungsschritts kann mit jedem Zyklus 0.2 bis 0.5°C abgesenkt werden (*Toch Down PCR*), was dazu führt, dass zunächst eine spezifische Bindung des Primers an sein Templat erfolgt. Wenn genug Templat

vorhanden ist, wird dadurch die Hybridisierungseffektivität erhöht. Die Annealingtemperatur der Primer lässt sich empirisch bestimmen (Tabelle 1 siehe Anhang). Dabei wird berücksichtigt, dass zwischen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrücken und zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Für die Ermittlung der Annealingtemperatur wird die Gesamtzahl der Nukleotide, sowie der Anteil an Guaninen und Cytosinen in einem Primer bestimmt. Die überhängenden Anteile werden dabei nicht berücksichtigt.

Die *Taq*-Polymerase wurde für die Analyse der Bakterien- oder Plasmid-PCR verwendet, während *AccuPrimePfx* und *PfuUltra* für die fehlerfreie Synthese der DNA-Sequenz verwendet wurden. Bei der Wahl des Puffers, der Zusammensetzung der Mischung und der Extensionstemperatur wurde auf die spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Polymerase eingegangen. Die PCR wurde standardmäßig mit vier verschiedenen DNA Templatkonzentrationen durchgeführt um den Erhalt des PCR Produktes sicherzustellen.

Tabelle 5.12: Beispiel eines Mastermix-Ansatzes.

Master Mix für 4 Ansätze:	
Puffer (10x)	10 µL
dNTPs (10 mM)	4 µL
Primer sense (10 µM)	4 µL
Primer antisense (10 µM)	4 µL
AccuPrime Pfx(15 U/µL)	2 µL
Gesamt	24 µL

Bei einem PCR-Ansatz wurden vier verschiedene DNA-Templat Konzentrationen von 1 ng bis 100 ng verwendet (siehe Tabelle 5.12 und Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13: Beispiel eines PCR-Ansatzes.

Master Mix	6 µL
DNA-Templat	x µL
HPLC-H ₂ O	y µL
Gesamt	20 µL

In nachfolgender Tabelle ist eine *Touch Down*-PCR beschrieben, welche zu höherer Spezifität und höheren Ausbeuten führt (Tabelle 5.14).

Tabelle 5.14: Stufen der PCR.

Stufe	Zyklen	Segment	Temperatur	Dauer
1	1		95°C	2:00 min
2	10	Denaturierung	95°C	0:10 min
		Annealing	T _m	0:30 min
		Extension	68°C	1:00 min/1 kbp
		Slope	-0.2°C/Zyklus	
3	25-30	Denaturierung	95°C	0:10 min
		Annealing	T _m -2°C	0:30 min
		Extension	68°C	1:00 min/1 kb
4	1		68°C	5:00 min
5	1	Hold	4°C	

Die Dauer der Primer-Verlängerung variiert je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks. Für 1000 bp wurden 60 s veranschlagt. Es wurden 25-30 Wiederholungen des Zyklus 3 durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 68°C, um nicht komplettierte Doppelstränge fertig zu synthetisieren.

5.3.5 Bakterien PCR

Nach Transformation der rekombinanten DNA in einen *E. coli* Stamm wurden die erhaltenen Klone geprüft, ob sie das gewünschte Insert enthalten. Dies erfolgte mit den Insert spezifischen Primern, mit denen das Insert durch PCR amplifiziert wurde. Dazu wurden Klone von einer Platte gepickt, in 15 µL ddH₂O aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeschlossen. Nach Zugabe von 7 µL des folgenden Ansatzes wurde eine PCR durchgeführt.

Tabelle 5.15: Beispiel eines Bakterien-PCR-Ansatzes.

Master Mix für 10 Ansätze:	
Puffer (10x)	20 µL
dNTPs (10 mM)	5 µL
Primer sense (10 µM)	5 µL
Primer antisense (10 µM)	5 µL
Taq (15 U/µL)	2 µL
ddH ₂ O	33 µL
Gesamt	70 µL

In nachfolgender Tabelle ist das verwendete Programm der PCR dargestellt.

Tabelle 5.16: Stufen der Bakterien PCR.

Stufe	Zyklen	Segment	Temperatur	Dauer
1	1		95°C	2:00 min
2	25	Denaturierung	95°C	0:10 min
		Annealing	T _m	0:30 min
		Extension	72°C	1:00 min/ 1 kbp
		Slope	-0.2°C/Zyklus	
3	25-30	Denaturierung	95°C	0:10 min
		Annealing	T _m -2°C	0:30 min
		Extension	72°C	1:00 min/ 1 kb
4	1		72°C	5:00 min
5	1	Hold	4°C	

5.3.6 Ortsspezifische Mutagenese

Durch die ortsspezifische Mutagenese können bis zu drei Basen einer dsDNA beliebig ausgetauscht werden. Dieser Methode bedient man sich, um gerichtet Aminosäuren auszutauschen, Stoppcodons zu entfernen bzw. auszubilden oder eine spontane Mutation wieder rückgängig zu machen. Dazu sind mehrere Schritte notwendig:

(1) PCR

Für die mutagene PCR dient ein Plasmid mit dem Zielgen als Templat. Die Primer sollten eine Länge von 25 bis 45 Basen haben, wobei die gewünschte Punktmutation bzw. das degenerierte Codon möglichst in der Mitte der Primer lokalisiert sein sollte. Folgende Bedingungen wurden für die PCR gewählt:

Master Mix für 3 Ansätze:

Puffer (10x)	7.5 µL
dNTPs (10 mM)	2 µL
Primer sense (10 µM)	1 µL
Primer antisense (10 µM)	1 µL
Pfu Turbo (2.5 U/µL)	0.5 µL
Gesamt	12 µL

Für die Ansätze wurden 1 µL, 1.5 µL und 2 µL Plasmid-DNA eingesetzt:

Master Mix	4 µL
DNA-Templat	x µL
HPLC-H ₂ O	y µL
Gesamt	25 µL

Im Folgenden ist das verwendete Programm aufgeführt.

Tabelle 5.17: Stufen der mutagenen PCR.

Stufe	Zyklen	Segment	Temperatur	Dauer
1	1		95°C	2 min
2	30	Denaturierung	95°C	0:30 min
		Annealing	58°C	0:30 min
		Extension	72°C	1:00 min/1 kbp
3		Extension	72°C	10 min
4	1	Hold	4°C	

(2) *DpnI* Restriktion

Nach der PCR wird das Plasmid-Templat, welches die ursprüngliche genetische Information trägt, enzymatisch verdaut. Da die in *E. coli* amplifizierte DNA (parentale DNA) in fast allen Fällen *dam*-methyliert vorliegt kann diese durch die *DpnI* Endonuklease verdaut werden (Erkennungssequenz: 5'-Gm⁶ATC-3').

(3) Transformation

Von dem Reaktionsansatz wurden 2 µL in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert, die in der Lage sind lineare ssDNA in zirkuläre dsDNA umzuwandeln. Aus den Kolonien wurden Übernachtskulturen angeimpft, die DNA isoliert und sequenziert.

5.3.7 Gateway® - Technologie

Die Gateway®-Technologie erlaubt einen schnellen und effizienten Transfer von DNA-Sequenzen in unterschiedliche Vektorsysteme zur Funktionsanalyse und Proteinexpression. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Amplifikation des Bakteriophagen Lambda (λ -Phagen) in *E. coli*. Die Rekombination des λ -Phagen setzt sich aus dem lysogenen und dem lytischen Zyklus zusammen. Der lysogene Zyklus wird durch das Phagenprotein *Integrase* (*Int*) und dem *E.*

coli Integration Host Factor (IHF) katalysiert. Die Integration findet zwischen spezifischen Erkennungssequenzen, *attP* auf der Phagen-DNA und *attB* auf dem *E. coli* Genom, statt. Nach der Integration flankieren *attL* und *attR* *Attachment-Sites* die Phagen-DNA. Im lytischen Zyklus wird mittels der λ -Phagen Enzyme *Int*, *Excisionase (Xis)* und dem *E. coli IHF* die Umkehrung der *Attachment-Sites* von *attL* und *attR* in *attB* und *attP* katalysiert. Bei der Verwendung von Primern, die bereits die *attB-sites* enthalten, kann das spätere PCR-Produkt in einer BP-Reaktion (lysogener Zyklus) in einen Entry-Vektor bzw. im nachfolgenden Schritt, der LR-Reaktion (lytischer Zyklus) in einen Expressionsvektor kloniert werden. Die kommerziell erhältlichen Enzym-Mischungen für BP- sowie LR-Reaktion erlauben Restriktion, Exzision und Ligation in einem Schritt. Zudem ermöglicht der Entry-Klon (BP-Reaktion) eine einfache Sequenzierung und den schnellen Wechsel zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Expressionssystemen ohne weitere Notwendigkeit der Sequenzierung.

5.3.7.1 BP-Reaktion

Das *attB*-flankierte PCR-Produkt oder ein linearisierter *attB*-Expressionsklon wird durch die BP-Reaktion in einen Donor-Vektor (pDONR201, pDONR207) integriert. Während der erfolgreichen Rekombination wird das *ccdB* Gen (*attP*-sites), welches für einen DNA-Gyrase-Inhibitor kodiert, durch das PCR-Produkt (*attB*) ersetzt. Ist dies nicht der Fall, wird nach der erfolgten Transformation das *ccdB* in *E. coli* translatiert, was zur Inhibierung des Zellwachstums führt. Die Enzyme *Int* und *IHF* nutzen die *Attachment-Sites* um das *attB*-flankierte PCR-Produkt mit dem *attP*-flankierten *ccdB* Gen auszutauschen. Dabei wird ein Teil der Erkennungssequenzen mit dem *ccdB* ausgeschnitten, der entstandene Entryklon beinhaltet das durch *attL*-sites flankierte PCR-Produkt. Das *ccdB* Gen mit *attR*-sites entsteht als Nebenprodukt (Abbildung 5.1).



Abbildung 5.1: Herstellung eines Entry-Klons mittels *BP*-Reaktion (Invitrogen, Online Katalog 2006).

Die Reaktion wurde in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt:

Tabelle 5.18: Beispiel eines *BP*-Reaktionsansatzes.

PCR-Produkt (15-150 ng)	x μ L
pDONR 201/207 (150 ng/ μ L)	1 μ L
TE-Puffer pH 8.0	y μ L
Gesamt	8 μ L

Der bei -80°C gelagerte *BP-Clonase II Mix* wurde auf Eis aufgetaut, 2-mal gevortext und 2 μ L zur Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde ü.N. bei 25°C im Thermomixer inkubiert und am darauf folgenden Morgen durch Zugabe von 1 μ L Proteinase K (10 min bei 37°C) abgestoppt. Je 2 μ L des Reaktionsansatzes wurden in einer Hitzetransformation in TOP10 oder *E. coli* Turbo gegeben. Die Selektion erfolgte auf kanamycinhaltigem Nährboden.

5.3.7.2 LR-Reaktion

Das PCR-Produkt, welches sich zwischen den *attL Attachment-Sites* im Entry-Vektor befindet wird im Anschluss in einen Destination-Vektor kloniert (LR-Reaktion). Diese Vektoren enthalten ebenfalls das *ccdB* Gen, welches hier wiederum durch die *Attachment-Sites attR* flankiert ist. Das Enzym *Xis* excisiert zunächst die *attR* und *attP*-sites flankierender DNA Fragmente, welche im Anschluss durch die umgekehrte Katalyse von *Int* und dem *IHF* ausgetauscht werden. Der Entry-Vektor erhält somit das *ccdB* Gen (*attP*-sites), der

Destination-Vektor wird zum Expressionsklon mit flankierenden *attB*-sites (Abbildung 5.2).

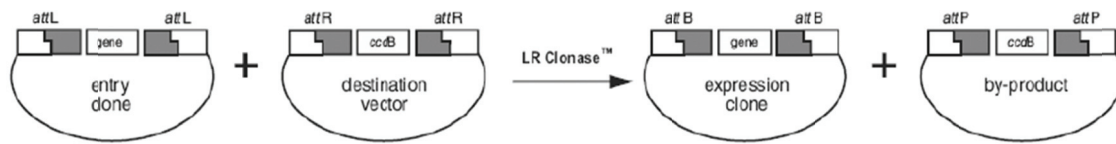


Abbildung 5.2: Herstellung eines Expressions-Klons mittels *LR*-Reaktion (Invitrogen, Online-Katalog 2006).

Die Reaktion wurde in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt:

Tabelle 5.19: Beispiel eines *LR*-Reaktionsansatzes.

pEntry (50-150 ng)	x μ L
pDest (150 ng/ μ L)	1 μ L
TE-Puffer pH 8.0	y μ L
Gesamt	8 μ L

Der *LR-Clonase II Mix* wurde auf Eis aufgetaut, 2-mal gevortext und 2 μ L des Enzym-Mix in zur Reaktion hinzugegeben. Die Reaktion wurde ü.N. bei 25°C im Thermomixer inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 μ L Proteinase K (10 min bei 37°C) abgestoppt. In Anschluss wurden 2 μ L des Reaktionsansatzes in 50 μ L *E. coli* DH5 α oder *E. coli* Turbo transformiert. Die Selektion erfolgte auf ampicillinhaltigem Medium. Die isolierten Plasmide konnten anschließend in verschieden Expressionsstämme transformiert werden.

5.3.8 Stargate® - Klonierung

Bei der Stargate®-Methode handelt es sich um ein von der Firma Iba GmbH entwickeltes Klonierungssystem, mit dem es möglich ist, ähnlich wie bei der Gateway-Technologie®, Gene über einen Donor-Vektor in verschiedenste Expressionssysteme einzuschleusen. Vorteile dieser neuartigen Klonierungsmethode sind die minimalen Modifikationen des Gens durch sehr kurze kombinatorische Sequenzen, eine hohe Klonierungseffizienz durch eine gerichtete Reaktion und die Variabilität des Fusionsproteins. Die Methode basiert auf der Generierung eines Donor-Vektors, indem das Gen einer PCR-Reaktion mit phosphorylierten Primern unterworfen und mit den kombinatorischen Sequenzen (Forward-Primer: 5'-Pho-ATGG... und Reverse-Primer: 5'-Pho-TCCC...) ausgestattet wird. Dieses wird in einer „Eintopf“-Reaktion durch die Star-Combinase® in einen Entry-Vektor eingebaut. Nachdem die richtige Sequenz verifiziert wurde, konnte das Gen in einen beliebigen Akzeptor-Vektor transferiert werden. Hierbei besteht die Möglichkeit verschiedene N- und C-terminale *tags*, verschiedene Promotoren und unterschiedliche Expressionssysteme zu verwenden.

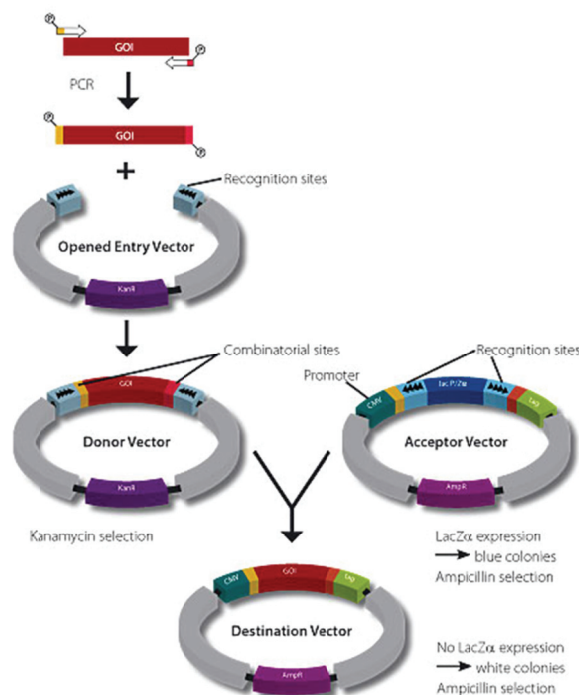


Abbildung 5.3: Prinzip der Stargate® – Methode (Iba GmbH, Online – Katalog 2008).

5.3.8.1 Generierung des Donor - Vektors

Das mit den kombinatorischen Seiten flankierte PCR-Produkt wurde in den Entry- Vektor pENTRY-IBA10 transferiert. Dabei bleibt zu beachten, dass in der Gensequenz sowohl das Startcodon, als auch das Stoppcodon weggelassen wurde, da diese durch die kombinatorischen Seiten geliefert werden. Um das Risiko einer Mutation zu minimieren, wurde eine *proof-reading high fidelity* Polymerase für die PCR verwendet. Anschließend wurde das PCR-Produkt über die Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 5.3.1.5 und 5.3.1.6) aufgereinigt und auf eine Konzentration von 4 bis 16 nM verdünnt. Das gereinigte PCR-Produkt (14 µL) wurde mit dem Entry-Vektor pENTRY-IBA10 (10 µL) gemischt und 1 µL der StarSolution E zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 22°C inkubiert. 10 µL dieses Ansatzes wurden zu kompetenten *E. coli* TOP10 gegeben und wie in Kapitel 5.2.3.4 beschrieben weiterbehandelt. Die so erhaltenen Plasmide wurden nun sequenziert und können für die Generierung eines Destinations-Vektors verwendet werden.

5.3.8.2 Generierung des Destinations - Vektors

Um das Gen in einen Destinationsvektor zu transferieren, wurden 12 µL des Donor-Vektors (2 ng/µL) mit 10 µL Akzeptor-Vektor und jeweils 1 µL der StarSolutions A1, A2 und A3 vorsichtig vermischt und 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, in *E. coli* transformiert. Der so gewonnene Destinations-Vektor wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert und kann für die Transformation in einen Expressionsstamm weiterverwendet werden.

5.3.9 Eukaryotische Proteinexpression mit *K. lactis*

Das *K. lactis* Proteinexpressions-Kit bietet eine einfache Methode für die Klonierung und Expression eines Gens in *Kluyveromyces lactis*. Proteine

können hierbei zum einen intrazellulär exprimiert werden, oder andererseits in das Medium sekretiert werden. Die Expression eines Gens geschieht mit Hilfe des Vektors pKLAC1, welcher einen *α -mating factor* für die Ausschleusung des Proteins trägt und einen *LAC4* Promoter aufweist, der für die Expression des Proteins in Anwesenheit von Galactose verantwortlich ist. Nachdem das Gen in den Vektor kloniert wurde, musste der Vektor mit *SacII* geschnitten werden, um eine lineare Expressionskassette zu erhalten. Diese konnte durch homologe Rekombination in das *K. lactis* Genom an der Stelle des *LAC4*-Promoters integriert werden. Da die Kassette stabil in das Genom integriert wird, kann die Expression in Vollmedium stattfinden. Um eine Selektion der das Plasmid tragenden Kolonien zu erhalten, trägt der Vektor ein Acetamidase Gen, das die Zellen befähigt auf Stickstoff-freiem Minimalmedium Acetamid zu Ammoniak zu spalten und dieses als Stickstoffquelle zu verwenden.

5.4 Proteinchemische Methoden

5.4.1 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteingemische wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dazu wurde ein diskontinuierliches System, bestehend aus Trenn- und Sammelgel verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in die Kammern gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet um eine gerade Kante zu erhalten. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel mit den Taschenformern auf das Trenngel gegeben. Die fertigen Gele wurden anschließend bei 4°C in feuchten Tüchern gelagert oder, zur umgehenden Verwendung, in die Elektrophoresekammern eingesetzt und die Apparatur mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Dabei werden Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch

Streckung der Moleküle gelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch die reduzierende Wirkung von β -Mercaptoethanol aufgespalten. Pro 1 g Protein binden ca. 1.4 g des anionischen Tensides SDS, so dass die Proteine eine konstante Eigenladung aufweisen. Maximal 15 μ L der behandelten Probe wurden pro Tasche auf das Gel geladen. Zusätzlich wurden 10 μ L des in Kapitel 5.1.9 aufgeführten Proteinstandards aufgetragen. Die Spannung betrug 120 V (konstant). Das Gel wurde anschliessend mit Coomassie gefärbt und überschüssiger Farbstoff durch Waschen in Entfärber entfernt.

Tabelle 5.20: Puffer für die SDS-PAGE.

5x SDS-Auftragspuffer pH 6.8	62.5 mM Tris 8 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS) 20 % (w/v) Glycerin 10 % (w/v) β -Mercaptoethanol 0.02 % Bromphenolblau 0.02 % Xylencyanol
Rotiphorese 30	30 % (w/v) Acrylamid 0.8 % (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer pH 8.8	1.5 M Tris
Sammelgelpuffer pH 6.8	0.5 mM Tris
10x SDS Laufpuffer	250 mM Tris 1.92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
SDS- Lösung	10 % (w/v) SDS
Färbelösung	0.25% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R250 9.20 % (v/v) Essigsäure 45.40% (v/v) Ethanol
Entfärbelösung:	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure

Tabelle 5.21: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

Trenngel				Sammelgel
Gelkonzentration	10%	12%	15%	5%
Aqua dest. (mL)	7.9	6.6	4.6	5.5
30% Rotiphoese (mL)	6.7	8	10	1.3
Trenn/Sammelgelpuffer (mL)	5	5	5	1
10%ige SDS-Lösung (µL)	200	200	200	80
10%ige APS-Lösung (µL)	200	200	200	80
TEMED (µL)	20	20	20	8

5.4.2 Western – Blot – Analyse

Tabelle 5.22: Puffer für Western – Blot.

Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM ε-Aminocapronsäure 0.1 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer I	300 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Ponceau S Lösung	0.02 % (w/v) Ponceau S 2 % (v/v) Trichloressigsäure

Die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden über ein elektrisches Feld im Semi-Dry-Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) auf eine Membran (Nitrozellulose) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion fixiert. Die Methode des Western-Blots ist eine der am häufigsten verwendeten Methode zur Identifikation und Detektion von Proteinen.

Dazu wurden sieben Whatman-Papiere (0.3 mm) und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Drei Whatman-Papiere wurden im Kathodenpuffer und jeweils zwei in Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde im Anodenpuffer II befeuchtet. Nach der Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel mit destilliertem Wasser abgespült und dann zwischen Membran und den Whatman-Papieren (mit Anodenpuffer II getränkt) positioniert. Die Whatman-Papiere wurden zuvor durch Abstreifen an der Gefäßkante von überschüssigem Puffer befreit.

Der Proteintransfer erfolgte bei einer der Gelgröße angepassten Stromstärke von 2.5 mA/cm^2 Gelfläche. Die Blotdauer betrug 1 h, wobei darauf zu achten war, dass die Spannung während des Transfers nicht über 25 V steigt, da es sonst zu einer Wärmeentwicklung und damit zu einer Schädigung des Proteins kommt. Um den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu kontrollieren, wurde eine Ponceau S Färbung durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Farbstoff, welcher die Proteine reversibel anfärbt.

5.4.3 Immunchemische Färbung für Proteine

Das auf der Membran immobilisierte Protein wird mittels einer indirekten Nachweismethode visualisiert, bei der ein spezifischer Antikörper an das Protein bindet. Dieser Antikörper fungiert als Antigen für einen Sekundärantikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert ist. Durch eine enzymatische Umsetzung mit BCIP/NBT wird diese Markierung sichtbar gemacht. Der Vorteil dieser indirekten Nachweismethode ist eine Steigerung der Intensität um das 50-100 fache. Neben dieser Methode gibt es auch *HRP* (*horseradish peroxidase*) markierte primäre oder sekundäre Antikörper, welche durch Chemilumineszenz mit Luminol sichtbar gemacht werden können.

Tabelle 5.23: Puffer für Immunchemische Färbung.

TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl
TBST-Puffer	1x TBS 0.1 % (v/v) Tween 20
TBST-Blotto	1x TBST 5.0 % (w/v) Magermilchpulver
PBS-Puffer	140 mM NaCl 10 mM KCl 6.4 mM Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄
PBST-Puffer	1x PBS 0.05% (v/v) Tween 20
PBS-Blotto	1x PBS 3.0 % (w/v) BSA
AP-Puffer	100 mM Tris pH 9.5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Stop-Puffer	200 mM pH 8.0 5 mM EDTA
NBT-Lösung	5.0 % (w/v) NBT 70.0 % (v/v) DMF
BCIP-Lösung	5.0 % (w/v) BCIP 100 % (v/v) DMF

Zunächst wurde die Membran dreimal 5 min mit 1x TBST gewaschen. Danach erfolgte ein einstündiges Blockieren mit TBST-Blotto, um freie Stellen auf der Membran abzusättigen und unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:800 in 5% Magermilchpulver in 1x TBST für 2 h zugegeben. Danach wurde für 5, 10, und 15 min mit 1x TBST gewaschen und der Sekundärantikörper in einer

Konzentration von 1:5000 für 1 h zugegeben. Anschließend wurde die Membran für 5, 10 und 30 min mit 1x TBST gewaschen und 10 min in AP-Puffer geschwenkt. Schließlich wurde in 25 mL AP-Puffer, 75 μ L BCIP-Lösung und 125 μ L NBT-Lösung inkubiert, bis die Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit dem Stop-Puffer beendet und der Blot mit Wasser gewaschen und an Luft getrocknet.

5.4.3.1 Immunchemische Färbung von Fpg

Um sicher zustellen, dass es sich bei der Bande bei 30 kDa um das Fpg-Protein handelt, wurde ein Western-blot mit einem Strep-tagII spezifischem Antikörper verwendet. Dazu wurde ein SDS-Gel mit dem aufgereinigten Fpg angefertigt und diese wie in Kapitel 5.4.2 dargestellt, auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Da Milchpulver eine der reichsten Quellen an Biotin ist, muss zum Blocken der Membran BSA verwendet werden. Andernfalls kommt es zu einer Reaktion des Strep-tags mit Biotin. Dazu wurde die Membran mit 20 mL 1 x PBS-Puffer (inklusive 3 % (w/v) BSA und 0.5 % (v/v) Tween20) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 3-mal je 5 min mit 40 mL 1 x PBST gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 10 mL PBST und Strep-tagII spezifischer Antikörper (Strep-tagII monoklonaler Antikörper, IBA, 2-1507-001) zu der Membran gegeben (Endkonzentration: 200 ng/mL) und für 60 min geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 3-mal je 5 min mit PBST gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 10 mL PBST und anti-Maus IgG1-AP (Endkonzentration: 1:5000) zu der Membran gegeben und für weitere 45 min geschüttelt. Dann wurde die Membran je zweimal mit PBST und PBS gewaschen und für die chromogene Reaktion mit 20 mL AP-Puffer vorbereitet. Die Sichtbarmachung der Banden wurde wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, durchgeführt.

5.4.3.2 Immunchemische Färbung von Rad14

Für die Detektion des Proteins Rad14, wurde die bereits beschriebene Vorgehensweise angewendet. Als primären Antikörper wurde der polyklonale Maus IgG1 Antikörper anti-Rad14 (ab22092, *Abcam*, Cambridge) in einer

Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, als sekundärer Antikörper anti-Maus IgG1-AP (Endkonzentration 1:5000).

5.4.3.3 Immunchemische Färbung von Rad4

Für die Immunchemische Färbung von Rad4 wurde der anti-His₆ Antikörper (*Acris*, Nr. AM05288PU-N) verwendet, als Sekundärantikörper wiederum anti-IgG1-AP und die bereits beschriebenen Schritte durchgeführt.

5.4.4 Proteinquantifizierung

5.4.4.1 Warburg – Formel

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge besitzen die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin ihr Absorptionsmaximum. Bei der statistisch ermittelten Anzahl an aromatischen Aminosäuren in einem Protein gilt, dass eine Absorptionseinheit bei 280 nm einer Konzentration von 1 mg/mL Protein entspricht. Die exakte Proteinkonzentration lässt sich durch Multiplikation mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten bestimmen. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz. Unter Berücksichtigung eventuell vorhandener Nukleinsäure- und Nukleotidverunreinigungen gilt folgender Zusammenhang:

$$\text{Proteinkonz.} = \text{Faktor} \times \text{Proteinkonz.} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

Für die Messung wird zunächst das Spektrometer mit dem Lagerpuffer des Proteins kalibriert. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss gegen diese Referenz gemessen.

5.4.4.2 Bradford – Assay

Das Prinzip des Bradford-Assays beruht darauf, dass der verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G 250 relativ unspezifisch an kationisch, unpolare und hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kommt. Die Bradford-Lösung (Biorad) wurde dafür 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt. Für die Bestimmung des Blank-Wertes, wurden 950 µL der Bradford-Lösung mit 50 µL des betreffenden Puffers versetzt. Die Probenvorbereitung zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie folgt:

Tabelle 5.24: Bradford – Ansatz.

Bradford-Lsg.	950 µL
Proteinlsg.	x µL
Puffer	y µL
Gesamt	1000 µL

5.4.5 Proteinreinigung

5.4.5.1 Strep-tagII Aufreinigung der Formamidopyrimidin Glykosylase

Tabelle 5.25: Verwendete Puffer.

Puffer A	100 mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer B	Puffer A 2.5 mM Desthiobiotin

Die hohe Bindungsselektivität des Strep-*tagII* an Streptavidin ermöglicht, im Vergleich zu anderen *tags* wie z.B. dem His₆-*tag*, eine höhere Reinigungseffizienz. Zudem treten bei der Elution des Proteins, wie im Falle von Imidazol, keine störenden Überlagerungen der Absorption bei 280 nm auf. Das lösliche Protein wurde mittels Superloop oder bei größeren Volumina, durch *Batch*-Inkubation an das Säulenmaterial gebunden. Bei der Batch-Inkubation wurde das lose Säulenmaterial für 2 Stunden mit der Proteinlösung bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend in eine XK16 Säule (GE) gepackt. Im Normalfall wurde die Proteinlösung über einen Superloop auf eine 5 mL *Strep-Tactin H-PR cartridge* (IBA) aufgetragen. Die Interaktion erfolgt, wie in Abbildung 5.4 dargestellt, zwischen Protein-Strep-*tagII* und dem auf dem Säulenmaterial immobilisierte Streptavidin. Ungebundenes Protein wurde im Anschluss mit Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B, der zusätzlich freies Desthiobiotin enthält. Dabei kommt es zur kompetitiven Verdrängung des gebundenen Proteins von der Säule. Alle Schritte wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min und 4°C durchgeführt, um eine vorzeitige Denaturierung des Proteins zu vermeiden. Die Fraktionsgröße betrug 1.0 mL. Das Eluat wurde vereinigt und mit 10 kDa Amicon® Ultra Zentrifugenfiltern (Millipore) auf ein Volumen von 500 µL aufkonzentriert und einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Die Reinigungen wurden mit dem ÄKTA Purifier (FPLC) von GE durchgeführt. Diese Methode wurde für die Wildtyp Variante von L/Fpg, sowie allen Mutanten mit C-terminalem Strep-*tagII* verwendet.

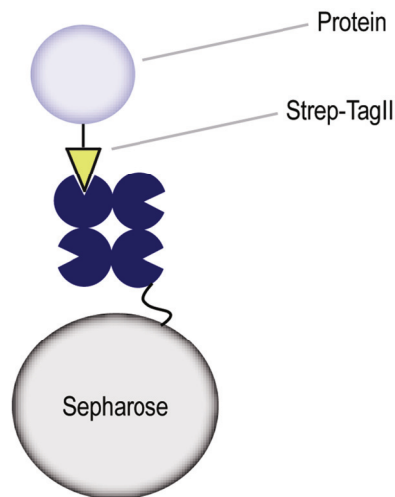


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung des Prinzips der Strep-*tagII* Reinigung.

5.4.5.2 Strep-*tagII* Aufreinigung von Rad14

Die Strep-*tagII* Aufreinigung des Proteins Rad14 (Volllänge und $\Delta 9\text{N}$ Rad14), sowie Rad14-DBD erfolgte analog der in Kapitel 5.4.5.1 beschriebenen Reinigung.

5.4.5.3 Strep-*tagII* Aufreinigung von Rad23

Die Strep-*tagII* Aufreinigung des Proteins Rad23 erfolgte analog der in Kapitel 5.4.5.1 beschriebenen Reinigung.

5.4.5.4 His₆-tag Aufreinigung von Rad4

Der Histidin-Linker ist ein weit verbreiteter *tag* bei rekombinanten Proteinen, da er eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber dem nativen Protein aufweist. Die Metall-koordinierenden Eigenschaften des Histidins werden sich bei der Immobilisierten Metallionen Affinitäts Chromatographie (IMAC) zunutze gemacht. IMAC wurde bereits 1975 zur Reinigung von Proteinen mit dem Chelatliganden Iminodiessigsäure (IDA) verwendet. Aufgrund der schlechten Ausbeuten wurde ein neuer metallchelatisierender Ligand wie Nitrilotriessigsäure (NTA) an einer Sepharose- oder Agarosematrix immobilisiert. Dieser Ligand besitzt vier komplexierende Stellen, die eine stabile Interaktion mit Ni^{2+} eingehen. Da Nickel jedoch sechs Koordinationsstellen

aufweist, sind zwei Stellen für die Bindung des Imidazolrings des Histidins frei. Ein Protein mit einer hohen Anzahl an frei zugänglichen Histidinen wird also besser binden, als ein Protein mit vereinzelt Histidinen im Inneren des Proteins. Die Elution der über die Ni-NTA Säule gereinigten Proteine erfolgte mit Hilfe von freiem Imidazol, welches kompetitiv um die Bindungsstellen des Ni^{2+} konkurriert und das Histidin verdrängt. Dazu wurde der Proteinüberstand in Puffer A auf den *Superloop* gegeben und die Reinigung mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt.

5.4.5.5 MonoQ-Aufreinigung von Rad23

Bei MonoQ-Säulen handelt es sich um starke Anionentauscher-Säulen; in diesem Fall wurde eine MonoQ 5/50GL-Säule von GE verwendet. Diese wurde zuvor mit 5 CV Puffer Rad23A äquilibriert und anschließend das Protein mit einem 500 μL Loop aufgetragen. Die Verunreinigungen wurden ausgewaschen und das Protein mit einem Gradienten von 0-100 % in 5 CV Puffer Rad23B eluiert. Die Elution von Rad23 erfolgte bei ca. 300 mM NaCl.

Tabelle 5.26: Verwendete Puffer für die Reinigung von Rad23.

Rad23A	50 mM Tris-HCl pH 7.5 50 mM KCl 1 mM EDTA 5 mM β -Mercaptoethanol 10 % Glycerin
Rad23B	Rad23A 800 mM NaCl

5.4.5.6 Heparin Aufreinigung der Formamidopyrimidin Glycosylase

Tabelle 5.27: Verwendete Puffer.

HepA pH 7.6	100 mM Tris-HCl pH 7.6 50 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 5% Glycerin
HepB pH 7.6	HepA 800 mM NaCl

Neben dem Einsatz als Antikoagulant wird das Glucosaminoglycan Heparin ebenfalls zur Reinigung von DNA-bindenden Proteinen herangezogen. Die Bindung der Proteine erfolgt aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem polyanionischen Charakter der Nukleinsäure. Die Interaktion kann durch Erhöhung der Ionenstärke geschwächt werden. Für die Affinitätsreinigung wurden HiTrap Heparin HP Säulen (GE) verwendet. Zunächst wurde die Säule mit 5 CV HepA Puffer äquilibriert, die Probe über den 500 µL Probenloop aufgetragen, Verunreinigungen ausgewaschen und das gebundene Protein mit einem linearen Gradienten von 0% - 100% HepB in 5 CV eluiert. Die Proteinfractionen wurden vereinigt und mit 10 kDa Amicon[®] Ultra Zentrifugenfiltern (Millipore) aufkonzentriert und in HepA umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit dem Nanodrop bestimmt; die Reinheit mit der beschriebenen SDS-PAGE kontrolliert.

5.4.5.7 Source 15S Aufreinigung der Formamidopyrimidin Glycosylase

Bei Source 15S handelt es sich um einen starken Kationentauscher basierend auf negativ geladenen Sulfatgruppen, welche auf einer Polystyren/Divinylbenzyl Matrix immobilisiert sind. Die Verwendung eines starken Kationentauschers bietet den Vorteil gegenüber einer Heparin-Säule, dass manche DNA bindende Enzyme stärker aufgereinigt werden können. Das lose Säulenmaterial (5 mL)

wurde in eine XK16 Säule (GE) gepackt und bei 4°C mit dem FSA-Puffer äquilibriert (5 CV). Anschließend wurde das bereits über eine Strep-tagII Säule gereinigte Protein über einen 500 µL Loop aufgetragen, Verunreinigungen ausgewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0-100 % FSB in 5 CV eluiert. Die Proteinfractionen wurden vereinigt, mit 10 kDa Amicon® Ultra Zentrifugenfiltern (Millipore) aufkonzentriert und in FSA umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit dem Nanodrop bestimmt; die Reinheit mit der beschriebenen SDS-PAGE kontrolliert. Das aufgereinigte Protein wurde mit einer Konzentration von 12 mg/mL bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 5.28: Verwendete Puffer.

FSA pH 7.6	100 mM Tris-HCl pH 7.6 50 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 5% Glycerin
FSB pH 7.6	HepA 800 mM NaCl

5.4.5.8 Source 15S Aufreinigung von Rad14

Tabelle 5.29: Verwendete Puffer.

RSA pH 7.6	100 mM Tris-HCl pH 7.6 50 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 5% Glycerin
RSB pH 7.6	HepA 800 mM NaCl

Die Reinigung von Rad14 mit einer Source 15S-Säule erfolgte analog zu der in Kapitel 5.4.5.7 beschriebenen Aufreinigung unter Verwendung der in Tabelle 5.29 angegebenen Puffer.

5.4.5.9 MonoQ - Aufreinigung des DNA bindenden Fragments von Rad14

Tabelle 5.30: Verwendete Puffer.

RSA pH 7.6	100 mM Tris-HCl pH 7.6 50 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 5% Glycerin
RSB pH 7.6	HepA 800 mM NaCl

Die Reinigung des DNA bindenden Fragments von Rad14 erfolgte analog der in Kapitel 5.4.5.5 beschriebenen Aufreinigung unter Verwendung der Tabelle 5.30 angegebenen Puffer.

5.4.5.10 Analytische- und Größenausschlusschromatographie

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass sie unabhängig von äußeren Faktoren, wie pH-Wert, Pufferzusammensetzung oder Temperatur ist. Gelfiltrationssäulen bestehen aus porösen und stark hydratisierenden Kügelchen aus einem Polymer wie Kohlenhydraten oder Polyacrylamid. Beim Auftragen der Proteine können Kleinere in die Hohlräume der Kügelchen eindringen, dabei verringert sich die Laufgeschwindigkeit der kleinen Proteine. Die größeren Proteine werden als erstes von der Säule gespült und es kommt zu einer Trennung der Größe nach. Die Gelfiltrationschromatographie wurde für die Aufreinigung unterschiedlicher Proteine eingesetzt; als Puffer wurde der jeweilige Lagerungspuffer des Proteins verwendet.

5.5 Kristallisationsexperimente

5.5.1 Kristallisation des DNA bindenden Fragments von Rad14

Erste Screenings wurden mit *NeXtal Matrix screens* (Qiagen) mit einer *CrystalEX 96 well sitting drop plate* (Corning, New York, USA) durchgeführt. Die 96 well Platten wurden mit dem *Hydra II* Proteinkristallisationsroboter (*Matrix Technologies Corporation*, Hudson, USA) pipettiert. Das Reservoirvolumen betrug dabei 100 μL , der Kristallisationsansatz 0.2 μL Protein-/DNA-Lösung und 0.2 μL Reservoirpuffer. Das DNA-bindende Fragment des Proteins Rad14 (Rad14-DBD) wurde mit dem AAF-Schaden in einem 16mer Oligonukleotid (ODN **36** und **37**) kristallisiert. Das molare Verhältnis von Protein zu DNA betrug 1:1.3, bei einer eingesetzten Protein-Konzentration von 5 mg/mL. Für das primäre Screening wurden drei verschiedene Screening Kristallisationskits von Qiagen verwendet (*NeXtal Tubes AmSO4 Suite*, *NeXtal Tubes Classics Suite* und *NeXtal Tubes PEGs Suite*). Erste Kristalle entstanden bei dem AmSO₄-Kit in Nr. 71 (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 3.2 M AmSO₄). Das *Refinement* fand in 24 well *hanging-drop* Linbro Platten (Hampton Research) mittels der *hanging-drop vapor diffusion* Methode statt. Dazu wurden 1 μL der Protein/DNA-Lösung (in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % Glycerin, 5 mM β -Mercaptoethanol und 10 μM ZnCl₂) mit 1 μL Kristallisationspuffer versetzt. Als Protein/DNA-Lösung wurden 20 nmol DNA und 16 nmol (290 μM) Protein in 20 μL Puffer verwendet. Nach 2 Monaten bei 18°C waren erste Kristalle bei den Bedingungen 0.08 M Tris-HCl pH 8.0 und 3.2-3.4 AmSO₄ sichtbar. In Tabelle 6.11 sind die DNA-Stränge beschrieben, welche für die Kristallisation verwendet wurden.

5.5.2 Kristallisation der Formamidopyrimidin Glykosylase

Für die Kristallisation von Fpg wurden Crystalgen SuperClear™ Platten (pregreased, 24 well) von Jena Bioscience verwendet. Das Kristallwachstum erfolgte auch hier durch die *hanging vapor diffusion* Methode. Das Reservoirvolumen betrug 500 µL, der Kristallisationsansatz 1 µL Protein/DNA-Gemisch und 1 µL Reservoirpuffer mit einem molaren Verhältnis von Protein zu DNA von 1:1.3. Die Proteinkonzentration betrug 12.0 mg/mL in dem FSA Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT und 5% Glycerin). Die DNA wurde zuvor mittels Sep-Pak® Säulen entsalzt, lyophilisiert und in einem geeigneten Volumen an Puffer FSA aufgenommen. Bevor DNA und Protein zusammen gegeben wurden, mußten beide zentrifugiert werden, um etwaige Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden beide in einem Reaktionsgefäß vermischt und bis zur Kristallisation auf Eis gelagert (ca. 5 min). Die Platten wurden für ca. 3 Wochen bei 18 °C gelagert.

5.6 Biochemische Methoden

5.6.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Native, nicht denaturierende Gele wurden für EMSA-Experimente (Kapitel 5.6.4.1 und 5.6.4.2) benutzt. Bei der nativen Gelelektrophorese können DNA-Protein-Komplexe als intakte Einheiten von der freien DNA abgetrennt werden. Durch den Käfigeffekt und die nicht-denaturierenden Bedingungen bleiben auch schwächere DNA-Protein-Komplexe während der Elektrophorese erhalten. In Tabelle 5.31 ist die Zusammensetzung für 2, 4 und 6 native Polyacrylamidgele angegeben.

Tabelle 5.31: Zusammensetzung eines 4% nicht-denaturierenden Gels.

Anzahl Gele	2	4	6
Aqua dest. (mL)	15.5	23.25	31
30% Rotiphorese (mL)	3	4.5	6
10 x TBE (mL)	1	1.5	2
Glycerin (µL)	500	750	1000
10%ige APS-Lösung (µL)	150	225	300
Temed (µL)	10	15	20

5.6.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Denaturierende TBE Gele wurden zur analytischen Trennung von kurzen DNA-Fragmenten verwendet. Mit Hilfe dieser Gele ist es möglich eine Auflösung von einer Base zu bekommen. Die Zusammensetzung ist in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 5.32: Zusammensetzung denaturierender Polyacrylamidgele.

Acrylamid-Konzentration (%)	8	12	20
25 % Rotiphorese			
Sequenziergel (mL)	3.2	4.8	8.0
Verdünner	5.8	4.2	1.0
10 x TBE (mL)	1.0	1.0	1.0
10%ige APS-Lösung (µL)	50	50	50
Temed (µL)	5	5	5

5.6.3 Aktivitätsassays der Formamidopyrimidin Glycosylase

Zur Untersuchung der Aktivität von Fpg wurden verschiedene Varianten des Proteins mit geschädigter DNA zusammengegeben. In dem Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 % Glycerin) wurden 40 µM dsDNA mit 3.2 µM Fpg in einem Volumen 10 µL für 30 min bei

30°C inkubiert. Nach Zugabe des Formamidauftragspuffers (2 µL) wurde der Reaktionsansatz auf einem 20 %igem denaturierenden Gel untersucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 6.1.3 dargestellt.

5.6.4 *Electromobility shift assays (EMSA)* mit Rad14

Die Interaktionen von Proteinen mit DNA spielt eine zentrale Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie z.B. DNA Replikation, Rekombination, Reparatur und Transkription. Eine der wichtigsten Methode zur Untersuchung dieser DNA-Protein-Interaktionen ist der *electromobility shift assay*. Das Prinzip des EMSA, auch *band shifts* oder *gel retardation assays* genannt, beruht darauf, dass DNA-Protein-Komplexe in einer elektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als die freie DNA. Die Auftrennung wird auf einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Quervernetztes Polyacrylamid bietet, im Gegensatz zur Agarose, den Vorteil der schärferen Trennung der Komplexe, sowie die Stabilisierung der DNA-Proteinkomplexe um den Faktor ~ 40 durch den Käfigeffekt des Polyacrylamids.

Bei einem EMSA-Experiment müssen sehr viele Reaktionsparameter optimiert werden. Dies ist nötig, da sehr viele Faktoren den DNA-Protein-Komplex beeinflussen, darunter fallen die Zeit und Temperatur der Inkubation, der pH-Wert, die Ionenstärke und generell die Zusammensetzung des Bindungspuffers. Aber auch bivalente Ionen, wie z.B. Mg^{2+} beeinflussen die Dissoziationskonstante des Komplexes. Falls es sich um weniger stabile Komplexe handelt, müssen diese durch z.B. Glutaraldehyd stabilisiert werden. Um eine sensitivere Detektion zu erreichen wird die DNA normalerweise radioaktiv markiert. DNA kann aber auch mit SYBR Green II angefärbt oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein, AlexaFluor 555 oder Atto 550) versehen werden.

5.6.4.1 Fluoreszenz markierte EMSA

Für diese Art der *electromobility shift assays* wurde der Gegenstrang am 5'-Ende mit Fluorescein markiert. Der Gegenstrang und der geschädigte bzw. ungeschädigte Strang wurden in äquimolarem Verhältnis gemischt, auf 80°C erhitzt und langsam (1°C/min) auf 4°C abgekühlt, um die Ausbildung des Doppelstrangs zu ermöglichen. Das Vorhandensein des Duplexes wurde mithilfe von nativen Gelen kontrolliert. Ein typischer Bindungsassay besteht aus 40 µM dsDNA, steigender Konzentration an Rad14 in dem in Tabelle 5.33 dargestellten Puffer mit einem Endvolumen von 10 µL. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert, mit dem Auftragspuffer versetzt und auf ein 12%iges natives Polyacrylamidgel gegeben (100 V, 45 min, 4°C, Laufpuffer: 1 x TBE).

Tabelle 5.33: Verwendete Puffer.

Bindungspuffer	25 mM Hepes KOH pH 8.3 100 mM KCl 4 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM DTT 45 µg/mL BSA 10 % (v/v) Glycerin
Auftragspuffer	250 mM Tris – HCl pH 7.5 40 % Glycerin 0.2 % Bromphenolblau)

5.6.4.2 Radioaktiv markierte EMSA

Zunächst wurde der ungeschädigte Gegenstrang mit der T4 Polynukleotid *Kinase* mit [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) am 5'-Ende markiert. Anschließend wurden die ungeschädigten und geschädigten Oligonukleotide mit ihrem markiertem komplementären Strang in einem äquimolaren Verhältnis vermischt und hybridisiert. Dazu wurde ein 30 µL Ansatz (1 pmol dsDNA im Bindungspuffer) auf 80°C erhitzt und langsam abgekühlt. Die Bildung des Doppelstrangs wurde per nativer Gelelektrophorese kontrolliert. Ein typischer Bindungsassay (9 µL, siehe Tabelle 5.34) bestand aus 33 fmol dsDNA und einer ansteigenden Konzentration an Rad14 im Bindungspuffer (siehe Tabelle

5.33). Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 30°C wurde 1 µL Auftragspuffer zugegeben und die Elektrophorese auf einem 4 % nicht-denaturierendem Gel durchgeführt (100 V konstant, 60 min, 4°C). Das Gel wurde zuvor 30 min bei 100 V laufen gelassen und als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die Analyse des Gels geschah mit Hilfe eines PhosphorImagers, dem StormTM 860 von GE.

Tabelle 5.34: Zusammensetzung des Bindungsassays.

Radioaktiv markierte dsDNA (33 fmol)	1 µL
Rad14 (23 pmol)	x µL
Bindungspuffer	y µL
H ₂ O	z µL
Gesamt	9 µL

Für die Bestimmung der Bindungsaffinitätskonstante wurde ein Reaktionsansatz (siehe Tabelle 5.35) mit 33 fmol dsDNA, einer steigenden Menge an unmarkierter dsDNA als Kompetitor und 23 pmol Rad14 für 30 min bei 30°C im Bindungspuffer inkubiert. Anschließend wurde wiederum 1 µL Auftragspuffer zugegeben und auf einem 4 % nativem Polyacrylamidgel bei 100 V für 60 min analysiert. Die Visualisierung geschah mit einem StormTM 860 Phosphorimager von GE.

Tabelle 5.35: Zusammensetzung des kompetitiven Assays.

Radioaktiv markierte DNA (33 fmol)	1 µL
Kompetitive DNA	x µL
Rad14 (23 pmol)	1 µL
Bindungspuffer	y µL
H ₂ O	z µL
Gesamt	9 µL

5.6.5 Fluoreszenz-Polarisationsmessungen

Die Grundlagen der Fluoreszenzpolarisation wurden erstmals 1926 von *Perrin* beschrieben^[195] und später durch *Dandliker* und dessen Mitarbeiter weiterentwickelt.^[196,197] Diese Methode ermöglicht es, Informationen über DNA-Protein-Interaktionen direkt in Lösung zu erhalten. Regt man ein Fluorescein-markiertes Molekül mit linear polarisiertem Licht an, so wird Licht in der gleichen Ebene emittiert, so lange sich das Molekül während der Anregung stationär verhält (4 ns für Fluorescein). Rotiert das Molekül hingegen während der Anregung aus dieser Ebene heraus, so wird das Fluoreszenzlicht in eine andere Ebene als die Anregungsebene emittiert. Regt vertikal polarisiertes Licht den Fluorophor an, so kann die Intensität des emittierten Lichtes in eine vertikale und horizontale Ebene eingeteilt werden, wobei diese Verteilung von der Mobilität des Fluorescein-markierten Moleküls abhängt. Ist ein Molekül sehr groß, weist es eine geringe Mobilität während der Anregung auf, wobei dies eine hohe Polarisation des emittierten Lichtes zur Folge hat. Ist ein Molekül dagegen sehr klein, so rotiert es schneller und das Licht wird relativ zur Anregungsebene depolarisiert. Die Fluoreszenzpolarisation ist durch folgende Gleichung gegeben:

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

Dabei ist I die Intensität bei parallelen Anregungs- und Emissionspolarisatoren und I_{\perp} die Intensität bei perpendikularen Anregungs- und Emissionspolarisatoren. Vereinfacht dargestellt, weist freie DNA eine geringere Polarisation auf als ein DNA-Protein-Komplex. Somit bietet die Fluoreszenzpolarisation die Möglichkeit, Bindungsstudien zwischen DNA-bindenden Proteinen und DNA, sowie in diesem speziellen Fall zwischen dem Rad14-Protein und unterschiedlichen DNA-Schäden durchzuführen. Die Fluoreszenzpolarisations-Messungen wurden in dieser Arbeit mit dem

GeniusPro Fluoreszenzphotometer der Firma Tecan durchgeführt. Hierbei musste man berücksichtigen, dass Spiegel und Monochromatorgitter des Gerätes selbst schon einen Einfluss auf die Polarisierung haben, so dass der Geräte-Faktor von reinem Fluorescein zunächst auf 1.1079 bestimmt wurde und die Messwerte damit korrigiert worden sind. Für die Messungen wurden 8 ng der zu untersuchenden DNA mit steigender Rad14-Konzentration für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm wurden die Proben schließlich bei 30 °C vermessen. Als Reaktionspuffer wurde der in Tabelle 5.33 beschriebene Bindungspuffer in einem Volumen von 100 µL verwendet.

5.6.5.1 Photoaffinity labeling von Proteinen

Zur Durchführung der Belichtungsexperimente wurden zunächst die Duplex-DNA-Sonden hergestellt. Hierzu wurden äquimolare Mengen des Diazirinstrangs mit einem der geschädigten Stränge (ODN **30** und **31**, siehe Abbildung 6.28) und dem ungeschädigten Strang (ODN **32**) hybridisiert. Danach standen die Doppelstränge für die weiteren Versuche zur Verfügung.

Photoaffinity labeling-Experimente wurden sowohl mit dem gereinigten Fpg, als auch mit den gereinigten rekombinanten Proteinen Rad14 bzw. Rad23 durchgeführt.^[169] Hier soll jedoch nur auf die für die *NER*-Schadenserkennung wichtigen Proteine Rad14 und Rad23 eingegangen werden. Für die *Labeling*-Experimente wurden bei 0 °C je 50-100 pmol des DNA-Duplexes (ODN **30-32**) in ein 0.2 mL-PCR-*Eppendorf*-Gefäß gegeben und je 5-10 µg des Proteins hinzugesetzt. Mit dem *Photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Nonidet P-40, 0.2 µg/mL BSA und 50 ng/µL *calf thymus* DNA (Sigma)) wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µL verdünnt. Die Ansätze (DNA-Endkonzentration 500 nM-1 µM) wurden 30 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert und anschließend für 30-60 min bei 365 nm belichtet. Die Lösungen wurden in *Biomax*-Zentrifugationsfiltersäulen (Millipore, 100 µL Fassungsvermögen,

MWCO 10 kDa) umpipettiert und diese bei 3500 rpm bei 4 °C aufkonzentriert, bis ein Volumen von 30 µL erreicht war (ca. 30 min). Es wurden 6 µL 5x-SDS-Auftragspuffer zugesetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Proben danach kurz auf Eis abgeschreckt. Je 10 µL der Proben wurden dann per SDS-PAGE analysiert. Zur Detektion der Fluoreszenz wurden die Gele unter einem *LAS3000-Imager* (Raytest) betrachtet, anschließend mit Coomassie Blue angefärbt.

5.7 Analytische und Präparative Methoden

5.7.1 Messung der Schmelzpunktkurven von Oligonukleotiden

Schmelzpunkte der Doppelstränge wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit einer Temperaturkontrolle, Transporteinheit und einem *MultiCellBlock* durchgeführt. Der Temperaturgradient betrug 0.5°C/min bzw. 1.0°C/min. Es wurden pro Messung je 5 Abkühlkurven (85 °C → 0 °C) und 5 Aufheizkurven (0 °C → 85 °C) bei 260 nm und 420 nm aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte hierbei in einer Referenzküvette. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült, um ein Beschlagen der Küvetten bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Es wurden Küvetten der Fa. Hellma mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang verwendet. Für die Schmelzkurven wurden 5 pmol DNA-Duplexlösungen in einer Lösung mit 150 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl pH 7.4 angesetzt. In den Küvetten wurden die Lösungen mit Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Die Auswertung der Messungen erfolgte unter Verwendung von Microcal Origin. Hierzu wurden die erhaltenen Kurven bei 260 nm gemittelt und hiervon die gemittelte Hintergrundmessung bei 420 nm subtrahiert. Die so erzeugte Kurve wurde durch ein Polynom approximiert, die Nullstelle der 2. Ableitung der Näherungsfunktion stellt den gesuchten Schmelzpunkt dar.

5.7.2 Tryptischer Peptidverdau

Der tryptische Peptidverdau ist eine weit verbreitete Technik in der Proteomforschung, um Proteine in einem Gel in Peptide zu verdauen, welche dann einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen werden können. Trypsin ist hierfür besonders geeignet, da es eine definierte Spezifität aufweist, nämlich nur die Peptidbindungen zu hydrolysieren, bei welcher die Carbonylgruppe an einem Arginin oder Lysinrest hängt. In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 5.36: Verwendete Lösungen.

Ammoniumbicarbonatlösung	40 mM NH_4HCO_3 25 mM NH_4HCO_3
DTT-Lösung	10 mM DTT
Iodacetimidlösung	55 mM Iodacetimid
Trypsinlösung	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trypsin (Promega) 50 mM Essigsäure

5.7.2.1 Waschen der Gelstücke

Zur Identifizierung der Proteine wurden die Banden aus einem SDS-Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, 2-mal mit je 200 μL ddH₂O und 2-mal mit je 200 μL 40 mM Ammoniumbicarbonatlösung für jeweils 30 min bei 37°C im Thermomixer (600 rpm) gewaschen. Anschließend wurde 2-mal mit je 200 μL 40 mM NH_4HCO_3 / Acetonitril 1:1 (v/v) für 5 min bei 37°C gewaschen. Die Lösung wurde abgenommen und restliches Acetonitril bei RT evaporiert. Im Anschluss wurden die Gelstücke in 100 μL 40 mM NH_4HCO_3 -Lösung für 5 min rehydriert, dann 100 μL Acetonitril-Lösung dazugegeben und erneut 5 min inkubiert, die Lösung abgenommen und die Gelstücke für 10 min mit Acetonitril überschichtet. Überschüssiges Acetonitril wurde in der *SpeedVac* entfernt.

5.7.2.2 Reduktion der Disulfidbrücken

Für die Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten wurden die Gelstücke in 100 µL 40 mM NH_4HCO_3 -Lösung mit 10 mM DTT bei 56°C für 45 min inkubiert, anschließend die Lösung auf RT abgekühlt und der Überstand abgenommen.

5.7.2.3 Alkylierung der Cysteinreste

Die freien Cysteinreste wurden im nächsten Schritt in 100 µL frisch angesetzt 55 mM Iodacetamidlösung in 40 mM NH_4HCO_3 -Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln alkylt. Die Lösung wurde abgenommen und die Gelstücke 2-mal in je 200 µL 40 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril 1:1 (v/v) für 15 min gewaschen, mit 100 µL Acetonitril für 10 min überschichtet und das Gel in der *SpeedVac* für 10-15 min getrocknet.

5.7.2.4 In-gel Verdau

Im Anschluss wurde 1 µL Trypsinlösung (Promega) auf das Gel pipettiert und 3 min bei 37°C inkubiert, bevor das Gel mit 40 µL 40 mM Ammoniumbicarbonatlösung überschichtet wurde und ü.N. bei 37°C und 200 rpm im Thermomixer geschüttelt wurde.

5.7.2.5 Extraktion der Peptide

Am nächsten Tag wurde die Ammoniumbicarbonatlösung abgenommen und bei 4°C gelagert. Für die Extraktion wurden nacheinander 100 µL 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung, 100 µL Acetonitril zu den Gelstücken gegeben und jeweils 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und ebenfalls bei 4°C aufbewahrt. Dieser Schritt wurde mit 5 %iger Ameisensäure und Acetonitril wiederholt. Der Überstand wurde mit den zuvor bei 4°C gelagerten Fraktionen vereinigt und in der *SpeedVac* auf ca. 40 µL aufkonzentriert.

5.7.3 MALDI-TOF und LC-MS

Das intakte Protein und auch die Peptidfragmente wurden mit ZipTip® C4 bzw. C18 Pipettenspitzen nach Herstellerangaben entsalzt und mit zwei verschiedenen Matrices auf einem Stahltarget (Bruker Daltonics Inc.) zur Kristallisation gebracht. Dazu wurde je 1 µL der Probe mit 1 µL der Matrix zusammengegeben. Als Matrix wurde für die Peptidfragmente eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 30 % Acetonitril verwendet. Um intakte Proteine zu messen, wurde als Matrix eine gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 20 % Acetonitril verwendet. Die auskristallisierten Proben wurden mit einem *AutoflexII* MALDI-TOF von *Bruker Daltonics Inc.* gemessen. Die Proben wurden mit etablierten Methoden im Positiv-Modus gemessen. Die erhaltenen Daten des Peptidfingerprints wurden mit dem Programm Mascot (Matrixscience) und Biotoools (Bruker Daltonics Inc.) bearbeitet und mit Datenbanken abgeglichen.

Die Peptidfragmente des tryptischen Verdaus wurden aufgrund der höheren Auflösung auch mit einem LC-MS in der Gruppe von *Prof. Dr. Stephan Sieber* gemessen. Dazu wurde die Peptidlösung auf einer *Dionex C18 Nano Trap Column* (100 µm) entsalzt und das Eluat anschließend mit einer *Dionex C18 PepMap 100* (3 µm) aufgetrennt. Die Peptidfragmente wurden durch Tandem MS sowie hoch-auflösender MS auf einem gekoppeltem *Dionex Ultimate 3000 LC-ThermoFinnigan* LTQ-FT MS System analysiert. (Elutionspuffer A: MeCN/H₂O und Puffer B: MeCN/H₂O, 5 % Ameisensäure; Gradient: 5 % Puffer B für 5 min, 5-60 % B in 65 min; 60-95 % B in 1 min Gesamtzeit/Lauf: 95 min) Die MS Daten wurden auf Basis des SEQUEST Algorithmus gegen die entsprechende Datenbank der „bioworks“ Software ausgelesen.

5.8 Statistische Methoden

Die statistischen Daten zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Rad14 wurden mit dem Programm *SigmaPlot11* von *Systat* ermittelt. Es wurde ein Algorithmus für eine homologe kompetitive Bindung angenommen (*one site competition experiment*). Dem wurde zugrunde gelegt, dass nicht radioaktiv markierte DNA, radioaktiv markierte DNA, also das gleiche Substrat kompetitiv verdrängt. Die Kurve wurde mit folgender Gleichung ermittelt:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + 10^{x - \log EC50}} \quad (\text{Equation 1})$$

5.9 Synthese der DNA für Electromobility shift assays und Kristallisationen

Das AAF-dG Phosphoramidit enthält für die DNA-Festphasensynthese eine Isopropylphenoxyacetyl-Gruppe an der N2 Position und wurde nach Gillet *et al.* synthetisiert.^[198] Der Einbau in die DNA geschah durch „ultra milde“ Bedingungen^[119] für DNA Synthese. AF-dG enthaltene Oligonukleotide wurden präpariert, indem AAF-dG enthaltene Oligonukleotide mit einer Lösung bestehend aus 1 M NaOH und 0.25 M β-Mercaptoethanol für 3 h bei 37°C nach einer veröffentlichten Prozedur behandelt und per HPLC aufgereinigt wurden.^[199] AAP-dG wurde analog der bereits beschriebenen Prozedur von AAF-dG synthetisiert. Das (6-4)-Photoprodukt wurde wie kürzlich veröffentlicht hergestellt.^[21] Das CPD Phosphoramidit wurde von *GlenResearch* (Sterling, Virginia) bezogen und per Standard-Festphasensynthese eingebaut (16mer). Das CPD Phosphoramidit mit dem Formacetal-Rückgrat wurde nach einer bereits veröffentlichten Prozedur synthetisiert und der Einbau in das 27mer per Standard-Festphasensynthese durchgeführt.^[200] Cisplatin geschädigte DNA

wurde analog einer veröffentlichten Prozedur hergestellt^[201] und Fluorescein markierte DNA wurde von Metabion (Martinsried) bezogen. Die für die Photoaffinity labeling Experimente verwendeten Diazirinstränge wurden, wie bereits publiziert, hergestellt.^[169] Die Phosphoramidite von 8-oxo-dG, 8-Br-dG, 8-NH₂-dG und 8-OMe-dG wurden von *Glen Research* bezogen und per Standardfestphasensynthese in die Oligonukleotide eingebaut. Die carbozyklischen Analoga von 8-oxo-dG und cFaPy-dG wurden nach beschreibenden Bedingungen synthetisiert und in die Oligonukleotide eingebaut.^[202] Die Oligonukleotide wurden über HPL-Chromatographie aufgereinigt, entsalzt und per MALDI-TOF Analyse und enzymatischen Verdau charakterisiert.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Formamidopyrimidin Glykosylase (Fpg/MutM)

6.1.1 Allgemeines

Im Rahmen der Untersuchung der Schadenserkennung der Formamidopyrimidin Glykosylase (Fpg/MutM) mit geschädigter DNA wurden zwei verschiedene Konstrukte von Fpg hergestellt, die Fusionsproteine mit einem N- bzw. C-terminalen Strep-tagII ergeben. Da der *Strep-tag* nur aus 8 Aminosäuren besteht, kann angenommen werden, dass das Verhalten des Proteins nicht oder nur geringfügig beeinflusst wird. Zusätzlich wurden mehrere Mutanten der C-terminalen Fusion hergestellt, in denen wichtige Aminosäuren ausgetauscht worden sind. Alle verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Übersicht über die verschiedenen Konstrukte des Fpg und die jeweilige Aktivität.

Plasmid	Variante	Strep-tagII	Aktivität
pDest007-FpgN	wt	N-terminal	0 %
pPSG-IBA3-FpgC	wt	C-terminal	100 %
pPSG-IBA3-FpgC2	E6A	C-terminal	80 %
pPSG-IBA3-FpgC3	K131A	C-terminal	90-95 %
pPSG-IBA3-FpgC4	K131A, K154A	C-terminal	90-95 %
pPSG-IBA3-FpgC5	K257A	C-terminal	90-95 %
pPSG-IBA3-FpgC6	K131A, K154A, K257A	C-terminal	90-95 %

6.1.2 Klonierung, Expression und Eigenschaften von Fpg (Wildtyp)

In der Literatur wurden zahlreiche Konstrukte beschrieben, bei denen die katalytisch wichtigen Aminosäuren Pro2^[60,203] oder Glu3^[204] mutiert wurden. Um auszuschließen, dass Mutationen im aktiven Zentrum Einfluß auf das Bindungsverhalten des Proteins aufweisen, sollte in dieser Arbeit die Wildtyp-Variante von Fpg kloniert werden. Zusätzlich wurde eine Variante kloniert, bei der das aktive Zentrum durch den N-terminalen Strep-tagII blockiert wurde, so dass nur eine Bindung zu der DNA, jedoch keine Katalyse möglich ist.

Die Fpg-Variante mit C-terminalem Strep-tagII wurde mit Hilfe der Stargate[®]-Methode (Kapitel 5.3.8) kloniert. Dazu wurde eine PCR mit den Primern 3 und 4 und der genomischen DNA von *L. lactis cremoris sk11* durchgeführt. Um fehlerfreie DNA-Sequenzen zu erhalten wurde die *High Fidelity AccuPrimePfx* Polymerase von *Invitrogen* benutzt. Die Primer wurden mit den für die Erkennungssequenz der Stargate[®]-Methode notwendigen Basen modifiziert. Das PCR Produkt wurde in pENTRY-IBA10 mit Hilfe der StarCombinase[™] kloniert. In einem weiteren Schritt wurde das Gen in das Expressionsplasmid pPSG-IBA3-FpgC überführt und anschließend in einen *E. coli* Expressionsstamm transformiert. Die Verifizierung der Plasmide wurde mit einem Restriktionsverdau (*XbaI* und *HindIII*, nach Herstellerangaben) und per Sequenzierung durchgeführt. Nach mehreren Testexpressionen mit verschiedenen Expressionsstämmen stellte sich heraus, dass eine 4-stündige Expression bei 30°C die größte Proteinausbeute mit *E. coli* BL21 (DE3) liefert. Da es sich um ein Protein mit einem Zinkfinger handelt wurde dem Medium vor der Induktion ZnCl₂ (10 µM) zugesetzt. In Tabelle 6.2 sind noch einmal die optimalen Expressionsbedingungen zusammen gefasst.

Für die N-terminale Variante von Fpg wurde ebenfalls die genomische DNA von *L. lactis* isoliert und mit Hilfe der Primer 1 und 2 eine PCR durchgeführt. Diese Primer wiesen die typischen flankierenden *attB-sites* auf, die zu einer erfolgreichen Gateway-Klonierung nötig sind (Kapitel 5.3.7). In dieser Reaktion wurde wiederum die *AccuPrimePfx* Polymerase von *Invitrogen* benutzt. In einer BP-Reaktion wurde das Gen in den Donorvektor pDONR201-FpgN und in einer

anschließenden LR-Reaktion in pDest007-FpgN transferiert. Nach der Überprüfung der Sequenz wurde das Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta (*Merck Biosciences*) transformiert. Dieser *E. coli* Stamm codiert 7, in *E. coli* selten verwendete tRNAs und erreicht damit eine verbesserte Proteinausbeute bei ungünstiger Codon-Zusammensetzung. Die höchste Protein-Ausbeute stellte sich bei den in Tabelle 6.2 aufgeführten Expressionsbedingungen ein.

Tabelle 6.2: Darstellung der optimalen Expressionsbedingungen für pDest007-FpgN und pPSG-IBA3-FpgC.

	pDest007-FpgN	pPSG-IBA3-FpgC
<i>E. coli</i> K12-Substamm	Rosetta	BL21 (DE3)
Wachstumstemperatur	37°C	37°C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	0.8	0.8
Expression	2 nM AT	1 mM IPTG
Zusatz	10 µM ZnCl ₂	10 µM ZnCl ₂
Zeitdauer der Expression	4 h	4 h
Induktionstemperatur	30°C	30 °C
Schüttelumdrehungen	225 rpm	225 rpm

Im Folgenden sind nun die Plasmidkarten von pDest007-FpgN und pPSG-IBA3-FpgC dargestellt.

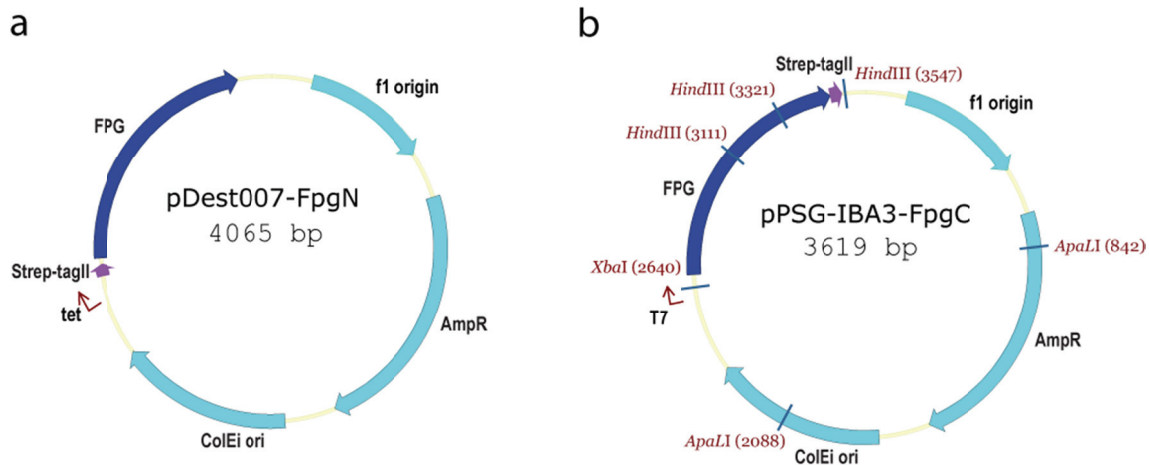


Abbildung 6.1: Abbildungen der Plasmidkarten von pDest007-FpgN (a) und pPSG-IBA3-FpgC (b).

Die Varianten von Fpg wurden nach den in den Kapiteln 5.4.5.1 bis 5.4.5.7 beschriebenen Prozeduren aufgereinigt. In Abbildung 6.2 sind die Chromatogramme der Aufreinigung und das zugehörige SDS-Gel dargestellt. In **a** ist das Chromatogramm der *Strep*-tagII-Aufreinigung zu sehen. Fraktionen B15 bis B1 wurden eingengt und weiterverwendet. Wie aus dem Chromatogramm deutlich ersichtlich, besteht ein großer Anteil der verwendeten Fraktionen aus einem Gemisch aus Protein (blaue Linie, 280 nm) und DNA (rote Linie, 260 nm). Um DNA von DNA-bindenden Proteinen zu trennen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Verwendung von DNaseI, Polythylenimin oder einem Kationentauscher würde eine Trennung ermöglichen. In diesem Fall wurden die eingengten Fraktionen über einen starken Kationentauscher bis zur Homogenität gereinigt (**b**). Der Durchfluß wurde verworfen und das Eluat (bei ca. 900 mM NaCl) wurde aufkonzentriert, umgepuffert und in Aliquots bei -80°C gelagert. Um eine qualitative Aussage über die Reinheit des Proteins zu treffen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (**c**). In Spur 4 ist das bis zur Homogenität aufgereinigte Protein zu sehen.

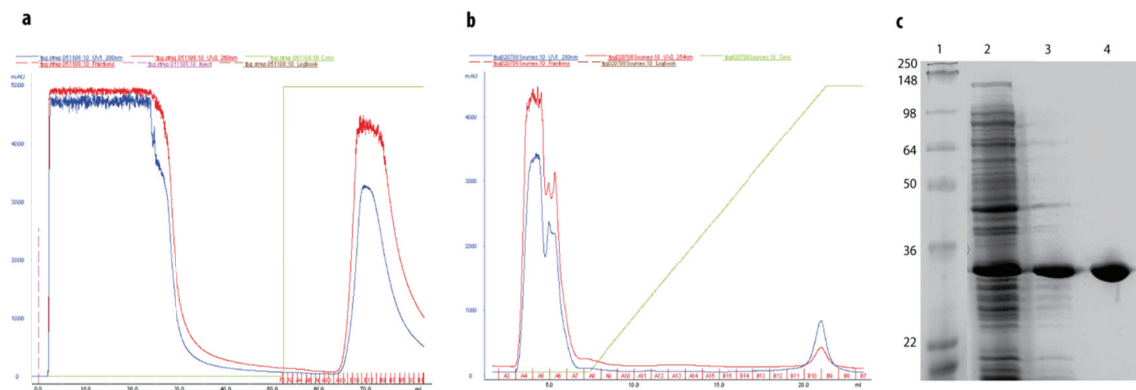


Abbildung 6.2: Chromatogramme der Aufreinigung von Fpg (pPSG-IBA3-FpgC) und 12.5%iges SDS-Gel. **(a)** Strep-tagII Aufreinigung. **(b)** Source S Aufreinigung. **(c)** Coomassie gefärbtes SDS-Gel von Fpg in unterschiedlichen Reinigungsstufen: 1: SeeBlue® Plus2 Marker, 2: Zellysate nach 4 h Induktion. 3: Nach Strep-tagII Aufreinigung, 4: Nach Source S Aufreinigung.

Zusätzlich wurde eine massenspektrometrische Analyse des gesamten Proteins (Abbildung 6.3 **a**) und ein Peptidfingerprint (**b**) nach einem tryptischen Verdau durchgeführt. Das Spektrum wurde mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer (*Bruker Autoflex II*) aufgenommen und als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymizinsäure verwendet. Das Hauptmassensignal von Fpg liegt bei 32449 Da, was gut mit der theoretischen Masse des Fpg mit einem Strep-tagII (32448 Da) übereinstimmt. Der massenspektrometrische Fingerprint von Fpg nach einem *in-gel* Verdau mit Trypsin weist eine Sequenzabdeckung von 39.8 % auf und konnte durch eine *Mascot*-Datenbankanalyse richtig zugeordnet werden. Ausserdem wurde ein positiver Western-blot mit einem α -Strep-tagII Antikörper (*Strep-Tactin AP conjugate*, IBA, Nr. 2-1503-001) durchgeführt.

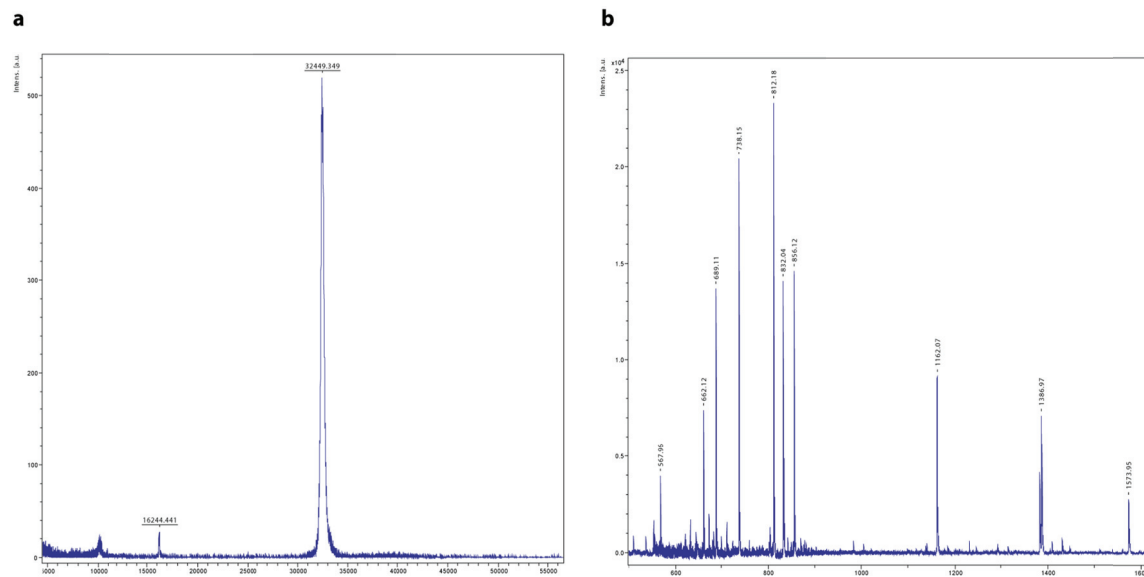


Abbildung 6.3: Massenspektrometrische Analyse von Fpg. (a) MALDI-TOF Spektrum des gesamten Proteins. (b) Massenspektrometrischer Fingerprint nach einem tryptischen Verdau.

6.1.3 Aktivitätsstudien zu Fpg

Die Aktivität und Spezifität des gereinigten Enzyms wurde gegenüber verschiedenen DNA Schäden folgend analysiert. Dazu wurden sogenannte Aktivitätsassays durchgeführt. Hierbei wurden keine carbozyklischen Nukleobasen verwendet, sondern ausschließlich natürliche, um die Aktivität der Katalyse aufrecht zu erhalten. Aufgrund der Spaltung der DNA kann auf die Aktivität geschlossen werden. Bei diesen Assays wurden die in Tabelle 6.3 angegebenen Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 6.3: Darstellung der verwendeten Oligonukleotide bei den Aktivitätsassays.

ODN	Sequenz
1	5'-Fluo-CTCTTT G TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA C AAAGAGA-5'
2	5'-Pho-CTCTTT-Fluo-3'
3	5'-Fluo-CTCTTT Pyren TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA G AAAGAGC -5'
4	5'-Fluo-CTCTTT 8-oxo-dG TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA C AAAGAGC-5'
5	5'-Fluo-CTCTTT 8-Br-dG TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA C AAAGAGC-5'
6	5'-Fluo-CTCTTT 8-OMe-dG TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA C AAAGAGC-5'
7	5'-Fluo-CTCTTT 8-NH₂-dG TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA C AAAGAGC-5'
8	5'-Fluo-CTCTTT 8-oxo-dA TTTCTCG -3' 3'- GAGAAA T AAAGAGC-5'

Dabei handelt es sich bei ODN **1** um einen ungeschädigten Referenz-Doppelstrang und bei ODN **2** um einen einzelsträngigen Größenstandard von 6 Basen. Als Größenstandard von 14 Basen wurde ODN **1** verwendet. Ein Herausschneiden der Base durch Fpg würde in einem 6mer mit einem Phosphatrest resultieren. Da bei diesem Experiment denaturierende Gele verwendet wurden, wird immer nur der fluoreszenzmarkierte Einzelstrang detektiert. Fpg besitzt nur Aktivität gegenüber doppelsträngiger DNA und deshalb wurden hier ausschließlich Doppelstränge verwendet. Bei ODN **4** und **5** handelt es sich um doppelsträngige DNA, welche die Schäden 8-oxo-dG bzw. 8-Br-dG in der Mitte des Duplexes aufweisen. Hierbei muss erwähnt werden, dass bei diesen Aktivitätsassays keine Schäden verwendet werden, die einer Fehlpaarung unterliegen. Um zu untersuchen, ob FPG auch in der Lage ist,

ungeschädigte Basen zu erkennen und auszuschneiden, wurde mit Hilfe eines gegenüberliegenden sterisch anspruchsvollen Pyrens, ein ungeschädigtes dG aus dem Strang herausgedrückt. Bei Pyren handelt es sich um einen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff, welcher, aufgrund des π -stacking, eine außerordentliche Stabilität im Duplex aufweist. In Abbildung 6.4 sind die verwendeten modifizierten Nukleobasen aufgeführt.

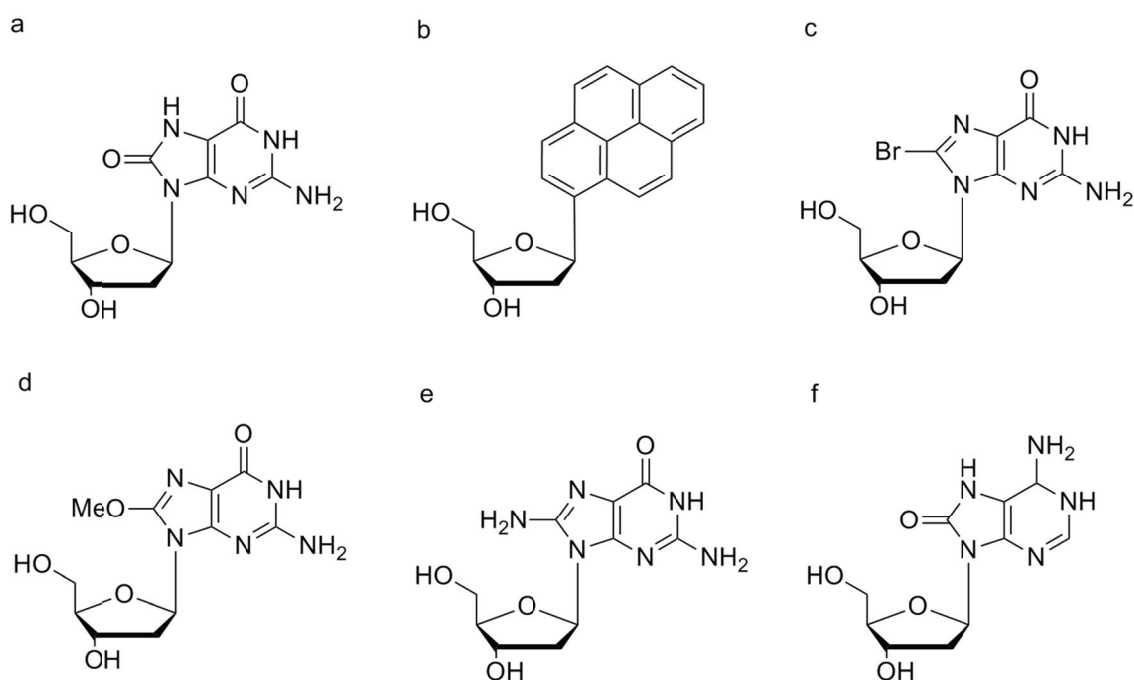


Abbildung 6.4: Überblick über die verwendeten Nukleobasen. (a) 8-oxo-dG. (b) Pyren (Benzo[def]phenanthren) modifizierte Ribose. (c) 8-Br-dG. (d) 8-OMe-dG. (e) 8-NH₂-dG. (f) 8-oxo-dA.

Die Reaktion wurde in dem Puffer FSA (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% Glycerin) mit einem Volumen von 10 μ L durchgeführt. Die doppelsträngige DNA (40 μ M) wurde mit Fpg (wt, C-terminaler Strep-tagII, 3.2 μ M) versetzt und 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein Formamidauftragspuffer zugegeben und die Reaktion auf einem 20%igem denaturierenden Gel analysiert. Abbildung 6.5 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen der Aktivitätsassays mit Fpg. Spuren 1 und 2 (a) enthielten als Marker ein 14mer bzw. 6mer. In den Spuren 3 und 4 wurde dG:Pyren (ODN 3) mit einem aktivem Fpg (Spur 3) und mit einem

hitzeinaktivierten Fpg (20 min, 65°C, Spur 4) versetzt. Hierbei stellt sich die Frage, wo die Diskriminierung zwischen einer geschädigten und ungeschädigten Base durch das Enzym stattfindet bzw. ob eine ungeschädigte Base in die aktive Tasche vordringen, aber nicht durch das Enzym geschnitten werden kann. Diese Fragestellung sollte im folgenden Kapitel durch Röntgenkristallstrukturanalyse beantwortet werden. Dazu war es notwendig festzustellen, ob während des Kristallwachstums, was etwa 3 Wochen dauerte, Fpg nicht doch in der Lage ist dG umzusetzen. Aber selbst nach 3 Wochen ist keine Aktivität des Enzyms gegen die ungeschädigte Base zu beobachten (**b**, Spur 5). Letzteres deutet darauf hin, dass Fpg nur mit geschädigten Basen reagieren kann. Jedoch bleibt die Überlegung bestehen, ob Fpg eine natürliche Base zwar kurzzeitig binden, aber nicht schneiden kann. Als Vergleich wurde in diesem Gel in Spur 3 derselbe Reaktionsansatz verwendet, jedoch mit einer Inkubationszeit von 30 min. In beiden Fällen ist dasselbe Ergebnis zu sehen. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Verwendung des Pyrens keinen Einfluß auf die Katalyse des Fpg hat und somit diese Möglichkeit für die Strukturanalyse zur Verfügung steht. Im Falle von 8-oxo-dG, ein hervorragendes Substrat für Fpg, ist in **a** Spur 7 deutlich das zu erwartende 6mer zu erkennen, aber die Reaktion konnte auch gut über 3 Wochen beobachtet werden (**b**, Spur 8). In beiden Fällen läuft das Produkt auf gleicher Höhe wie die Referenz (6mer). Wie erwartet kann man erkennen, dass auch hitzeinaktiviertes Fpg in beiden Fällen (**a**, Spur 8 und **b** Spur 9) keine Reaktion durchführen konnte.

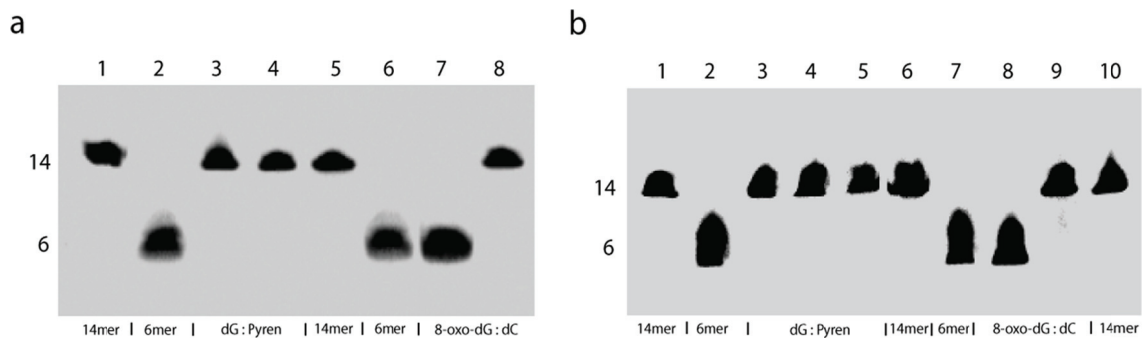


Abbildung 6.5: Fluoreszenzaufnahme der Aktivitätsassays mit Wildtyp-Fpg. Eingesetzt wurden folgende Mengen: DNA 40 μ M und Fpg 3.2 μ M. **(a)** 1: 14mer ODN 1, 2: 6mer-Pho (ODN 2), 3: dG:Pyren (ODN 3) + Fpg, 4: dG:Pyren + Fpg (hitzeinaktiviert), 5: 14mer, 6: 6mer-Pho, 7: 8-oxo-dG:dC (ODN 4) + Fpg, 8: 8-oxo-dG:dC + Fpg (hitzeinaktiviert). **(b)** 1: 14mer, 2: 6mer-Pho, 3: dG:Pyren + Fpg, 4: dG:Pyren + Fpg (hitzeinaktiviert), 5: dG:Pyren + Fpg (Inkubation 3 Wochen), 6: 14mer, 7: 6mer-Pho, 8: 8-oxo-dG:dC + Fpg (Inkubation 3 Wochen), 9: 8-oxo-dG:dC + Fpg (hitzeinaktiviert), 10: 14mer.

Um sowohl die Substratspezifität, als auch die Reparaturreffizienz von Fpg zu ermitteln, wurden in folgenden Experimenten verschiedene geschädigte oder modifizierte Nukleobasen eingesetzt (Abbildung 6.6). Zusätzlich wurde eine Mutante von Fpg verwendet (E6A-Fpg), die eine verringerte Aktivität aufweisen sollte.^[205] In Spur 1 **(a)**, auf gleicher Höhe mit dem 6mer Referenzstrang (Spur 7), ist deutlich das 6mer zu sehen, das nach dem Herausschneiden von 8-oxo-dG durch Fpg zurückbleibt. Durch den Austausch dieses elektronenschiebenden Substituenten an der C8 Position gegen Substituenten, die unterschiedliche elektronenziehende oder elektronenschiebende Eigenschaften aufweisen, sollten weitere mechanistische Hinweise gewonnen werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass ein elektronenziehendes Brom, das die Elektronendichte des aromatischen Heterozyklus durch den -I-Effekt erniedrigt, die Aktivität von Fpg sehr deutlich reduziert (Spur 2). Falls eine weniger stark elektronenschiebende Gruppe, wie die Methoxygruppe, an die Position 8 des aromatischen Rings gesetzt wird, sieht man eine im Vergleich zum Brom und 8-oxo-dG intermediäre Enzymaktivität (Spur 3). Darauf basierend sollte die Einführung einer stärker elektronenschiebenden Gruppe, wie das NH_2 , hier die Aktivität stärker erhöhen, was durch den +M-Effekt erklärbar wäre. Jedoch ist zwar eine gesteigerte Aktivität gegenüber der Amino-

und der Methoxygruppe zu beobachten, allerdings ist 8-oxo-dG weiterhin ein besseres Substrat für Fpg (Spur 4). Deswegen müssen zusätzlich zu den elektronischen Effekten weitere Parameter bei der Unterscheidung der Basen eine Rolle spielen. Beispielsweise könnten Barrieren der Rotationsenergie um die Base von einer *syn*- in eine *anti*-Konformation zu rotieren, einen Einfluss haben. Ein weiterer großer Punkt stellt die Möglichkeit der Protonierung der Base an Position 8 dar. Die guten Substrate für Fpg sind an dieser Position sehr leicht protonierbar. Zusätzlich wirkt sich auch die Struktur des Substrats auf die Katalyse aus, was dadurch gezeigt werden konnte, dass 8-oxo-dA nicht von Fpg geschnitten wird (Spur 6).

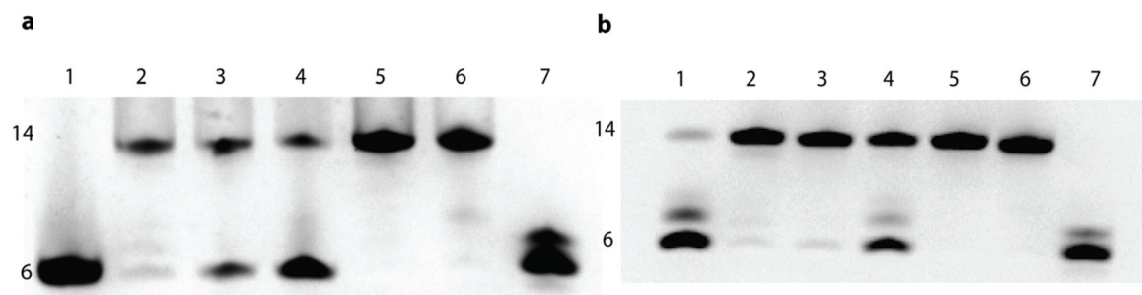


Abbildung 6.6: Fluoreszenzaufnahme eines Aktivitätsassays mit modifizierten Basen und Wildtyp-Fpg (a) bzw. E6A-Fpg (b). Konzentration der DNA 40 μ M und Fpg: 3.2 μ M. 1: 8-oxo-dG:dC (ODN 4) + Fpg, 2: 8-Br-dG:dC (ODN 5) + Fpg, 3: 8-OMe-dG:dC (ODN 6) + Fpg, 4: 8-NH₂-dG:dC (ODN 7) + Fpg, 5: 8-oxo-dA:dT (ODN 8) + Fpg, 6: dG:dC (ODN 1) + Fpg, 7: 6mer-Pho.

Wie erwartet zeigt die E6A-Mutante das gleiche Substratspektrum wie das Wildtyp-Enzym, aber mit reduzierter Aktivität (Abbildung 6.8 b). Die reduzierte Aktivität der Mutante könnte dadurch erklärt werden, dass eine Protonierung und Stabilisierung durch die Glutaminsäure nicht mehr gegeben ist.

6.1.4 Kristallisation und Diffraktion der Co-Kristalle von Fpg mit DNA

Durch die strukturelle Analyse mittels Proteinröntgenkristallographie der Protein-DNA Interaktionen können wichtige Hinweise auf den Mechanismus der Schadenserkennung, sowie der enzymatischen Reaktion gewonnen werden. Hierzu ist die Kristallisation des Proteins im Komplex mit DNA notwendig. Da bereits Protein-DNA-Kristallstrukturen mit Fpg und geschädigter DNA bekannt sind, wurden ähnliche Kristallisationsbedingungen getestet.^[57, 61] Für Kristallisationsstudien wurde das Protein (Fpg, C-terminaler Strep-*tagII*) in dem Puffer FSA (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT und 5% Glycerin) auf 12.0 mg/mL aufkonzentriert und mit der DNA (c8-oxo-dG, ODN **9**, siehe Tabelle 6.5) im molaren Verhältnis von DNA:Protein von 1.3:1 vermischt. Die Kristallbildung erfolgte nach der *hanging drop vapor diffusion* Methode. Nach Variation der PEG4000-Konzentration, Änderung des pH-Werts und der Salzkonzentration wurden die besten Kristalle bei einem Puffer bestehend aus 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM Spermidin, 1 mM TCEP, 10 μ M ZnCl₂, 90 mM Li₂SO₄ und 18 % PEG4000 erhalten. Nach Lagerung der Platten bei 18°C für drei Wochen entstanden Kristalle, die in Abbildung 6.7 zu sehen sind.

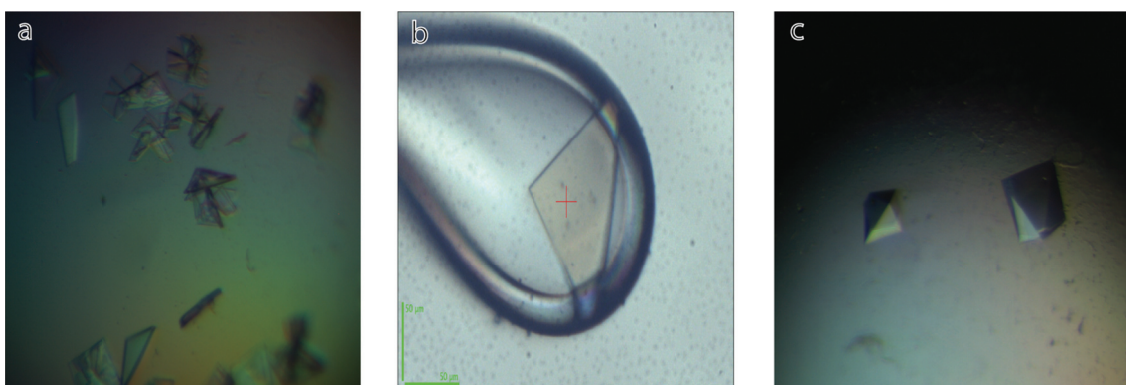


Abbildung 6.7: Kristallbilder der Fpg-DNA-Komplexe. (a) Kristalle aus Fpg mit c8-oxo-dG geschädigter DNA. (b) Ein Kristall in einem Loop vor der Messung. (c) Kristalle aus Fpg mit cG-Pyren enthaltender DNA.

Die hier abgebildeten Kristalle (Abbildung 6.7 a) wurden in einer Gefrierschutzlösung (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM Spermidin, 1 mM TCEP, 10 μ M ZnCl₂, 90 mM Li₂SO₄, 18 % PEG4000 und 15 % Butandiol) gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Vermessung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Daten wurden an der *Beamline* PXI (X10SA) der Swiss Light Source (SLS), Villigen, Schweiz gesammelt. Die Kristalle beugten die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 2.3 Å (Fpg-c8-oxo-dG), 3.15 Å (Fpg-dG-Pyren) und 2.65 Å (mtFpg-c8-oxo-dG). Alle Datensätze wurden mit den Programmen XDS und SCALA prozessiert. Die Strukturen wurden durch Molekularen Ersatz (PHASER, McCoy 2005) unter Verwendung der Koordinaten der Fpg Struktur in Komplex mit dem FaPyG-Schaden (PDB Code 2TDZ) gelöst.^[61] Um eine Überanpassung des Atommodells an die Daten zu verhindern, wurden vorher die Atome des Schadens, sowie weitere benachbarte Basenpaare entfernt. Ausserdem wurden die isotropen Temperaturfaktoren des Suchmodells, auf die des Wilson-B-Faktors gesetzt und *simulated annealing* (PHENIX) vor dem manuellen Anpassen des Modells in die Elektronendichte in COOT (Emsley 2010) durchgeführt. Positionelle Verfeinerung, sowie die der Temperaturfaktoren unter der Benutzung eines TLS (*Translational Liberation Screw*) wurde in REFMAC5^[207] durchgeführt. Im Folgenden sind alle Statistiken und prozessierten Daten aufgeführt.

Tabelle 6.4: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstrukturen.

Struktur	FPG-c8oxo-dG inaktive Mutante	FPG(wt)-c8-oxo- dG	FPG(wt)-pyren
Data collection			
X-ray source	SLS X10SA	SLS X10SA	ESRF ID23-2
Wavelength (Å)	1.000	1.077	0.875
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit cell param.[Å]	$a=72.6, b=226.7, c=40.7$	$a=43.0, b=112.6, c=132.7$	$a=42.2, b=113.1, c=131.0$
Resolution	45-2.65 (2.71-2.65)	44.2-2.3 (2.42-2.3)	40-3.15 (3.32-3.15)
No. unique reflections	18940 (1427)	29566 (4251)	11706 (1671)
Completeness (%)	98.7 (100)	99.9 (100)	100 (100)
Rmerge	0.088(0.357)	0.084 (37.6)	0.092 (0.436)
Mean $I/\sigma(I)$	10.3 (3.4)	11.9 (4.1)	11.7 (3.1)
Redundancy	3.2	5.3	6.4
Refinement			
Resolution in refinement [Å]	45-2.65	44-2.3	
Rwork/Rfree	0.22/0.27	0.199/0.238	0.237/0.294
Number of atoms			
Protein		4297	4277
DNA	514	570	542
Water	21	131	-
Average B-factors [Å ²]			
Protein	34.7	23.4	58.3
DNA	37.6	33.4	75.2
Water	24.9	25.9	-
R.m.s Bond lengths [Å]	0.013	0.012	0.011
R.m.s Bond angles [°]	1.4	1.5	1.2

Tabelle 6.5: Auflistung der für die Kristallisationsexperimente verwendeten DNA-Stränge. Die Strukturen des verwendeten c8-oxo-dG bzw. des Pyrens sind in der Abbildung 6.4 dargestellt.

ODN	Sequenz
9	5'-CTCTTT c8-oxodG TTTCTC -3' 3'- AGAAA C AAAGAGG-5'
10	5'-CTCTTT c8-oxodG TTTCTCG-3' 3'-GAGAAA C AAAGAGC-5'
11	5'-CTCTTT cG TTTCTCC-3' 3'-GAGAAA Pyren AAAGAGG-5'
12	5'-TCTTT cG TTTCTCG -3' 3'-AGAAA Pyren AAAGAGCG -5'

Wie in *gel shift* Untersuchungen gezeigt wurde, bindet das inaktive Fpg, bei dem das aktive Zentrum durch den Strep-tagII blockiert ist, DNA. Um die DNA-Protein Interaktionen zu analysieren, wurde dieses mit dem Oligonukleotid **10** (ohne Überhänge) kristallisiert. Die besten Kristalle wurden bei einem Puffer bestehend aus 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM Spermidin, 1 mM TCEP, 10 μ M ZnCl₂, 50 mM Li₂SO₄ und 26 % PEG4000 erhalten. Die restlichen Bedingungen gleichen den bereits erwähnten. Diese Kristalle wurden in dem bereits beschriebenen Puffer mit 10 % Butandiol als Gefrierschutzlösung gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kristalle wurden an der *Beamline* PXI (X10SA) der *Swiss Light Source*, Villigen gemessen und beugten die Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 2.65 Å.

Anschließend sollte versucht werden, eine kanonische, nicht geschädigte Base, im aktiven Zentrum des Enzyms zu kristallisieren. Dies würde einen weiteren Einblick in die Schadenserkennung von Fpg geben und man könnte zeigen, dass auch ungeschädigte Basen in das aktive Zentrum gedreht werden. Da der *flipping*-Prozeß sehr schnell vonstatten geht, ist es vermutlich nicht möglich, die Base in dem aktiven Zentrum zu fixieren. Daher wurde als Gegenbase die sperrige Pyrenbase (Abbildung 6.4) in die DNA gegenüber einem ungeschädigten Guanin eingebaut. Aufgrund der Aromatizität von Pyren

kann dieses Molekül ein starkes π -*stacking* innerhalb der DNA eingehen. Das bedeutet, dass Pyren im Doppelstrang stabilisiert vorliegt und aufgrund seiner Größe die gegenüberliegende Base aus der Helix drückt, damit diese vom Enzym erkannt und gebunden werden kann. Analog zu der bereits beschriebenen Vorgehensweise wurde auch hier ein *Screening* mit bereits bekannten Bedingungen durchgeführt. Um größtmögliche Flexibilität zu erreichen, wurden zwei verschiedene DNA Stränge (ODN **11** und **12**) verwendet. Bei ODN **11** handelt es sich um einen Doppelstrang mit zwei *blunt ends*, während ODN **12** einen Überhang aufweist. Mit beiden DNA-Strängen entstanden die besten Kristalle bei einem Puffer bestehend aus 100 mM Tris-HCl pH 7.3, 2 mM Spermidin, 1 mM TCEP, 10 μ M ZnCl_2 , 50-60 mM Li_2SO_4 und 16-18 % PEG4000. Nach einer Lagerung für drei Wochen bei 18°C wurden diese mit einer Gefrierschutzlösung (100 mM Tris-HCl pH 7.3, 2 mM Spermidin, 1 mM TCEP, 10 μ M ZnCl_2 , 50-60 mM Li_2SO_4 , 16-18 % PEG4000 und 25 % Ethylenglykol) gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Beide DNA-Stränge unterscheiden sich nur um die überhängende Base, dennoch kommt es zu einem sehr unterschiedlichen Kristallwachstum. Im Falle von ODN **12** entstehen sehr große pyramidale Kristalle (siehe Abbildung 6.7 c), während im Falle von ODN **11** nur dünne Platten wachsen, wie sie bei c8-oxo-dG geschädigter DNA entstanden sind. Die Kristalle wurden an der *Beamline* ID23-2 der *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)*, Grenoble, Frankreich aufgenommen und beugten die Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 3.15 Å.

6.1.5 Strukturanalyse der Kristalle von Fpg mit DNA

Aus den gemessenen Daten konnte durch Molekularen Ersatz die Struktur von Fpg (wt) mit einem C-terminalen Strep-tagII in Komplex mit einem c8-oxo-dG enthaltenen 14mer (ODN **9**) gelöst werden. In Abbildung 6.8 ist die errechnete Co-Kristallstruktur abgebildet. Im linken Teil der Abbildung ist die C-terminale Domäne, bestehend aus zwei α -Helices und zwei β -Faltblattstrukturen, zu erkennen. Diese Strukturen bilden ein Zinkfinger-Motiv aus und sind über ein flexibles Scharnier verbunden.^[48] Das Zinkfinger-Motiv beeinflusst maßgeblich die DNA-Bindung und ist ein weit verbreitetes Motiv, welches für die Bindung

von Proteinen an die DNA verantwortlich ist, oder zumindest unterstützt. Im Falle von Fpg wird das Motiv durch die vier Cysteine Cys247, Cys250, Cys267 und Cys270 aufgebaut, die über die freien SH-Gruppen ein Zn^{2+} -Ion, das als graue Kugel dargestellt ist, koordinieren. Es handelt sich hierbei um unspezifische Wechselwirkungen polarer Art. In diesem Fall bindet das Motiv zwar nicht direkt die DNA, was an der räumlichen Entfernung zu erkennen ist, jedoch ist es für die Bindung vonnöten. Die N-terminale Domäne besteht aus einer α -Helix, in welcher sich der katalytisch aktive Prolinrest und eine β -*Sandwich*-Struktur befindet. Im aktiven Zentrum befindet sich die in rosa dargestellte geschädigte Nukleobase, die aus dem Doppelstrang um 180° herausgedreht ist (*base flipping*).

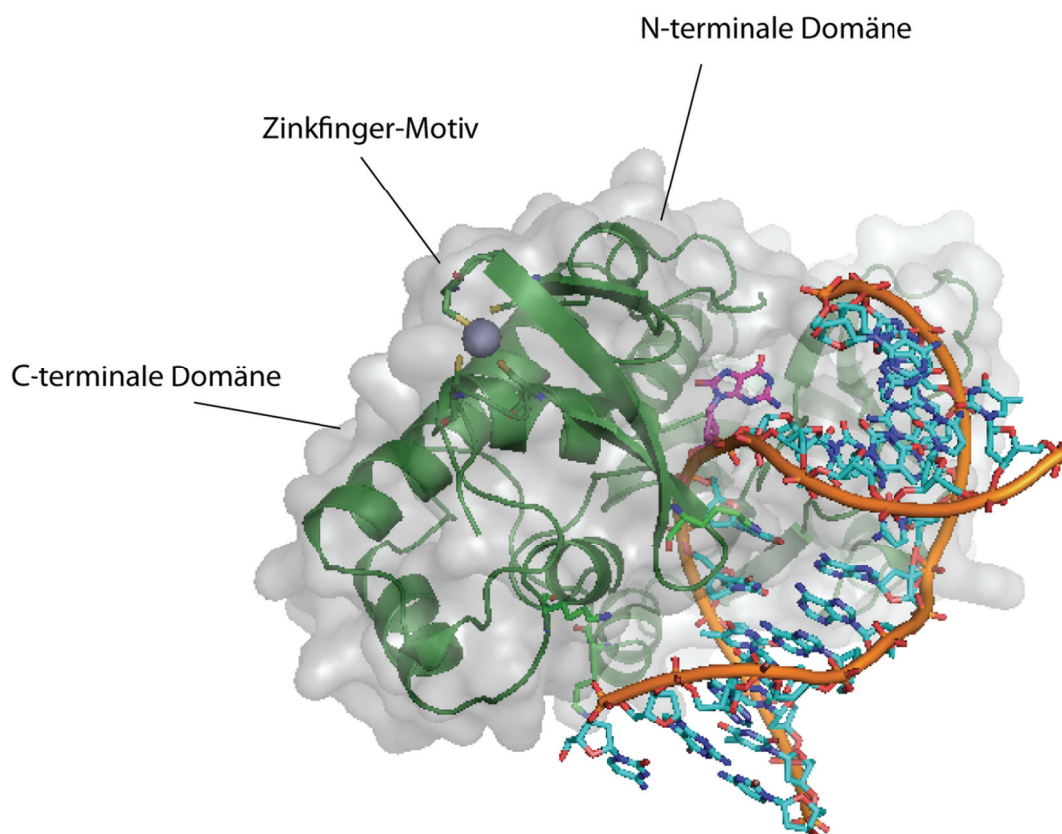


Abbildung 6.8: Kristallstruktur von Fpg (wt) mit c8-oxo-dG geschädigter DNA (ODN **9**). Die Sekundärstruktur des Proteins ist als Bänderdarstellung in grün gezeigt und mit der semitransparenten Oberfläche überlagert. Das c8-oxo-dG wurde in rosa dargestellt und ist um 180° aus dem Doppelstrang herausgedreht. Das Zn^{2+} -Atom ist als graue Kugel dargestellt.

Fpg, wie alle anderen Glykosylasen auch, biegt die DNA um ca. 65° , um diese zwischen der N- und C-terminalen Domäne zu platzieren. Dieser Prozess erzeugt eine erweiterte und flachere kleine Furche und ermöglicht das *base flipping*, so wie es in zahlreichen anderen Proteinen (z.B. DNA Methyltransferasen, Photolyasen) auch vorkommt. Das *base flipping* ist ein energetisch ungünstiger Prozess, da das DNA-Rückgrat eine nicht optimale Konformation einnimmt und das *Watson-Crick*-Basenpaar aufgehoben wird. Jedoch ist diese Strategie für eine effiziente Diskriminierung zwischen geschädigten und ungeschädigten Basen unablässig und erleichtert den nukleophilen Angriff auf das Anomere C1 der Ribose. Im Folgenden soll nun das aktive Zentrum genauer betrachtet werden.

In Abbildung 6.9 ist das aktive Zentrum mit den beteiligten Aminosäuren dargestellt. Man erkennt deutlich, dass 8-oxo-dG aus der Doppelhelix herausgedreht wurde und in einer extrahelikalen Position erkannt wird. Wie bereits beschrieben wird die kleine Furche aufgeweitet und die DNA gebogen, indem die Seitenketten der drei Aminosäuren Met77, Arg112 und Phe114 in den Doppelstrang insertiert werden. Phe114 dringt auf der 5'-Seite der Gegenbase in den Doppelstrang ein und stabilisiert durch seinen aromatischen Rest durch π -Elektronenwechselwirkungen mit der Gegenbase den geöffneten Duplex. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Phe114 thermodynamische Instabilitäten der DNA während dem Suchprozeß detektiert.^[57] Met77 dringt neben Phe114 in den Duplex ein und befindet sich somit auf der 3'-Seite der geschädigten Stelle. Durch räumliche Nähe kann Met77 van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Zuckerrest (C2' und C3') der geschädigten Base ausbilden. Arg112 besetzt den freien Raum, an der sich ursprünglich die geschädigte Base befunden hat und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung, die einer *Watson-Crick*-Basenpaarung ähnelt, mit der Gegenbase aus. Zusätzlich wird ein π -*stacking* mit der 5'-Base neben dem Schaden eingegangen. Arg112 und Met77 spielen zudem eine sehr wichtige Rolle an der Katalyse der geschädigten Base, da sie den freien Raum besetzen und den Zuckerrest der geschädigten Base in eine geeignete Orientierung bringen.

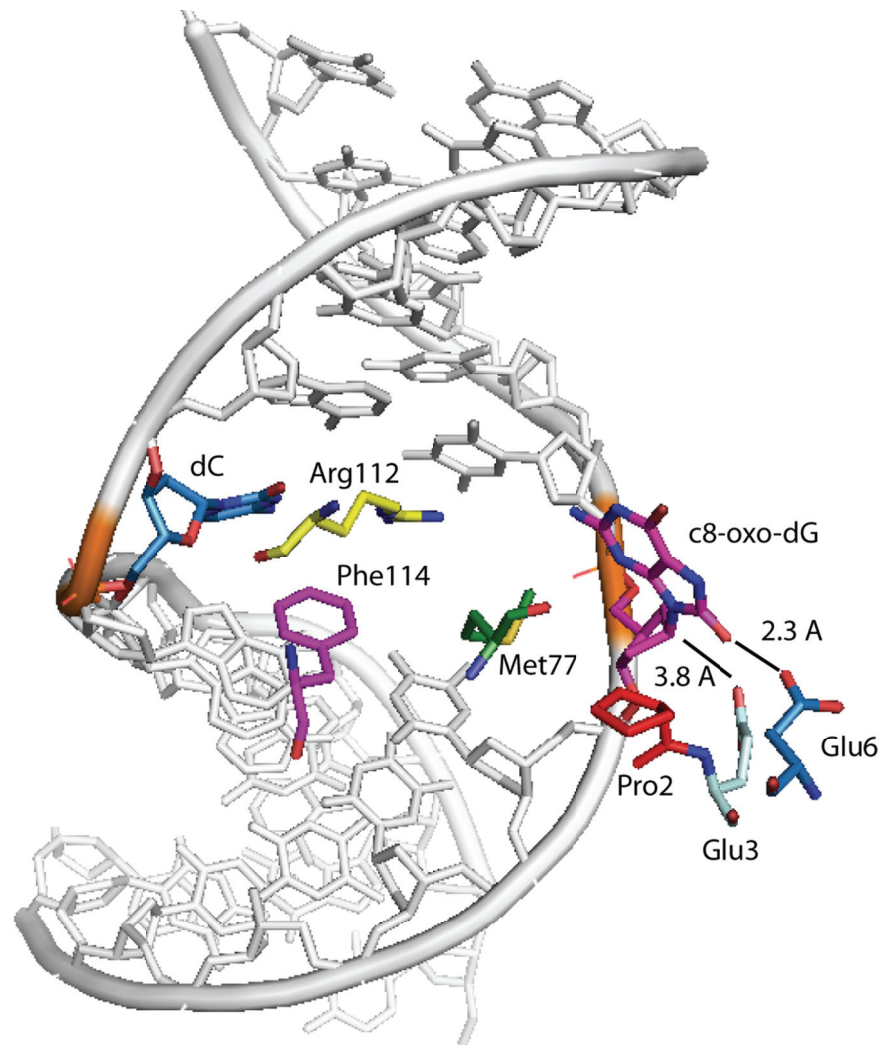


Abbildung 6.9: Darstellung des aktiven Zentrums von Fpg (wt) mit den an der Katalyse beteiligten Aminosäuren und die geschädigte DNA.

In der Struktur ist ebenfalls zu erkennen, dass c8-oxo-dG in einer Konformation erkannt wird, die zwischen *syn* und *anti* liegt. Das N-terminale Prolin befindet sich in räumlicher Nähe zu dem Kohlenstoff-Atom C1 der Ribose und kann einen nukleophilen Angriff auf dieses durchführen. Die Protonierung und damit die Aktivierung des Prolins erfolgt über ein Wassermolekül. Glu3 liegt in räumlicher Nähe des Zuckers (3.8 Å) und kann ein mögliches Oxo-Carbenium-Kation stabilisieren. Eine Mutation dieser Aminosäure führt zum kompletten Verlust der Aktivität von Fpg. Dies wurde in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben und stellt eine Methode dar, um

Kristallstrukturen von Fpg mit geschädigter DNA zu erhalten.^[57, 61, 208] Glu6 ist ebenfalls bei der Katalyse beteiligt, jedoch führt eine E6A-Mutation lediglich zu einem Aktivitätsverlust von ca. 20 % (siehe Abbildung 6.6). Glu6 zeigt auf die Keto-Gruppe (C8=O) der Base und ist für deren Protonierung verantwortlich (Abstand 2.3 Å). Dadurch stellt die geschädigte Base eine bessere Abgangsgruppe dar.

Nun soll die Bindung der geschädigten Nukleobase in dem aktiven Zentrum eines Wildtyp Enzyms mit der eines mutierten Enzyms verglichen werden. Wie bereits beschrieben, verwendet Verdine *et al.* eine E3Q-Mutation bei der die Glutaminsäure katalytisch nicht aktiv ist. Des Weiteren wurde durch Einführung von Cysteinen die DNA über sog. *Disulfide cross linking (DXL)* an das Enzym gebunden.

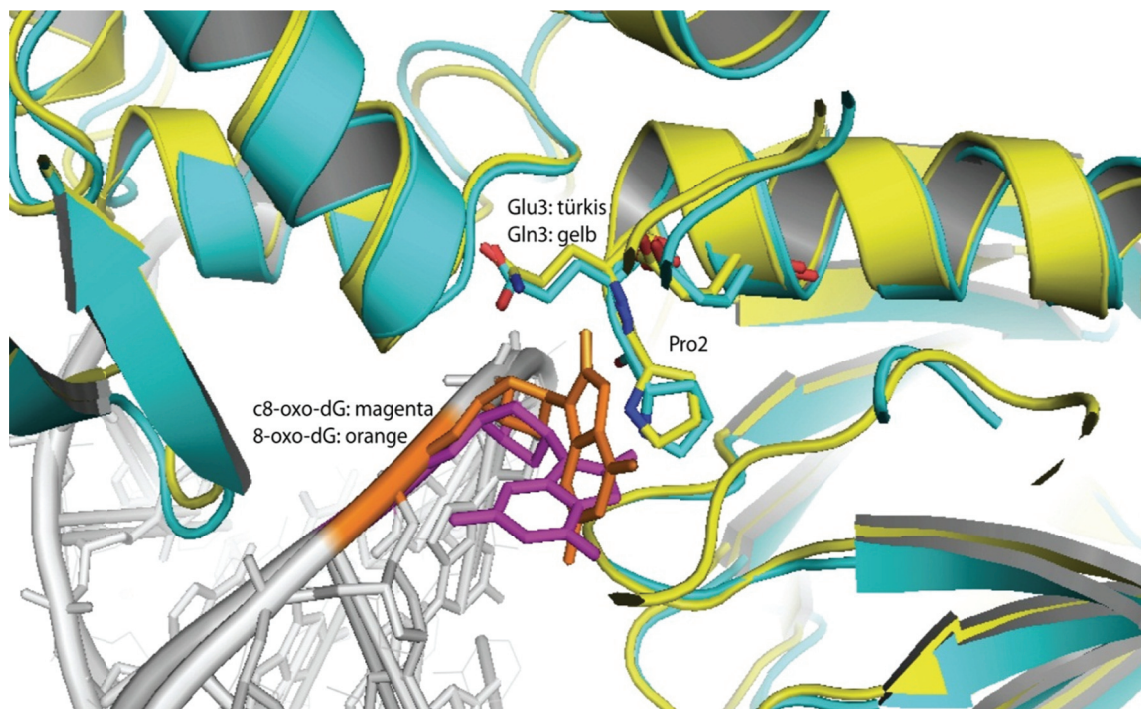


Abbildung 6.10: Strukturelle Überlagerung des aktiven Zentrums von *Wildtyp*-Fpg (gelb) mit der mutierten Variante (türkis, Verdine, pdb Code: 2F5Q). Die Sekundärstruktur des Proteins ist als Bändermodell dargestellt; die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren, sowie c8-oxo-dG bzw. 8-oxo-dG als Stabmodell.

In der oben stehenden Abbildung ist nun eine Überlagerung der im Rahmen dieser Arbeit gelösten Struktur von Fpg (wt) in Komplex mit c8-oxo-dG und der mutierten Variante von Verdine (E3Q, gelb) zu sehen.^[204] Es ist zu erkennen, dass hier nur geringe Abweichungen vorhanden sind, alle Sekundärstrukturen sind gleich, auch das aktive Prolin. Jedoch kann man bei dieser Struktur einen großen Unterschied erkennen, nämlich die geschädigte Base. Beide 8-oxo-dG Nukleobasen werden in einer Art *syn*-Konformation, anders als bei cFaPydG, erkannt und gebunden. Jedoch sind die Basen um ca. 90° voneinander gedreht. Das c8-oxo-dG (magenta) zeigt deutlicher mit der Keto-Gruppe auf das aktive Prolin, während das 8-oxo-dG von Verdine (orange) in Richtung der mutierten Aminosäure zeigt. Der Ursprung dieses Verhaltens bleibt in weiteren Experimenten herauszufinden. Vor allem, ob Mutationen im aktiven Zentrum Einfluss auf die Konformation haben. Es kommt hinzu, dass bei der *Wildtyp*-Fpg-Struktur der *Loop* in einer ungeordneten oder auch offenen Konformation vorliegt. Dies hängt vermutlich mit dem Winkel der glykosidischen Bindung zusammen. Welchen Einfluss dies auf die Aktivität des Proteins hat, ist noch unklar.

Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob es möglich ist, eine kanonische, nicht-geschädigte Nukleobase im aktiven Zentrum zu fixieren und eine Kristallstruktur zu erhalten. Dieser Ansatz führt an das wahre Problem, das es zu lösen gibt, ob Fpg während der Schadenssuche jede Base aus der Doppelhelix klappt oder ob ‚nur‘ Instabilitäten detektiert werden. Nur ein geeignetes Substrat würde aus der Doppelhelix in das aktive Zentrum gedreht werden. Um für die Dauer der Kristallisation eine nicht-geschädigte Base außerhalb der DNA zu fixieren, wurde gegenüber einem dG ein sperriges Pyren eingebaut. Durch die aromatischen Wechselwirkungen in der Doppelhelix und dem enormen sterischen Anspruch sollte die Gegenbase aus der DNA gedrückt werden. Die Kristalle wurden wie bereits beschrieben gemessen und die Struktur gelöst. Jedoch ist, wie in Abbildung 6.11 zu sehen, nicht dG in dem aktiven Zentrum zu finden, sondern die Nachbarbase, ein ungeschädigtes Thymin. Dies kann durch sterische Beanspruchung des Pyrens erklärt werden, aber auch durch die Tatsache, dass Thymin ein schlechteres π -*stacking* als Guanin eingeht. Dies hat zur Folge, dass Thymin nun außerhalb der

Doppelhelix zu finden ist, wobei zu erwähnen ist, dass nur der Zucker und nicht die Base in der Elektronendichte definiert ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass dT kein geeignetes Substrat für Fpg darstellt und keine feste Position im aktiven Zentrum einnimmt.

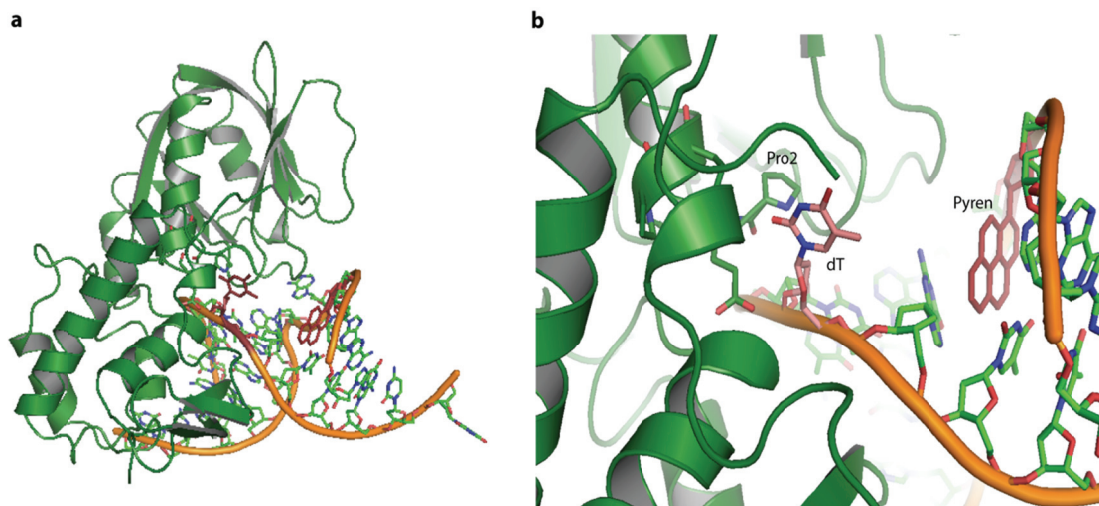


Abbildung 6.11: (a) Kristallstruktur von Fpg (wt) mit ungeschädigter DNA. Das Protein ist als Bändermodell in grün dargestellt und ein ungeschädigtes Thymin in einer extrahelikalen Position zu sehen. (b) Das aktive Zentrum des Enzyms mit der herausgeklappten Base. Das sterisch anspruchsvolle Pyren (hellrot) befindet sich in einer intrahelikalen Position.

In oben stehender Abbildung ist Fpg (wt, grün) in Komplex mit der DNA zu sehen (a). Deutlich ist zu erkennen, wie die ungeschädigte Base aus der *Watson-Crick*-Basenpaarung herausgelöst wurde und sich im aktiven Zentrum befindet. In b ist das aktive Zentrum genauer dargestellt. Man erkennt in einiger Entfernung das Pyren, während sich dT in der Nähe des katalytischen Prolins befindet. Aus bereits beschriebenen Experimenten (Aktivitätsassays) kann ausgeschlossen werden, dass es hier zu einer Katalyse und damit zum Herausschneiden der Base kommt. Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Struktur zu erhalten, bei der sich eine ungeschädigte Base im aktiven Zentrum einer Glykosylase befindet. Die könnte einen weiteren Hinweis auf den Mechanismus der Schadenserkennung geben.

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie sich die Struktur verändert, wenn das aktive Zentrum des Enzyms durch einen N-terminalen Strep-tagII blockiert wird und wie das Protein dann die DNA bindet. Dazu wurde die bereits beschriebene Variante von Fpg kloniert, an dessen katalytisch aktivem Prolin sich der 9 Aminosäuren lange Strep-tagII befindet. Dieses Enzym wurde mit c8-oxo-dG (ODN **10**) geschädigter DNA kristallisiert und es konnte eine Struktur mit einer Auflösung von 2.65 Å gelöst werden. In Abbildung 6.12 ist die Struktur zu erkennen. Ganz deutlich ist der als Kugelmodell dargestellte Affinitäts-tag zu sehen, welcher sich in dem aktiven Zentrum des Enzyms befindet. Dies hat zur Folge, dass der Schaden nicht heraus geklappt werden kann. Nun soll die Struktur genauer betrachtet werden, insbesondere wie die DNA durch das inaktive Enzym gebunden wird.

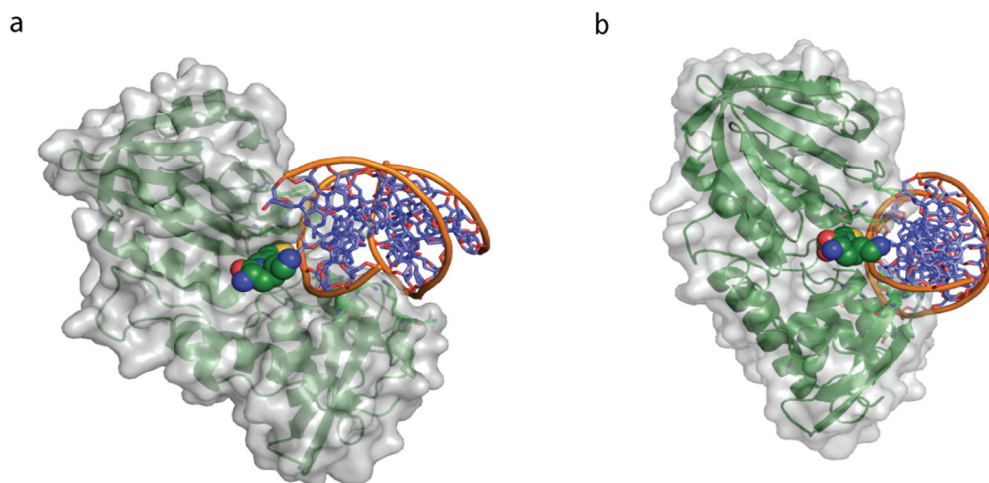


Abbildung 6.12: Strukturen der inaktiven Variante von Fpg in Komplex mit c8-oxo-dG geschädigter DNA. Der *Streptag* ist als Kugellottenmodell dargestellt und blockiert die aktive Tasche des Enzyms.

In nachfolgender Abbildung ist ein näherer Blick auf die DNA zu sehen. Bei dieser Betrachtung kann man sofort erkennen, dass die geschädigte Nukleobase c8-oxo-dG (in gelb dargestellt (**a**)) sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums befindet, sondern etwas verschoben gebunden wurde. Das, in diesem Fall inaktive Prolin befindet sich in einiger Entfernung (in *magenta* dargestellt). Beim Betrachten dieser Kristallstruktur fiel auf, dass drei Lysine

(Lys131, Lys154 und Lys257) direkt auf die DNA gerichtet sind. Diese drei Aminosäuren befinden sich in räumlicher Nähe zu der DNA, so dass sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Der Abstand von Lys131 zu Thymin beträgt 3.41 Å, der von Lys155 2.79 Å und der von Lys257 3.03 Å. Interessanterweise zeigt Lys257 direkt auf das Sauerstoffatom der geschädigten Nukleobase (Abbildung 6.13 **b**). Hierbei kommt die Vermutung ins Spiel, dass diese Lysine als eine Art ‚Finger‘ benutzt werden, um gewisse Störungen bei der DNA zu detektieren und den Suchprozeß abzubremesen. Mit Hilfe von Aktivitätsassays konnte aber keine oder nur eine wenig verringerte Geschwindigkeit der Katalyse mit den mutierten Enzymen (FpgC3-C6) festgestellt werden. Die geringfügige Reduzierung kann aber auch damit erklärt werden, dass es sich nicht mehr um den Wildtyp handelt. Somit haben die Lysine keinen direkten Einfluß auf die Geschwindigkeit der Reaktion. Um dies zu beweisen, könnte auch ein *in-vivo*-Experiment durchgeführt werden. Dazu wird das Fpg-Enzym in *E. coli* mutiert und eine eventuelle Anhäufung von 8-oxo-dG in der Zelle detektiert. In diesem Fall würde es sich nicht um kurze DNA-Oligonukleotide handeln, sondern 8-oxo-dG müsste in einem sehr langen Strang detektiert werden. Der Schaden würde auch nicht in einer mehr oder weniger optimalen Position sitzen und ob dann die Lysine eine Rolle spielen bleibt zu klären.

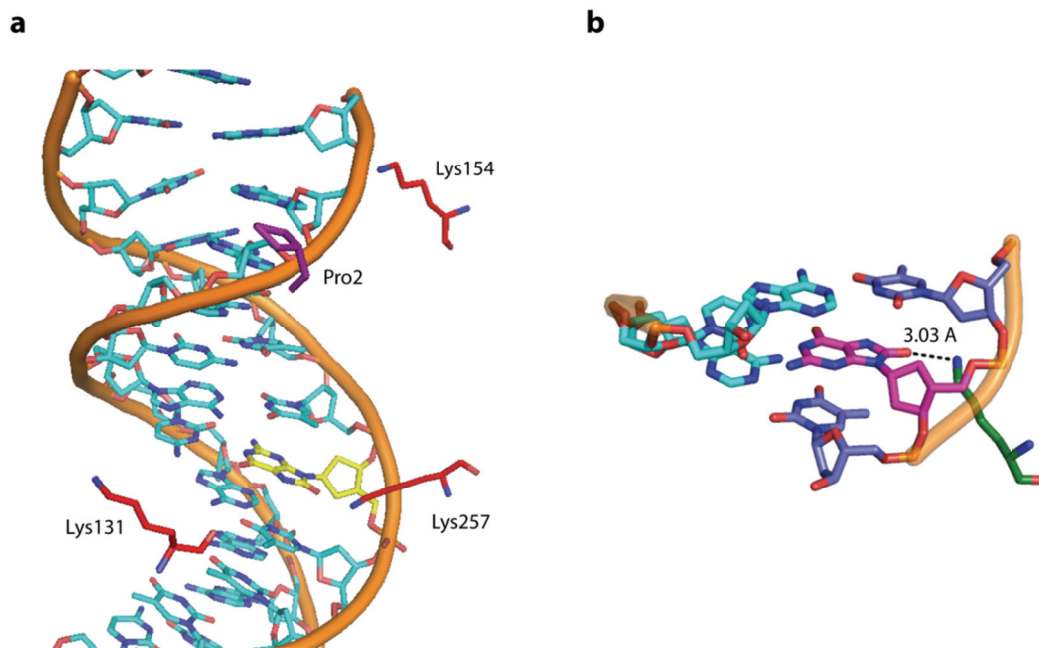


Abbildung 6.13: (a) Darstellung der mutierten Variante von Fpg in Komplex mit c8-oxo-dG geschädigter DNA. (b) Nähere Betrachtung von Lys257 und dem aktiven Zentrum.

Um weitere Übergangszustände oder Zwischenstufen zu erhalten, die eine Drehung der geschädigten Base in das aktive Zentrum zeigen, wird versucht, das aktive Zentrum schrittweise zu blockieren. Dies kann erreicht werden, in dem zunehmend mehr Aminosäuren (z. B. Alanin) an Position 1 vor das Prolin gesetzt werden.

6.1.6 Hypothetischer Mechanismus der Schadenserkennung durch Fpg

Das Auffinden einer geschädigten Base unter den Millionen von ungeschädigten Basen stellt eine besondere Herausforderung für Glykosylasen dar. Zum einen muss die Suche ohne den Verbrauch von biochemischer Energie (ATP) ablaufen, zum anderen unterscheiden sich die geschädigten von den natürlichen Basen teilweise nur minimal. Im Falle von 8-oxo-dG und dG sind die Unterschiede sehr gering. Ein zusätzliches Sauerstoffatom an C8 und

ein Wasserstoffatom an N7 stehen einem freien Elektronenpaar am N7 gegenüber. Kommt es zu einer Detektion einer geschädigten Base, so wird diese von der komplementären Base losgelöst und dem Enzym in einer exponierten Konformation zur Verfügung gestellt. Ob es anschließend zu einer vollen Rotation um die glykosidische Bindung der Base in die *syn*-Konformation kommt, muss jedoch noch geklärt werden. Es gibt strukturelle Daten, die zeigen, dass 8-oxo-dG in der *syn*-Konformation in dem aktiven Zentrum von *B. stearothermophilus* Fpg liegt.^[208] Andererseits befindet sich cFaPy-dG in der *anti*-Konformation im aktiven Zentrum von *L. lactis*.^[209] Wie aus Abbildung 6.10 ersichtlich, befindet sich c8-oxo-dG in *L. lactis* Fpg (wt) in einem Zustand zwischen *syn* und *anti*. Die Base ist um 99° Richtung *syn* gedreht. Es stellt sich die Frage, inwiefern sich die Verwendung eines Carbozyklus, eines mutierten Enzyms oder die verschiedenen Schäden auf die Konformation auswirken. Die Erkennung der geschädigten Base erfolgt dann in einer extrahelikalen Position. Hierbei handelt es sich genauer gesagt um ein ‚*nucleotide flipping*‘, da nicht nur die Base, sondern das ganze Nukleotid aus der Helix gedreht wird und sich im aktiven Zentrum befindet. Aber anders als in der Struktur von *Verdine et al.*^[210] ist ein *Loop* (Aminosäuren 220-224), eine Art ‚Deckel‘ des aktiven Zentrums in der hier erhaltenen Struktur nicht geordnet. Der flexible Teil der α F- β 9-Schleife nimmt offensichtlich zwei verschiedene Konformationen ein, die als ‚offen‘ und ‚geschlossen‘ betrachtet werden können. Es stellt sich die Frage, inwieweit er geschlossen sein muss. *Castaing et al.* beschreiben eine ungeordnete (pdb: 1TDZ), aber auch eine geordnete (pdb: 3C58) Struktur des *Loops*.^[61, 209] Falls der *Loop* in der erhaltenen Struktur eine ähnlich geordnete Struktur (geschlossen) aufweisen würde, so könnte sich eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Die Stellung, welche die geschädigte Base im aktiven Zentrum einnimmt, könnte sich demnach auf die Konformation des *Loops* auswirken. Ob die Verwendung eines Carbozyklus der Grund dafür sein könnte, muss noch geklärt werden. Ferner ist zu erkennen, dass Glu6 sich in räumlicher Nähe zu der Keto-Gruppe (C8=O) befindet und eine Wasserstoffbrücke ausbilden kann bzw. die Möglichkeit einer Protonierung dieser Position besteht. Glu3 hingegen befindet sich in der Nähe der Ribose und könnte den Sauerstoff (O6') bei Ausbildung eines Kations stabilisieren. Das nukleophile Pro2 hingegen liegt in der Nähe des anomeren Zentrums, auf das der Angriff ausgeführt wird.

Nun soll ein modifizierter Mechanismus der Diskriminierung und des Herausschneidens der geschädigten Base postuliert werden. Aus zahlreichen Veröffentlichungen ist bekannt,^[204, 208, 209] dass die Aminosäuren 2-6 (PELPE) maßgeblich an der Katalyse beteiligt sind. Da es sich bei der geschädigten Base um keine gute Abgangsgruppe handelt, muss diese aktiviert werden. Durch die Aktivitätsassays hat man einen guten Überblick über die Reparatur verschiedener Substrate erhalten. Demnach ergibt sich für die Reparatur folgende Reihenfolge: 8-oxo-dG > 8-NH₂-dG > 8-OMe-dG >>> 8-Br-dG ~ 8-oxo-dA ~ dG. 8-oxo-dG stellt hiermit das beste Substrat dar, während 8-Br-dG, 8-oxo-dA und dG überhaupt nicht aus der DNA geschnitten werden und daher nicht als Substrat angesehen werden können. Betrachtet man die unterschiedlichen funktionellen Gruppen, so stellt man fest, dass hier zum einen elektronische Effekte eine Rolle spielen können. 8-oxo-dG und 8-NH₂-dG besitzen stark elektronenschiebende Gruppen am aromatischen Ring und weisen daher einen aktivierenden Einfluss auf. Des Weiteren ist eine bessere Protonierung dieser Gruppen möglich und dadurch kann diese Reihe ebenfalls erklärt werden. Während dG oder 8-Br-dG nicht an der Position 8 protoniert werden können, ist das im Falle von 8-oxo-dG und 8-NH₂-dG gut möglich. Da 8-oxo-dA an dieser Position aber auch gut protoniert werden kann, jedoch kein Substrat für Fpg darstellt, müssen noch andere Kriterien eine Rolle spielen.

Die vorhandenen Daten dieser und anderer Glykosylasen weisen auf einen dissoziativen S_N1-Mechanismus hin.^[211, 212] Nachdem sich die geschädigte Base im aktiven Zentrum des Enzyms befindet, kommt es zu einer Spaltung der C1'-N-glykosidischen Bindung, die durch den anomeren Effekt unterstützt wird. Die Reaktion läuft über einen Übergangszustand, dem Oxo-Carbenium-Kation, das durch Glu3, Pro2 und der negativen Ladung der Base stabilisiert wird.

Die Stabilisierung durch Glu3 ist ein essentieller Faktor bei diesem Mechanismus, da wie bereits erwähnt, die Mutation von Glu3 zu einem völligen Verlust der Aktivität führt. Die Carboxylgruppe von Glu3 liegt bei pH 7 in diesem Milieu deprotoniert vor und steht somit für die Stabilisierung zur Verfügung. Glu6 ist für die Protonierung von C8=O verantwortlich, in dessen Folge die entstandene negative Ladung der Base besser stabilisiert werden kann und die Base eine bessere Abgangsgruppe darstellt. Das freie Elektronenpaar der Base

deprotoniert den Stickstoff von Pro2, wird von dem Zuckerrest endgültig entfernt und liegt nun unreaktiv vor. Das nun vorhandene freie Elektronenpaar des Stickstoffs greift unter Ausbildung einer Schiff'schen Base das Oxo-Carbenium-Kation an C1 an und neutralisiert die positive Ladung. Anschließend kommt es zu einer β -Eliminierung und einer ersten Spaltung des Phosphodiesters. Durch eine δ -Eliminierung wird die zweite Phosphodiesterbindung gespalten, in dessen Folge eine abasische Stelle entsteht.

Grundsätzlich wird der Mechanismus der Diskriminierung zwischen geschädigten und ungeschädigten Basen von der Möglichkeit der Protonierung der Base und der Schnelligkeit dieser Reaktion getrieben. Die Kinetik spielt demnach eine große Rolle bei der Schadensdetektion. Dies hat zur Folge, dass die Base eine bessere Abgangsgruppe darstellt und es zu einer Spaltung der glykosidischen Bindung kommt. Falls es sich um eine ungeschädigte Base handelt, oder die Protonierung, wie im Falle von 8-Br-dG nicht möglich ist, so kann die Reaktion nicht ablaufen und die Reparatur wird nicht durchgeführt. Die Base wird demnach in einer extrahelikalen Position erkannt, jedoch falls es sich um kein Substrat handelt wieder in die DNA Doppelhelix gedreht. Zusätzlich kommen noch weitere strukturelle Effekte hinzu, da 8-oxo-dA kein Substrat für Fpg darstellt. Hierfür müssen noch weitere kristallographische Daten herangezogen werden.

6.2 Die Proteine Rad4 und Rad23

Um das *rad23*-Gen zu amplifizieren wurde eine PCR mit der genomischen DNA von *S. cerevisiae* als Target-DNA und den Primern 22 und 23 durchgeführt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit Hilfe der *BP-Clonase* II in den Entry-Vektor pDONR201 kloniert. Anschließend wurde das Gen in einer zweiten Reaktion durch die *LR Clonase* II in den Vektor pDest007 transferiert. Nach erfolgreicher Verifizierung des Vektors wurde dieser in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert. Die Bakterienkultur wurde bei einer $OD_{600} = 0.6$ zum Start der Expression mit Anhydrotetracyclin versetzt. Nach einer Expressionsdauer von 16 h bei 18°C wurde der Zellüberstand verworfen und nach Aufschluss der Zellen wurde das Zelllysate über eine Strep-tactin-Säule (IBA, Göttingen) aufgereinigt. Um das Protein bis zur Homogenität aufzureinigen, wurde das Protein über eine MonoQ-Säule weiter gereinigt. Die Elution des Proteins erfolgte in Puffer RSA bei einer Salzkonzentration von ca. 500 mM. Das Eluat wurde aufkonzentriert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Reinigungsschritte wurden per SDS-PAGE (siehe Abbildung 6.14) kontrolliert und Rad23 per MALDI-TOF Analyse verifiziert. Rad23 wurde in *Photoaffinity labeling* Experimenten eingesetzt (Kapitel 6.3.3.4).

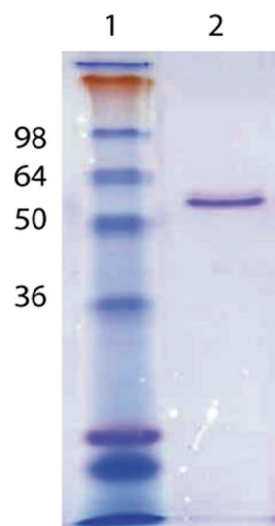


Abbildung 6.14: Coomassie gefärbtes 12.5 % SDS-Gel von Rad23. 1:SeeBlue® Plus2 Marker; 2: Rad23.

Im Falle von Rad4 war es nicht möglich das Protein in *E. coli* zu exprimieren, da ein Abschnitt des Proteins für die bakteriellen Zellen toxisch ist.^[213] Daher wurde ein alternatives Expressionssystem verwendet und Rad4 sollte daher in *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), einem Hefestamm, der vor allem in der Lebensmittelindustrie Anwendung findet, exprimiert werden. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des *K. lactis* Protein Expression Kits (NEB) bietet sich in der Sekretion des exprimierten Proteins in das Medium, um vorzeitige Degradation in der Zelle zu vermeiden. Um die Sekretion zu erreichen, wird das Protein C-terminal des α -mating factors (MF) in pKLAC1 kloniert und es entsteht ein α -MF-Fusionsprotein. Diese Domäne schleust das Protein durch den Hefe-Sekretionspfad aus der Zelle heraus, während die Kex-Protease im Golgi-Apparat den α -mating factor abschneidet. Aber es ist auch möglich, ein natives Protein zu exprimieren, das in der Zelle bleibt. Dazu muss das gewünschte Gen in die einzige *HindIII*-Schnittstelle des Vektors kloniert werden, in dessen Folge es nicht zur Expression des α -mating factors kommt, sondern das Protein nativ vorliegt. Im Falle von Rad4 wurden beide Methoden angewendet. Um eine bessere Aufreinigung durchführen zu können, wurde ein C-terminaler His₆-tag eingeführt. Es wurde eine PCR mit den Primern 20 und 19 bzw. 21 und der genomischen DNA aus *S. cerevisiae* als *Templat*-DNA durchgeführt. Nach Aufreinigung des PCR-Produkts wurde dieses in den Vektor pKLAC1 kloniert und zur Vervielfältigung in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach einer Plasmidpräparation wurde der Vektor nach Herstellerangaben mit *SacII* linearisiert und in kompetente *K. lactis*-Zellen transformiert. Nach einer Inkubation bei 30°C über 4 Tage entstanden die Kolonien, die aufgrund des Selektionsdrucks das gewünschte Gen enthielten. Dies konnte durch eine PCR nachgewiesen werden. Leider konnte nach einer Expression das Protein nicht detektiert werden.

6.3 Das Protein Rad14

6.3.1 Allgemeines

Um einen besseren Einblick in die primäre Schadenserkennung der *NER* zu bekommen, sollten die Eigenschaften von Rad14 genauer untersucht werden. Für die Durchführung von Bindungs- und Kristallisationsstudien wurden drei verschiedene Konstrukte von Rad14 kloniert und aufgereinigt. Es handelt sich um das Volllängenprodukt, eine N-terminal verkürzte Variante ($\Delta 9\text{NRad14}$) und ein stark verkürztes Konstrukt, bei dem es sich nur um das DNA-bindende Fragment (Rad14-DBD) handelt.

6.3.1.1 Klonierung, Expression, Aufreinigung und Eigenschaften des Proteins Rad14 (Rad14 und $\Delta 9\text{NRad14}$)

Die Expression von Rad14 in *S. cerevisiae* wurde 1993 von Guzder *et al.* zum ersten Mal beschrieben.^[186] Die Expression von Rad14 erfolgte in *S. cerevisiae* mit einer anschließenden nativen Aufreinigung. Nach einigen Jahren wurde die Expression von rekombinantem Rad14 in *E. coli* beschrieben, der sich eine Affinitätschromatographie anschloss.^[187] Da es sich bei den veröffentlichten Daten jeweils um 9-Aminosäuren N-terminal verkürzte Versionen von Rad14 handelt, sollte in dieser Arbeit u. a. die Volllängen Version von Rad14 kloniert und exprimiert werden. Dazu wurde das 1. Exon (1-27 bp) über den 5'-Primer (Primer 13), welcher an das 2. Exon bindet, in das PCR-Produkt eingebaut; als 3' Primer wurde Nr. 14 verwendet. Da rekombinantes Rad14 als Fusionsprotein mit einem Affinitäts-tag aufgereinigt werden sollte, wurde das PCR-Produkt von Rad14 in pENTRY-IBA10 mit Hilfe der StarCombinaseTM (Kapitel 5.3.8.1) kloniert. Anschließend wurde das Gen in einer weiteren Reaktion (Kapitel 5.3.8.2) mit Hilfe der Stargate[®] Methode in den Destinationsvektor pPSG-IBA3 überführt. Bei diesem Destinationsvektor handelt es sich um einen Vektor mit T7-Promoter und einem C-terminalen Strep-tagII. Die Verifizierung der Plasmide wurde mit einem Restriktionsverdau (XbaI und HindIII, nach

Herstellerangaben) und per Sequenzierung durchgeführt. Das Expressionsplasmid wurde nun in einen *E. coli* Expressionsstamm transformiert. Nach mehreren Testexpressionen mit verschiedenen Expressionsstämmen stellte sich heraus, dass eine 3-stündige Expression bei 25°C die größte Proteinausbeute mit BL21 (DE3) liefert. Da es sich um ein Protein mit einem Zinkfinger-Motiv handelt wurde dem Medium vor der Induktion ZnCl_2 (10 μM) zugesetzt. In Tabelle 6.6 sind noch einmal die optimalen Expressionsbedingungen zusammen gefasst.

Tabelle 6.6: Optimale Bedingungen für die Expression von Rad14.

<i>E. coli</i> Substamm	BL21 (DE3)
Wachstumstemperatur	37°C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	0.8
Endkonzentration IPTG	1 mM
Zusatz	10 μM ZnCl_2
Zeitdauer der Expression	3 h
Expressionstemperatur	25°C
Schüttlergeschwindigkeit	225 rpm

In Abbildung 6.15 sind die Plasmidkarten von pPSG-IBA3-Rad14 (**a**) und pPSG-IBA3- Δ 9NRad14 (**b**) dargestellt.

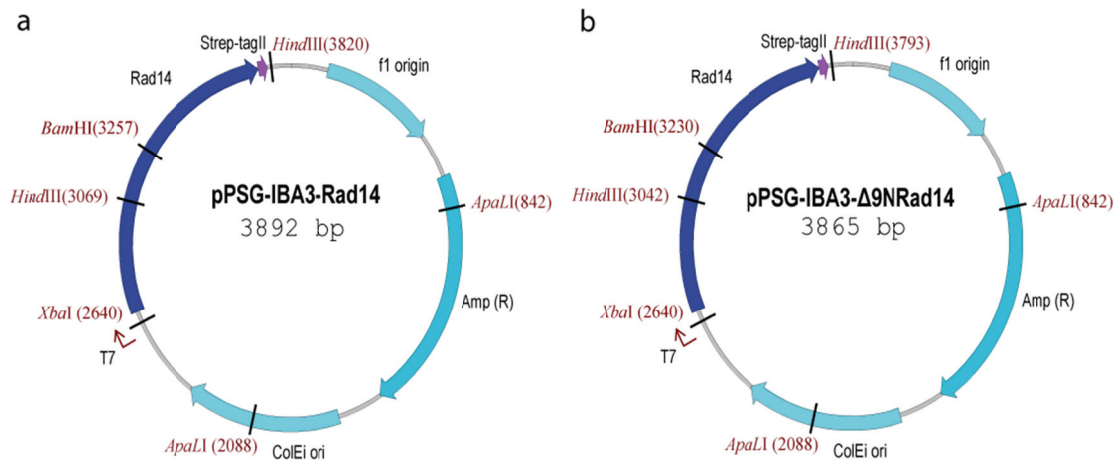


Abbildung 6.15: Plasmidkarten von pPSG-IBA3-Rad14. (a) Volllänge; (b) N-terminal verkürzt.

Die beiden Varianten von Rad14 wurden nach den in den Kapiteln 5.4.5.2 bis 5.4.5.9 beschriebenen Prozeduren aufgereinigt, aufkonzentriert und aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. In Tabelle 6.7 sind die einzelnen Aufreinigungsschritte der verschiedenen Konstrukte aufgeführt und in welcher Konzentration diese gelagert worden sind.

Tabelle 6.7: Verwendete Säulen bei der Aufreinigung der einzelnen Rad14-Konstrukte und Konzentration der gelagerten Aliquots.

Konstrukt	1. Säule (Affinität)	2. Säule (Ionentauscher)
Rad14 (1 mg/mL)	Strep-tagII	Source 15S
$\Delta 9\text{NRad14}$ (1 mg/mL)	Strep-tagII	Source 15S
Rad14-DBD (5 mg/mL)	Strep-tagII	Mono Q

In Abbildung 6.16 sind die Chromatogramme der Aufreinigung von Rad14 (Volllänge, als auch verkürzt) dargestellt. In a ist das Chromatogramm der Strep-tagII-Aufreinigung zu sehen. Fraktionen B15 bis B1 wurden eingeeengt und weiterverwendet. Das Gemisch aus Protein (blaue Linie, 280 nm) und DNA (rote Linie, 260 nm) wurde mit Hilfe eines starken Kationenaustauschers

getrennt. Der Durchfluß wurde verworfen, das Eluat (bei ca. 600 mM NaCl) eingengt, umgepuffert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

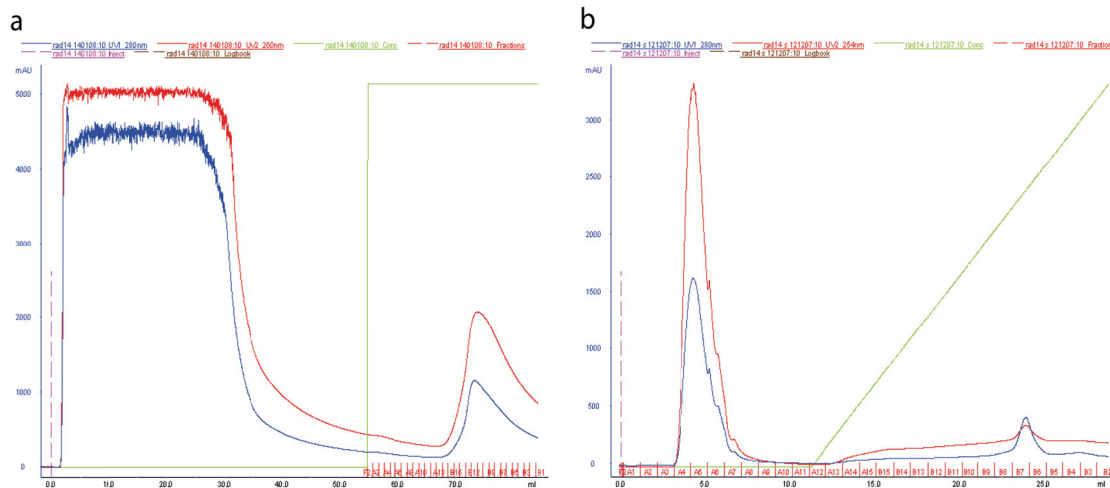


Abbildung 6.16: (a): Chromatogramm der Strep-tagII Aufreinigung von Rad14. (b): Chromatogramm der Aufreinigung von Rad14 über Source 15S.

Um sicherzustellen, dass es sich um das richtige Protein handelt wurden alle Reinigungsschritte per SDS-PAGE kontrolliert und anschließend ein Western-Blot mit einem anti-Rad14 Antikörper (Maus-Polyklonaler Antikörper, Abcam # ab22092, Verdünnung 1:1000) durchgeführt (Abbildung 6.17). Man erkennt deutlich, dass das Protein durch zwei Aufreinigungsschritte bis zur Homogenität gereinigt und dies durch den spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich wurde das Protein massenspektrometrisch untersucht und die richtigen Peptidfragmente nach einem Trypsinverdau zugeordnet. In Abbildung 6.18 sind die Massen der Peptidfragmente aufgeführt, die nach einem Trypsin-Verdau erhalten wurden. Die erhaltenen Massenpeaks (MALDI-TOF) wurden durch das Programm Mascot mit den theoretisch erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Dabei zeigte sich eine Sequenzabdeckung von 47.7 %. Durch diese Größe kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das gewünschte Protein handelt.

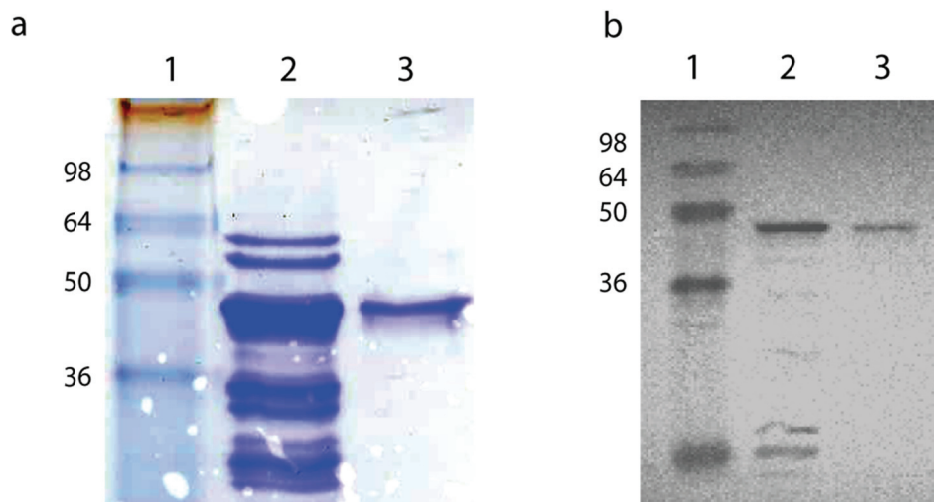


Abbildung 6.17: SDS-Gel und Western-blot von Rad14. **(a)** Coomassie gefärbtes 12.5 % SDS-Gel der Reinigungsstufen von Rad14; 1:SeeBlue[®] Plus2 Marker; 2: Nach Strep-tagII Reinigung; 3: Nach Source S Aufreinigung. **(b)** Western-blot der Reinigungsstufen von Rad14; 1:SeeBlue[®] Plus2 Marker; 2: Nach Strep-tagII Reinigung; 3: Nach Source S Aufreinigung.

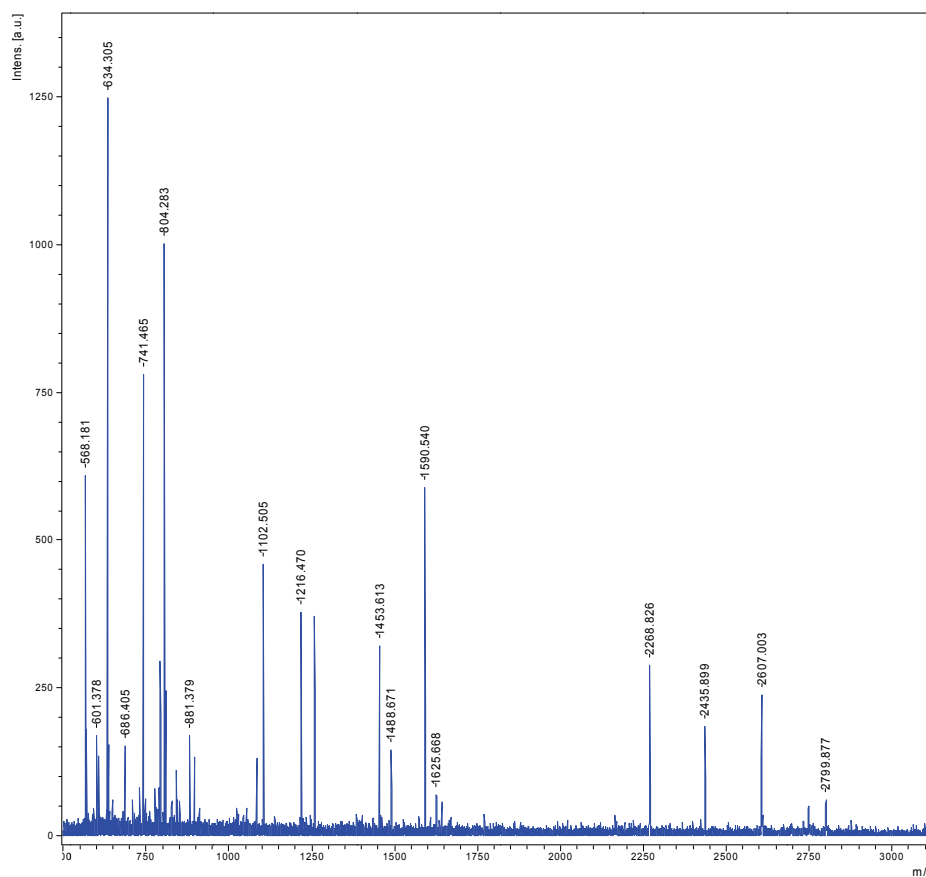


Abbildung 6.18: Massenspektrometrische Untersuchung von Rad14.

Die Aufreinigungen für das Volllängenprodukt und das N-terminal verkürzte Fragment verliefen identisch und konnte ebenfalls durch SDS-PAGE, Western-Blots und massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt werden.

6.3.1.2 Klonierung, Expression, Aufreinigung und Eigenschaften des DNA bindenden Fragments von Rad14 (Rad14-DBD)

Da für die Aufklärung des Mechanismus der primären Schadenserkennung nicht nur biochemische Experimente von Nöten sind, sondern auch eine Kristallstruktur des Proteins mit geschädigter DNA sehr nützlich ist, sollte Rad14 mit Acetylaminofluoren-geschädigter DNA kristallisiert werden. Da für dieses Protein keine kristallographischen Daten vorhanden sind, jedoch für das humane Homologe XPA eine NMR-Struktur existiert, wurde die Strategie an die verkürzte Version von XPA angelehnt. Kuraoka *et al.* identifizierte in XPA eine Bindungsdomäne für geschädigte DNA.^[214] Es handelt sich hierbei um eine 122 Aminosäuren lange, minimale DNA-Bindungsdomäne, welche die Affinität für geschädigte DNA aufrecht hält. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine NMR-Struktur mit cis-Pt geschädigter DNA veröffentlicht.^[138] Im Falle von Rad14 sollte ebenfalls nur die minimale DNA bindende Domäne kristallisiert werden. Dazu wurden die Sequenzen von Rad14 und XPA verglichen und eine Sekundärstruktur-Vorhersage mit Hilfe von Jpred 3 getroffen. Dies ist nützlich, um möglicherweise nicht geordnete Bereiche ausschließen zu können, da Sekundärstruktur-Elemente die Kristallisation beeinflussen können. In Abbildung 6.19 ist ein Ausschnitt der Vorhersage der Sekundärstruktur von Rad14 zu sehen. Bei dem rot markierten Bereich handelt es sich um die ausgewählte Domäne, die geordnete Bereiche aufweist und dies möglicherweise sich positiv auf die Kristallisation auswirken könnte. Dieser Bereich gehört zu der minimalen DNA Bindungsdomäne (Rad14-DBD), die geschädigte DNA erkennt und diese auch bindet. Diese stark verkürzte Variante von Rad14 besteht aus den Aminosäuren 185-306.

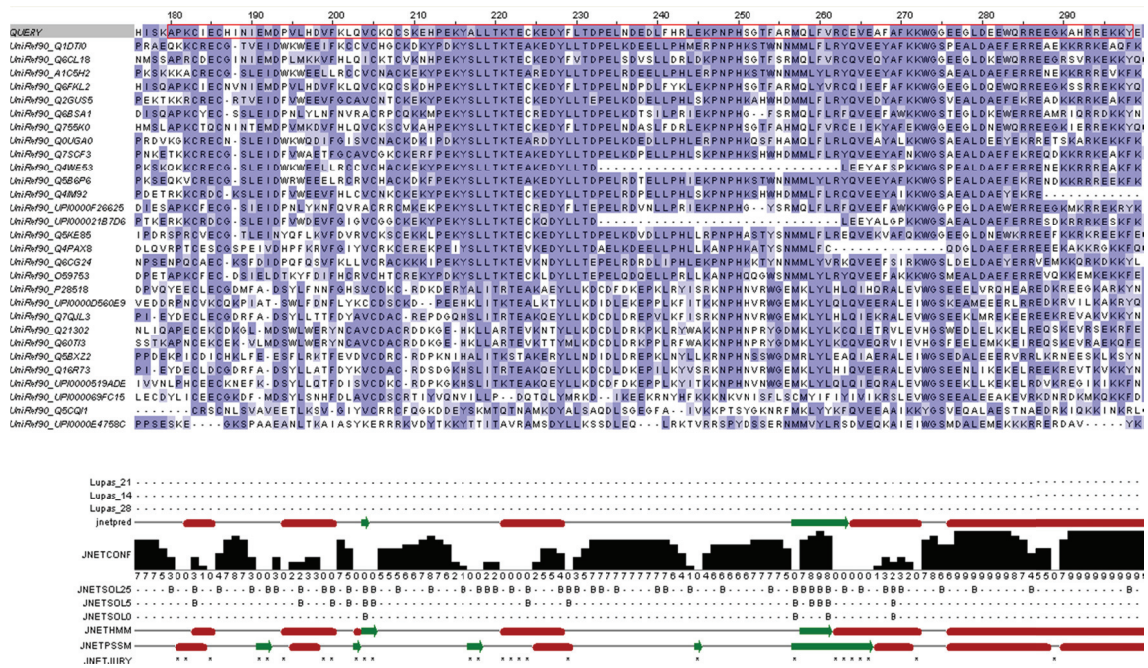


Abbildung 6.19: Vorhersage der Sekundärstruktur im ausgewählten Bereich durch das Programm JPred 3. Die verwendete Aminosäuresequenz ist in Rot dargestellt.

Dazu wurden Primer 15 und 16 und pENTRY-IBA10-Rad14 als Template in einer PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, extrahiert und anschließend mit Hilfe der StarCombinase® in einen Entry-Vektor (pENTRY-IBA10) überführt. In einer weiteren Reaktion wurde das Gen in den Destinations-Vektor pPSG-IBA-3-Rad14-DBD überführt. Die Vektorkarte dieses Plasmids ist in Abbildung 6.20 zu sehen.

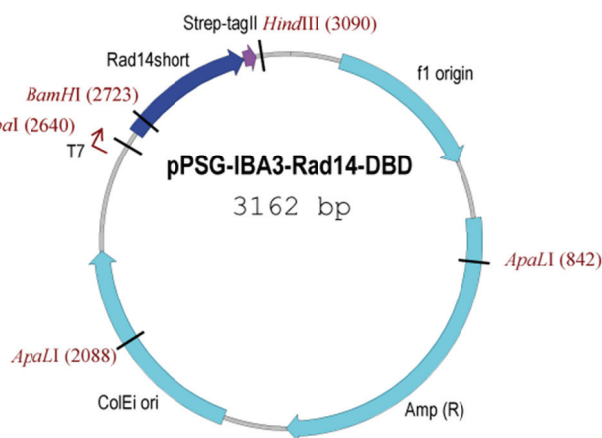


Abbildung 6.20: Plasmidkarte von pPSG-IBA3-Rad14-DBD.

Dieser Vektor wurde in BL21 (DE3) transformiert und unter den bereits angegebenen Bedingungen exprimiert. Für die Aufreinigung wurden eine Strep-tagII-Säule und eine Mono Q-Säule verwendet. In nachfolgender Abbildung sind die Chromatogramme der Aufreinigungsschritte und die Kontrolle der Reinheit durch ein SDS-Gel zu sehen. Die Fraktionen B15-B1 der Strep-tagII-Aufreinigung wurden aufkonzentriert und auf einen starken Anionenaustauscher (Mono Q, GE Healthcare) aufgetragen. Hierbei wurden bei einem Salzgehalt von ca. 300 mM NaCl die bis zur Homogenität aufgereinigten Fraktionen gesammelt, umgepuffert, aufkonzentriert und sofort zur Kristallisation verwendet. Die für die bei der Kristallisation benötigte Reinheit wurde per SDS-PAGE kontrolliert und in **c** ist in Spur 4 das Protein mit einer Größe von ca. 14 kDa zu erkennen.

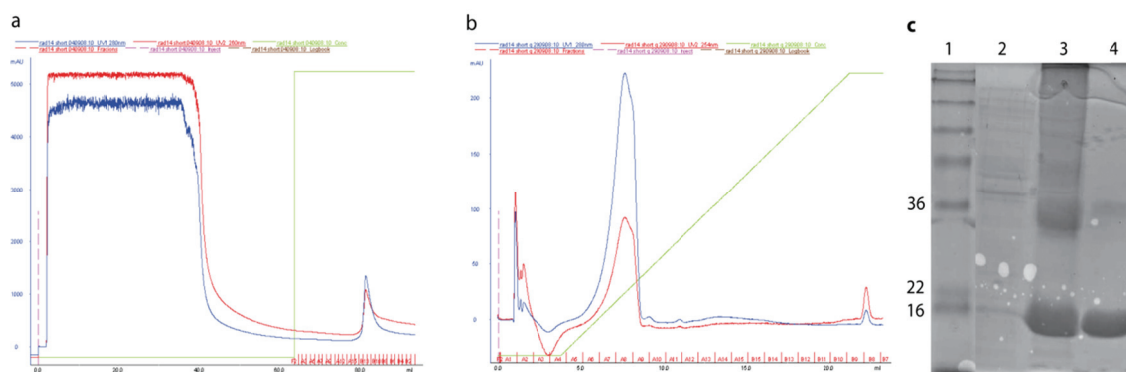


Abbildung 6.21: Chromatogramme der Aufreinigung und SDS-Gel der Aufreinigungsschritte. (a) Chromatogramm der Strep-tagII-Aufreinigung. (b) Chromatogramm der Aufreinigung über eine Mono Q-Säule. (c) Coomassie gefärbtes SDS-Gel: 1: SeeBlue® Plus2, 2: Zelllysate nach 3 h Induktion, 3: Nach Strep-tagII Aufreinigung, 4: Nach Mono Q-Aufreinigung.

6.3.2 Fluoreszenz-Polarisationsmessungen von Rad14

Wie bereits beschrieben, können mehrere Methoden verwendet werden, um DNA-Protein-Bindungen nachzuweisen. Eine experimentell einfachere Variante im Vergleich zu *electromobility shift assays* stellt die Fluoreszenz-

Polarisationsmessung dar. Die Methode ist in Kapitel 5.6.5 bereits erläutert worden. Dazu wurde die Fluoreszenz eines DNA-Proteingemischs nach einer Inkubationszeit mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroplattenreaders gemessen. In diesem Fall muss ein DNA-Strang Fluorescein markiert sein. In Tabelle 6.8 sind die verwendeten DNA-Stränge aufgeführt. Ein Reaktionsansatz betrug insgesamt 100 µL mit folgendem Reaktionspuffer: 25 mM HEPES-KOH pH 8.3, 100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 45 µg/mL BSA und 10 % (v/v) Glycerin. Eingesetzt wurden jeweils 10 µM DNA und die in Abbildung 6.22 angegebenen Konzentrationen an Rad14. In diesem Fall wurde Δ9NRad14 verwendet, spätere Experimente mit dem Volllängenprodukt brachten dieselben Ergebnisse zutage. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend sofort in schwarze *96well Microplatten* (Nunc, ThermoFischer Scientific) überführt und mit einem Tecan *Microplattenreader* gemessen.

Tabelle 6.8: Aufstellung der verwendeten DNA-Stränge. **Z** = dG-AAF, **YY** = Pt-GG.

ODN	Sequenz
14	5'-Fluo-TCTCTC G CTCATCCAC -3' 3'- AGAGAG C GAGTAGGTG-5'
15	5'-Fluo TCTCTC G CTCATCCAC-3' 3'- AGAGAG G GAGTAGGTG-5'
16	5'-Fluo-TCTCTC Z CTCATCCAC -3' 3'- AGAGAG C GAGTAGGTG-5'
17	5'-Fluo- TCTCTC YY TTCTCTTCT-3' 3'- AGAGAG CC AAGAGAAGA-5'

In nachfolgender Abbildung sind die Ergebnisse zu sehen. Auf der x-Achse ist die steigende Konzentration von Rad14 indiziert und auf der y-Achse der Polarisationswert. Bei allen vier DNA-Strängen ist ein Anstieg der Polarisierung mit Zunahme der Rad14-Konzentration zu erkennen. Ein Anstieg der Polarisierung deutet auf eine zunehmende DNA-Protein-Bindung mit steigender

Proteinkonzentration hin. Dies lässt den Schluss zu, dass mit diesem Versuch keine Diskriminierung zwischen geschädigter (ODN **16** und **17**), fehlgepaarter (ODN **15**) und ungeschädigter DNA (ODN **14**) möglich ist. Ob das Problem an der Messmethode liegt, oder generell die Fluoreszenz-Markierung als Substrat für Rad14 dient, soll mit einem *electromobility shift assay* in nachfolgendem Kapitel geklärt werden.

Da jedoch diese Messmethode als eine verlässliche Methode zur Bestimmung von DNA-Proteinbindungen bereits erfolgreich eingesetzt werden konnte, deutet es darauf hin, dass Fluorescein durch das Rad14 als Substrat erkannt wird.

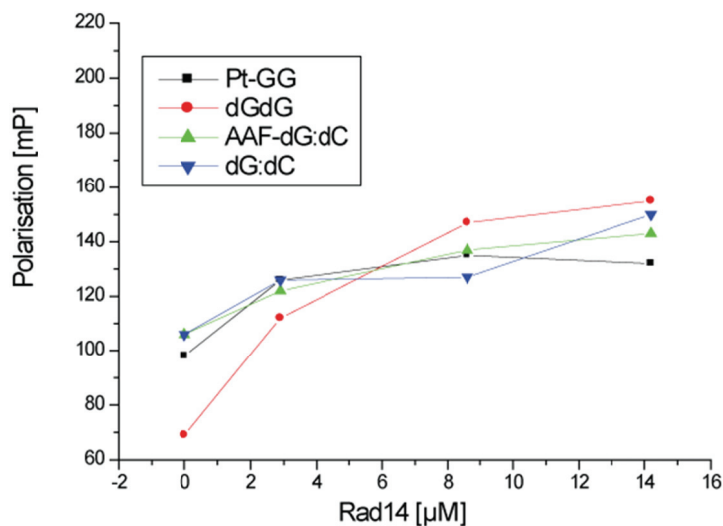


Abbildung 6.22: Ergebnisse der Fluoreszenz-Polarisationsmessung. Auf der x-Achse ist die Konzentration von Rad14 in μM angegeben und auf der y-Achse die Polarisation in mP.

6.3.3 Elektromobility shift assays (EMSA) von Rad14

6.3.3.1 EMSA mit Fluorescein markierter DNA

Um ein genaueres Bild über die Bindung von Rad14 zu geschädigter und ungeschädigter DNA zu bekommen, wurden EMSA-Experimente mit Fluorescein markierter DNA durchgeführt. In diesem Experiment wurden die geschädigten bzw. ungeschädigten (Z = G und YY = GG) DNA-Stränge aus dem vorherigen Kapitel verwendet. Hierfür wurde ein Reaktionsansatz von 10 μ L mit dem bereits beschriebenen Reaktionspuffer und den angegebenen Mengen an Protein und DNA versetzt. In Abbildung 6.23 sind die Fluoreszenzaufnahmen der Gele zu sehen. In **a** ist die Bindung zu Acetylaminofluoren geschädigter DNA und ungeschädigter DNA zu sehen. Man erkennt, dass mit steigender Proteinkonzentration sowohl mit geschädigter, als auch mit ungeschädigter DNA eine stärker werdende Bande zu sehen ist, welche auf die Bindung hinweist. In **b** ist dasselbe Ergebnis zu verzeichnen. Sowohl Pt-geschädigte DNA, als auch ungeschädigte DNA werden gleichermaßen gebunden.

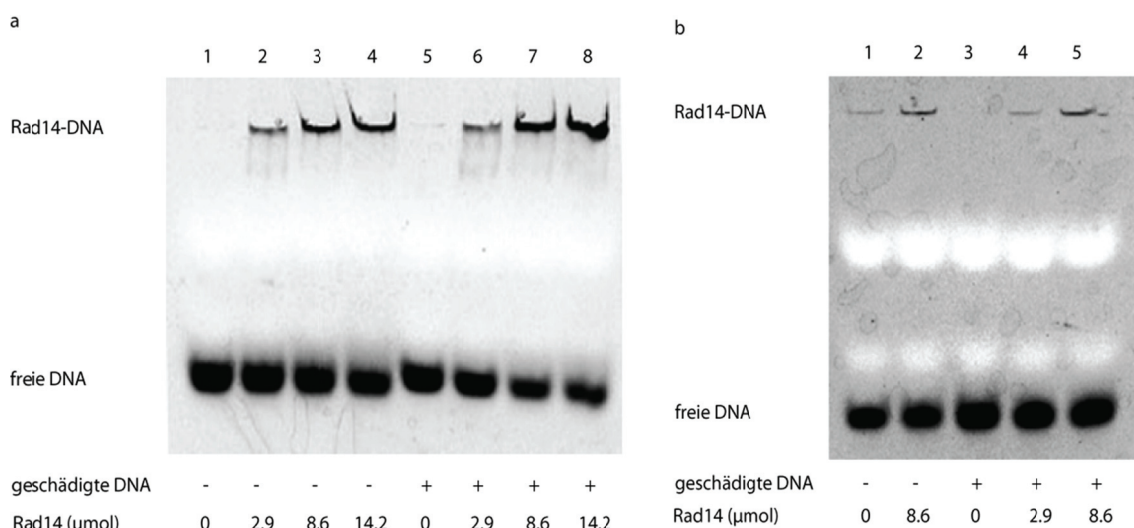


Abbildung 6.23: Fluoreszenzaufnahmen der 12 % nativen Polyacrylamidgele. (a) Studie mit AAF geschädigter DNA (ODN **16**, Spuren 5-8, jeweils 1 μ mol) und ungeschädigte DNA (ODN **14**, Spuren 1-4, jeweils 1 μ mol) mit steigender Konzentration von Rad14. (b) Pt-GG-Addukt (ODN **17**, Spuren 3-5, jeweils 1 μ mol) und ungeschädigte DNA (ODN **14**, Spuren 1 und 2) mit Rad14.

Aufgrund dieses Ergebnisses und der Fluoreszenz-Polarisationsmessungen kann darauf geschlossen werden, dass Rad14 bei den verwendeten DNA-Strängen nicht zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA unterscheiden kann. Da Fluorescein als polares DNA-Addukt Eigenschaften eines DNA-Schadens trägt, liegt die Vermutung nahe, dass in den vorangegangenen Experimenten eine Bindung von Rad14 an den markierten Strang und nicht an den Schaden stattgefunden hat. Um diese Bindung auszuschließen, wurden nun im Folgenden Bindungsstudien mit radioaktiv markierter DNA durchgeführt.

6.3.3.2 EMSA mit ^{32}P markierter DNA

Da Fluorescein ein artifizielles Target für Rad14 in den zuvor beschriebenen Bindungsstudien ist, konnte keinerlei Aussage über die Unterscheidung zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA getroffen werden. Die radioaktive Markierung von DNA mit ^{32}P weist zwei Vorteile auf. Zum einen wird durch den Einbau von ^{32}P die DNA strukturell nicht verändert, zum anderen können durch die Verwendung von modernen Phosphorimagern sehr genaue quantitative Aussagen, bei geringster Konzentration, getroffen werden. Für diese Experimente wurden fünfzehn verschiedene DNA Duplexe hergestellt (ODN **18-32**), die die wichtigsten Schäden durch UV-Belichtung oder elektrophilen Karzinogenen an definierten Positionen aufweisen. In Tabelle 6.9 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide mit den zugehörigen Schmelztemperaturen der Duplexe dargestellt. Oligonukleotide **18** und **19** enthalten entweder ein Cyclobutanpyrimidin Dimer (CPD) oder einen Pyrimidin-Pyrimidon T(6-4)T^[215] Schaden an den Positionen XX. Diese beiden Schäden gehören zu den häufigsten UV-induzierten DNA Schäden. Ferner wurden Oligonukleotide hergestellt, die entweder einen Pt-GG (YY, ODN **21**) oder einen Pt-GTG (YTY, ODN **22**) intrastrang *crosslink* aufweisen. Diese beiden Schäden sind die durch eine Chemotherapie typischerweise gebildeten Hauptaddukte mit Cisplatin.^[201] Die Adduktschäden dG-AAF, dG-AF und dG-AAP wurden an den Z-Positionen in den Oligonukleotiden **25-27** eingebaut. Bei den hier verwendeten DNA-Schäden handelt es sich um gängige *NER* Substrate, wobei der CPD-Schaden die schwächste Antwort hervorruft.^[165] Für die Herstellung von CPD-,^[200] dG-AAF-,^[216] dG-AF- und dG-AAP-enthaltenden Oligonukleotide,

wurden die Phosphoramidite der DNA-Schäden synthetisiert und mit Hilfe der Festphasensynthese^[217, 218] in DNA-Einzelstränge eingebaut. Pt-GG-, Pt-GTG- und T(6-4)T-enthaltende Oligonukleotide wurden hergestellt, indem einzelsträngige DNA entweder mit Cisplatin^[201, 219] oder durch Belichtung mit UV-Strahlung (254 nm) unter Luftausschluss behandelt wurden.^[21, 217] Die Einzelstränge wurden durch eine zweifache HPLC-Auftrennung bis zu einer Reinheit >99% aufgereinigt und mit den zugehörigen ³²P-markierten Gegensträngen zu einem stabilen Duplex hybridisiert. Um sicherzustellen, dass während der Reaktion bei 30°C ein stabiler Duplex vorhanden ist, wurden die Schmelzpunkte aller Doppelstränge mit einem UV-Spektrometer aufgenommen. Es zeigte sich, dass alle Doppelstränge einen Schmelzpunkt von mindestens 50°C aufweisen und somit während der Reaktion stabil bleiben.

Tabelle 6.9: Darstellung der verwendeten Oligodesoxynukleotide mit zugehörigen Schmelztemperaturen.

ODN	Schaden	Schm.temp.	Sequenz
18	XX = CPD	T _M = 55°C	5'- ³² P-ACAGCGG XX GCAGGT-3'
19	XX = T(6-4)T	T _M = 51°C	3'- TGTCGCC AA CGTCCA-5'
20	XX = TT	T _M = 62°C	
21	YY = Pt-GG	T _M = 54°C	5'- ³² P-TCCTCTCTT YY TTCTCTTCT-3'
22	Y Y = GG	T _M = 62°C	3'- AGGAGAGAA CC AAGAGAAGA-5'
23	YTY= Pt-GTG	T _M = 52°C	5'- ³² P-TCCTCTCTT YTY TTCTCTTC-3'
24	YTY= GTG	T _M = 61°C	3'- AGGAGAGAA CAC AAGAGAAG-5'
25	Z = dG-AAF	T _M = 50°C	5'- ³² P-TCTCTC Z CTCATCCAC-3'
26	Z = dG-AF	T _M = 52°C	3'- AGAGAG C GAGTAGGTG-5'
27	Z = dG-AAP	T _M = 51°C	
28	Z = dG	T _M = 55°C	
29	Z = dU-FI	T _M = 52°C	5'- ³² P-TCTCTC W CTCATCCAC-3'
30	Z = dT	T _M = 53°C	3'- AGAGAG A GAGTAGGTG-5'

Als Kontrollexperiment wurde die Bindung von Rad14 zu den entsprechenden ungeschädigten Doppelsträngen (XX = TT, YY = GG, YTY = GTG, Z = G, W = T) durchgeführt. Zusätzlich wurde in den Experimenten die geschädigten Einzelstränge verwendet, um ausschließen zu können, dass die DNA-Protein-Bindung im Zuge des Aufschmelzens des Doppelstranges entsteht, oder Rad14 einzelsträngige DNA erkennt. Um zu untersuchen, ob die Länge des Doppelstranges Einfluss auf das Bindungsverhalten von Rad14 aufweist, wurde CPD in ein 27mer Oligonukleotid und dG-AAF in ein 30mer Oligonukleotid eingebaut (siehe Tabelle 6.10). Im Fall des CPD enthaltenen 27mers wurde ein bioisosterisches CPD-Analogon mit einem Formacetal-Rückgrat verwendet (Abbildung 6.24 a).^[18]

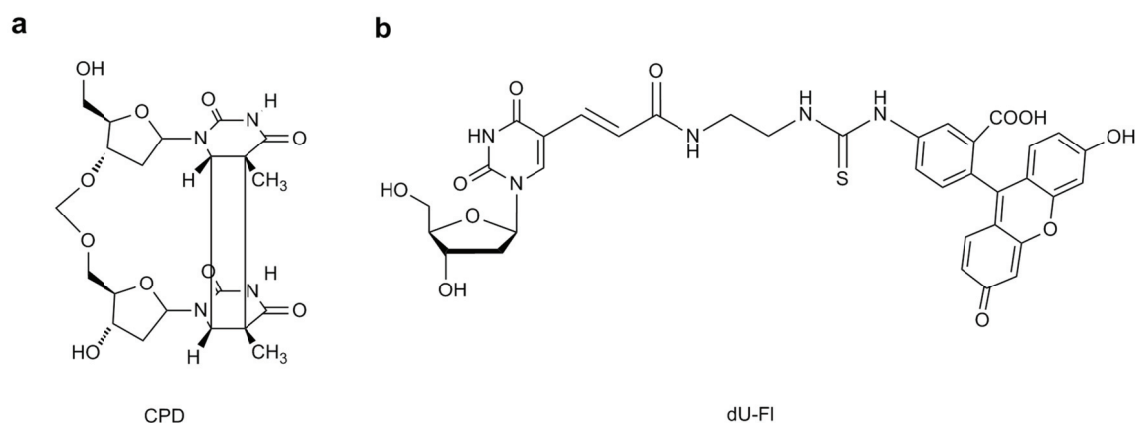


Abbildung 6.24: (a) Struktur des bioisosterischen CPD-Analogon mit Formacetalrückgrat. (b) Fluorescein-dU.

Tabelle 6.10: Verwendete Oligonukleotide mit längerer Sequenz.

ODN	Schaden	Sequenz
31	XX = CPD	5'- ³² P-AAGTCAAGTACTTGA XX ACTGGTCATT-3' 3'- TTCAGTTCATGAACT AA TGACCAGTAA-5'
32	Z = dG-AAF	5'- ³² P-GTGATTCCGGCA Z GCGTGCGACCTGGCTAG-3' 3'- CACTAAGGCCGT C CGCACGCTGGACCGATC-5'

Um den Erkennungsprozess von Rad14 zu untersuchen, wurde eine Lösung bestehend aus Rad14 und den 5'-³²P markierten Oligonukleotiden (**18-32**) inkubiert und die Verschiebung der Banden auf einem nicht-denaturierenden Gel (native PAGE) untersucht. Zuerst wurde die Bindung von Rad14 zu den UV-induzierten Schäden CPD und T(6-4)T studiert, wissend, dass es sich bei T(6-4)T um ein exzellentes Substrat für die *NER* handelt.^[165] 33 fmol der geschädigten Oligonukleotide **18** und **19** und ein ungeschädigtes Oligonukleotid (**20**, XX = TT) als Kontrolle wurden mit einer steigenden Menge von Rad14 inkubiert. Wie man in Abbildung 6.25 **a** erkennen kann, kam es zu keiner Verschiebung der Banden (Spur 2 und 4). Selbst mit einer höheren Konzentration an Rad14 (Spur 3 und 5) ist kein Unterschied zum Kontrollexperiment (Spur 6) sichtbar. Da die Bindung von Rad14 zu dieser Art von Schäden eine anerkannte Tatsache ist, ist das als ein überraschendes Ergebnis zu werten. Um auszuschließen, dass Rad14 den Schaden nur in einem offenen Duplex erkennt, wurde die Bindung von Rad14 auch zu einzelsträngiger T(6-4)T DNA untersucht. Auch hier ist keine Bindung feststellbar. Ob die Länge der Oligonukleotide einen Einfluss auf das Bindungsverhalten aufweist wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht. In Abbildung 6.25 **f** ist zu sehen, dass Rad14 einen längeren Doppelstrang mit CPD (27mer, ODN **31**) ebenfalls nicht bindet. Da auch hier keine Bindung entdeckt werden konnte, kann darauf geschlossen werden, dass Rad14 keinerlei Affinität zu ungeschädigter oder UV-geschädigter ssDNA und dsDNA aufweist. Als nächstes wurde Cisplatin geschädigte DNA untersucht. Das Chemotherapeutikum Cisplatin reagiert bevorzugt mit zwei benachbarten Guanin-Nukleotiden, in dessen Folge ein verbrücktes Pt-GG Dinukleotid, oder Pt-GTG Trinukleotid entsteht, welches schwere strukturelle Veränderungen im DNA-Duplex hervorruft. Eine bestätigte Tatsache ist, dass Cisplatin-Schäden durch *NER* effizient repariert werden.^[165] Tatsächlich kann man an den Bindungsstudien in Abbildung 6.25 **b** erkennen, dass Rad14 den Duplex mit einem Pt-GG-Schaden erkennt und bindet (Spur 2-4). Ferner konnte festgestellt werden, dass das Pt-GTG-Trinukleotid (ODN **23**, Spur 5-7) sehr viel schlechter erkannt wird, obwohl der Helix-destabilisierende Effekt sehr viel größer als bei Pt-GG ist, was auch durch die Reduktion der Schmelztemperatur von zusätzlichen 2°C bestätigt wird.

Schließlich wurde das Bindungsverhalten von Rad14 zu DNA untersucht, welche sperrige DNA-Addukte trägt, die metabolisch aktiviert werden und mit DNA reagieren können.^[111] Sowohl dG-AAF, als auch dG-AF sind hervorragende Substrate für eine starke *NER* Antwort.^[165] Abbildung 6.25 c zeigt die erhaltenen *gelshifts*. Für beide Schäden ist nun eine starke Verschiebung der Bande zu sehen (Abbildung 6.25 c; ODN **25** (Spur 1-4) und Spur 5-7 (ODN **26**)). Dies deutet auf einen stabilen Protein-DNA-Komplex hin. Es ist auch deutlich zu erkennen, dass dG-AAF viel besser erkannt und gebunden wird als dG-AF. Veröffentlichte Daten zeigen, dass dG-AAF *in vivo* eine stärkere *NER*-Antwort aufweist.^[220] Um zu prüfen, ob ein längeres Oligonukleotid (30mer) eine stärkere Bindung hervorruft, wurde die Bindung von Rad14 zu dem DNA Duplex **32** untersucht, der ein eingebautes dG-AAF enthält. Auch hier wurde eine ähnliche Bande beobachtet, der Einfluss der Länge des Oligonukleotid scheint keine oder nur eine kleine Auswirkung auf die Bindungsaffinität zu haben (Abbildung 6.25 g). Desweiteren wurde die Bindung zu dem Pyren-Analogon dG-AAP untersucht, welches dieselben strukturellen Elemente wie dG-AAF und dG-AF aufweist, nämlich einen planaren aromatischen Rest an der Position C8 der Purinbase. Auch hier konnte eine klare Bindung festgestellt werden (Abbildung 6.25 e, Spur 3-5), obwohl die Affinität geringer ist, als die zu dem dG-AAF-Addukt (vgl. Spur 2 und 3). Da all diese großen Addukte als gemeinsames Element eine planare aromatische Einheit, die in die große Furche zeigt, aufweisen, kann dies als ein klares strukturelles Element für die Erkennung von Rad14 gewertet werden. Um die Hypothese zu bestätigen, wurde die Nukleobase dU mit Fluorescein markiert (siehe Abbildung 6.24 b) und in die Mitte eines DNA Duplexes eingebaut (ODN **29**).^[171] Diese Base weist eine große aromatische Einheit auf, die aus der großen Furche der DNA herausdeutet und einen 15 Å langen flexiblen Spacer zwischen der aromatischen Gruppe und der Nukleobase besitzt. Dies hat den Vorteil, dass die sterische Abstoßung zwischen Fluorescein und dem Doppelstrang minimiert wird und der Duplex eine ungestörte B-Typ Helix mit einer intakten *Watson-Crick*-Basenpaarung bildet. Dies wurde durch eine Schmelzpunktmessung bestätigt, welche zeigt, dass die Stabilität des Oligodinukleotids **29** im Gegensatz zu ODN **30** nur um 1°C erniedrigt wird. Rad14 bindet den entsprechenden Doppelstrang mit einer Effizienz, die die

Affinität zu dG-AAF übersteigt (Abbildung 6.25 d). Obwohl die Destabilisierung des Doppelstranges durch Fluorescein nur minimal ist, ist die Bindung von Rad14 zu dieser Modifikation am stärksten. Maltseva *et al.* berichteten ebenfalls von der großen Affinität von XPA zu aromatischen Gruppen.^[170] Diese Ergebnisse zeigen, dass Duplex-Destabilisierung kein notwendiges Kriterium für die Erkennung und Bindung durch Rad14 ist.^[170, 171]

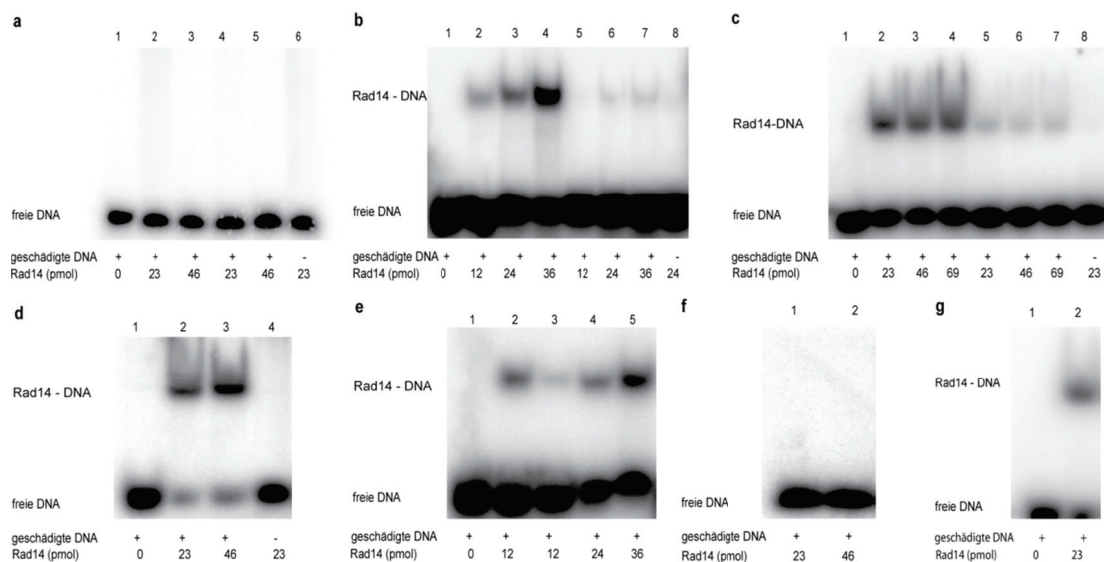


Abbildung 6.25: DNA-Bindungsstudien mit verschiedenen DNA-Schäden. (a) Studie mit UV-Schäden (Spur 1-5, jeweils 33 fmol) und ungeschädigte DNA (Spur 6, 33 fmol) mit steigender Konzentration von Rad14. T(6-4)T wurde in den Spuren 1-3 und CPD in 4-5 verwendet. (b) Pt-GG-Addukt (Spuren 1-4, jeweils 33 fmol), Pt-GTG-Addukt (Spur 5-7) und ungeschädigte DNA (Spur 8) mit Rad14. (c) Assay von Rad14 mit dG-AAF (Spur 1-4) und dG-AF (Spur 5-7) enthaltender DNA. Ungeschädigte DNA in Spur 8. (d) Rad14 mit dU-FI (Spur 1-3) und ungeschädigter DNA (Spur 4). (e) Bindungsassay von Rad14 mit dG-AAP (Spur 3-5) und dG-AAF (Spur 1-2) mit einer steigenden Konzentration von Rad14. (f) CPD 27mer (ODN 31) mit einer steigenden Konzentration an Rad14. (g) Bindung von Rad14 zu dG-AAF 30mer (ODN 32).

Einige der gegenwärtigen Modelle für den Mechanismus der Schadensdetektion schlagen vor, dass Rad14/XPA erst zu einem späteren Zeitpunkt an die geschädigte Stelle durch andere *NER*-Proteine rekrutiert wird. Dies geschieht demnach erst nachdem der Duplex bereits geöffnet wurde. Aus diesem Grund wurde das Verhalten zu Einzel- und Doppelsträngiger geschädigter DNA verglichen. Für diese Studien wurden dG-AAF und dU-FI

enthaltene Einzelstränge als Substrate verwendet, da die Doppelstränge dieser Schäden eine sehr starke Bindung zu Rad14 aufweisen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6.26 **c** und **d** dargestellt (ssDNA dG-AAF 30mer, Spur 1-2 und ssDNA dU-FI, Spur 1-2). Beide Experimente zeigen deutlich, dass die Bindung von Rad14 zu einzelsträngiger DNA unerheblich ist, da keine Verschiebung der Banden zu sehen ist. Dieses Ergebnis ist ein klarer Beweis dafür, dass Rad14 als Substrat doppelsträngige DNA benötigt, welche nicht oder nur schwach durch den Schaden gestört ist.

6.3.3.3 Bestimmung der Bindungskonstanten von Rad14 zu geschädigter DNA

Um ein quantitatives Bild des Bindungsprozesses zu erhalten, wurden die Bindungskonstanten von Rad14 zu den zwei Substraten dG-AAF und dU-FI durch ein kompetitives Bindungsexperiment bestimmt. Die Konzentration der radioaktiven geschädigten DNA wurde konstant gehalten, während eine steigende Menge an unmarkierter geschädigter DNA als Kompetetitor zugegeben wurde. Der Bindungsassay enthielt 33 fmol markierter, geschädigter DNA, 23 pmol gereinigtes Rad14 und eine unterschiedliche Konzentration an geschädigter, unmarkierter DNA. Abbildung 6.26 **a** fasst die erhaltenen Daten für das Substrat dU-FI zusammen. In Spur 1 ist als Kontrolle kein Protein zugegeben, während in Spur 8 ungeschädigte DNA verwendet wurde, um die geringe Affinität von Rad14 zu dsDNA zu bestätigen. Die verschobenen Banden von den Spuren 2-7 wurden gegen den Logarithmus der Konzentration der kompetitiven DNA aufgetragen und mit Hilfe eines *one-site kompetitiven* Algorithmus gefittet. Es ergibt sich eine Bindungskonstante von $K_{\text{aff}} = 32 \text{ nM}$ ($\pm 8 \text{ nM}$), welche auf die starke Affinität von Rad14 zu diesem Typ einer nicht Helix destabilisierenden Basenmodifikation hinweist. Es ist auch eindeutig zu erkennen, dass ungefähr 80% der dU-FI enthaltenden DNA verschoben wurde, was die starke Affinität von Rad14 zu hydrophoben aromatischen Einheiten in der großen Furche der DNA unterstreicht. Diese Tatsache wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.^[170, 171] Die Bindungskonstante zu dG-AAF wurde wie zuvor beschrieben zu 135 nM ($\pm 10 \text{ nM}$) bestimmt, was auch

auf eine reduzierte, aber beachtliche Affinität zu dieser Art von Schaden hinweist (Abbildung 6.26 b).

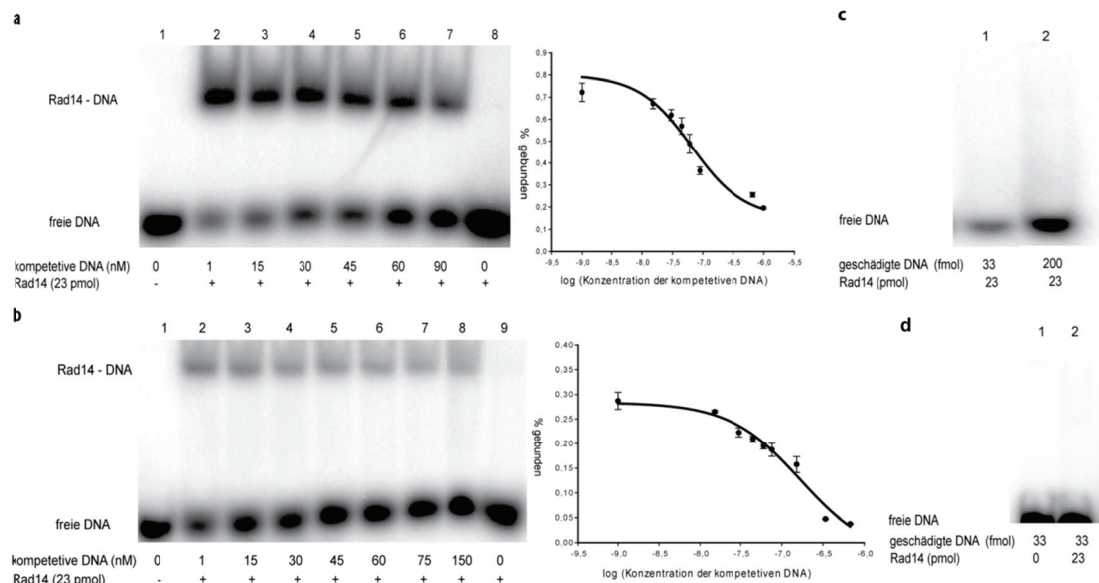


Abbildung 6.26: Kompetitiver *gel mobility shift assay* zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Rad14 zu dG-AAF und dU-FI. **(a)** Angegebene Mengen an Rad14 wurden mit 33 fmol ODN **29** (Spur 1-7) und 33 fmol ungeschädigter DNA (Spur 8) inkubiert. Kompetitive DNA wurde in den angegebenen Mengen zugegeben. Die Menge an markierter DNA wurde integriert und in Prozent der gebundenen DNA auf der y-Achse aufgetragen. Die x-Achse zeigt den Logarithmus der Konzentration der kompetitiven DNA. Die Kurve wurde nach einem *one-site* Verdrängungs-Experiment gefittet. **(b)** Die Bedingungen der Bindung wurden bereits in **a** beschrieben. Oligonukleotid **25** (Spur 1-8) wurde für das Experiment benutzt und ungeschädigte DNA (Spur 9) als Kontrolle. **(c)** Bindung von Rad14 zu ssDNA mit dG-AAF. **(d)** Bindung von Rad14 zu ssDNA mit dU-FI.

6.3.3.4 Photoaffinity labeling Experimente mit Rad14^[169]

Mit Hilfe der bereits beschriebenen Bindungsexperimente von Rad14 zu geschädigter DNA wurde die Bindungsaffinität eingehend untersucht. Diese Ergebnisse sollen nun verwendet werden, um neuartige *Photoaffinity labeling* Experimente durchführen zu können. Hierbei soll untersucht werden, ob Rad14 kovalent mit Hilfe neu entwickelter Linker an geschädigte und ungeschädigte DNA gebunden werden kann und ob Rad23 Einfluss auf das Bindungsverhalten von Rad14 besitzt. Ein weiterer Grund dieser Experimente könnte die

Entdeckung neuartiger Faktoren durch *NER-Pulldown-Assays* sein. Mit Hilfe hochauflösender Massenspektrometrie kann auf neue Proteine geschlossen werden.

Der Einsatz von Fluorescein- und Biotin markierter DNA dient zum einen zur Visualisierung geringer Mengen mit Hilfe eines *Fluoreszenzreaders* und zur Aufkonzentrierung über *Streptavidinbeads*. In Abbildung 6.27 sind die verwendeten DNA-Stränge schematisch dargestellt. Als *Photocrosslinking* Einheiten wurden 3-Fluoromethyl substituierte Diazirine verwendet, welche an die 5'-Position der Pyrimidine angehängt worden sind. Wenn diese Einheiten mit UV-Strahlung belichtet werden, entstehen reaktive Carbene, welche in die C-H-Bindung räumlich naher Moleküle insertieren können.

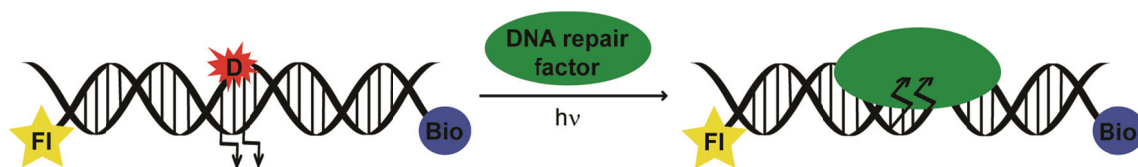


Abbildung 6.27: Schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotide für die *Photocrosslinking* Experimente. D: DNA Schaden, FI: Fluorescein, Bio: Biotin. Die Pfeile symbolisieren die mit *Photocrosslinking* Einheiten modifizierten Nukleotide.

Für dieses Experiment wurden CPD (ODN **33**) und β -cFapyG (ODN **34**) enthaltende Konstrukte verwendet. β -cFapyG stellt kein Substrat für die *NER* dar und sollte neben einem ungeschädigten (ODN **35**) Konstrukt als Kontrolle verwendet werden (siehe Abbildung 6.28). Für die Belichtungen wurden je 50 pmol der drei Doppelstränge benutzt. Belichtet wurde je einmal in Anwesenheit von Rad14 (1 μ M) und einmal in Anwesenheit von sowohl Rad14 (1 μ M) als auch Rad23 (1 μ M). In Abbildung 6.29 ist das Ergebnis des Versuchs zu sehen, welcher in enger Zusammenarbeit mit Dr. S. Breeger und M. Winnacker durchgeführt wurde. In diesen Experimenten wurde Δ 9NRad14 eingesetzt.

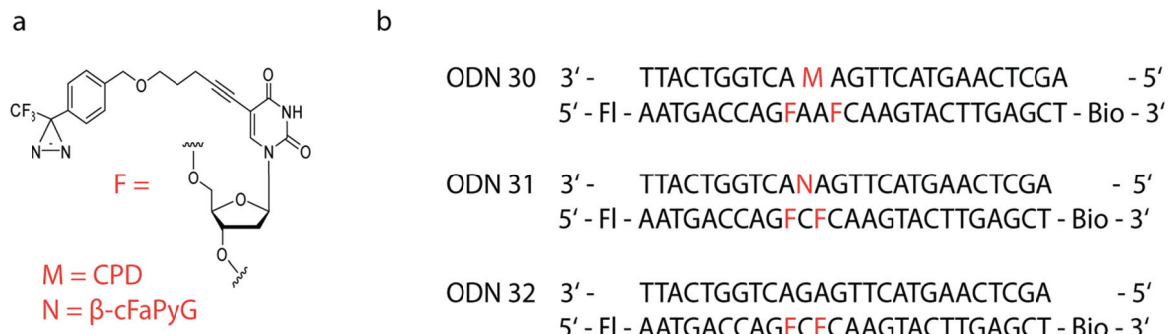


Abbildung 6.28: (a) Darstellung des verwendeten Fluormethyl substituierten Diazirins (F) und Erklärung der verwendeten Buchstaben. (b) Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.

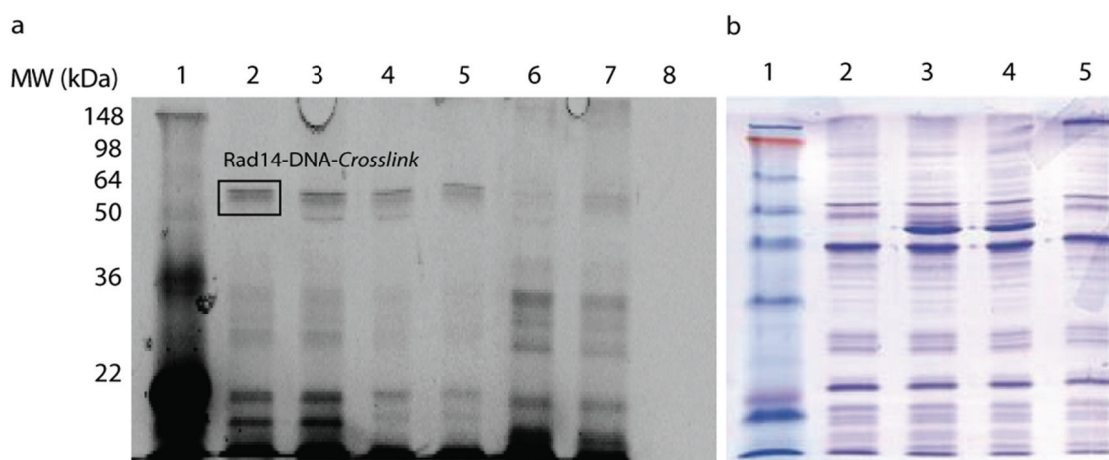


Abbildung 6.29: Photoaffinity labeling Experimente mit $\Delta 9$ NRad14 und Rad23. (a) Fluoreszenzaufnahme eines 12.5 % SDS-Gels nach Belichtung der Duplexe (je 50 pmol) mit geringstem Rad14 Protein (1 μ M) bzw. Rad14+Rad23 (je 1 μ M). (b) Aufnahme des gleichen Gels nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (nur Spuren 1-5). Spur 1: SeeBlue® Plus2, Spur 2: ungeschädigte DNA (ODN **35**) + Rad14, Spur 3: ODN **35** + Rad14 + Rad23, Spur 4: ODN **33** + Rad14 + Rad23, Spur 5: ODN **33** + Rad14, Spur 6: ODN **34** + Rad14 + Rad23, Spur 7: ODN **34** + Rad14, Spur 8: Rad14. Die Belichtung erfolgte für je 30 min bei 0°C bei einem Gesamtvolumen von 100 μ L.

Betrachtet man zunächst die Spuren 2 und 5, in denen die DNA-Sonden nur in Anwesenheit von Rad14 belichtet wurden, so zeigt sich im Falle des ungeschädigten Strangs (Spur 2) und des CPD-enthaltenden Strangs (Spur 5) deutlich die Entstehung eines Protein-DNA-Crosslinks bei ca. 60 kDa. Da das freie Protein trotz seiner Masse von 43 kDa ungefähr auf der Höhe von 50 kDa läuft, ist das kovalent markierte Protein bei ca. 60 kDa zu erwarten. Es tritt hier eine Doppelbande auf, die vermutlich damit zu erklären ist, dass die Stränge mit

zwei Diazirinen versehen waren und dadurch ein- oder zweimal mit dem Protein reagieren konnten. Dies führt zu konformationell leicht unterschiedlichen *Crosslinks*, durch die das Auftreten zweier Banden im SDS-Gel erklärt werden konnten. Ein Rad14-spezifischer Western-blot zeigte ebenfalls eine Doppelbande, so dass es sich hier nicht um eine Kontamination handeln konnte.

Wie in bereits beschriebenen Experimenten zeigt auch hier Rad14 eine hohe Affinität zu ungeschädigter DNA, was darauf schließen lässt, dass die strukturellen Veränderungen der DNA ein Substrat für Rad14 darstellen. Der Blick auf die Spuren 3 und 4, welche die Belichtungen in Anwesenheit von Rad14 und Rad23 zeigen, belegt keine Markierung von Rad23, welche leicht (Masse des freien Proteins: 46 kDa, Laufhöhe im SDS-Gel: ca. 55 kDa) über der vom Rad14 herrührenden Doppelbande zu sehen sein müsste. Ein Western-blot bestätigt diese Annahme. Rad23 besitzt, wenn es nicht mit Rad4 komplexiert ist, keinerlei Affinität weder zu geschädigter, noch zu ungeschädigter DNA. Dies wurde auch in der Literatur schon mehrfach bestätigt,^[140, 165, 166] ebenso hat die Anwesenheit von Rad23 keine Auswirkungen auf die Effizienz der Markierung von Rad14, wie ein Vergleich der Spuren 2-3 und 4-5 deutlich zeigt. Auch diese Tatsache ist bereits mehrfach erwähnt worden. Jedoch entsteht bei Anwesenheit von Rad23 eine neue Bande unterhalb der von Rad14. Da diese Bande vor allem im Fluoreszenzgel und nicht im Coomassie gefärbten Gel zu sehen ist könnte angenommen werden, dass Rad23 einen geringen Einfluß auf die Entstehung des Crosslinks besitzt. Diese Tatsache muss noch genauer untersucht werden.

6.3.3.5 Kristallisationsexperimente des DNA bindenden Fragments von Rad14

Das minimale DNA bindende Fragment von Rad14 wurde mit einem dG-AAF geschädigten 16mer zusammen einem Kristallisationsscreening unterworfen (siehe Kapitel 5.5.1). Um zu zeigen, dass auch dieses stark verkürzte Protein die Möglichkeit der DNA-Bindung aufrecht erhalten hat, wurde ein *EMSA*-Experiment durchgeführt. Dazu wurde in den bereits beschriebenen Bedingungen

Rad14-DBD (33 pmol) mit radioaktiv markierter DNA (ODN **25** und ODN **28**, jeweils 33 fmol) inkubiert und eine native PAGE durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf einem *PhosphorImager* analysiert. Wie in Abbildung 6.30 ersichtlich, ist Rad14-DBD nicht nur in der Lage AAF-geschädigte DNA (Spur 2) zu binden, sondern kann auch zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA (Spur 1) diskriminieren. Um strukturelle Daten der Bindung von Rad14-DBD zu AAF-geschädigter DNA zu erhalten, wurde versucht diesen Komplex zu kristallisieren. Dazu wurde in die DNA und das Protein in einem geeigneten Puffer (Puffer RSA; 100 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT und 5% Glycerin) gelöst und im molaren Verhältnis Protein:DNA = 1:1.3 vermischt. Die Sequenzen der verwendeten DNA-Stränge sind in Tabelle 6.11 dargestellt. Bei ODN **36** handelt es sich um völlig komplementäre DNA-Stränge, während ODN **37** einen Überhang von einem Nukleotid aufweist. Nach dem erfolgreichen *Screening* von mehreren hundert Bedingungen wurde mit den vielversprechendsten Bedingungen ein manuelles *Refinement* durchgeführt und bei einer Reservoir-Konzentration von 85 mM Tris-HCl pH 8.0 und 3.2 M AmSO₄ konnten wiederholt erfolgreich Kristalle gezüchtet werden.

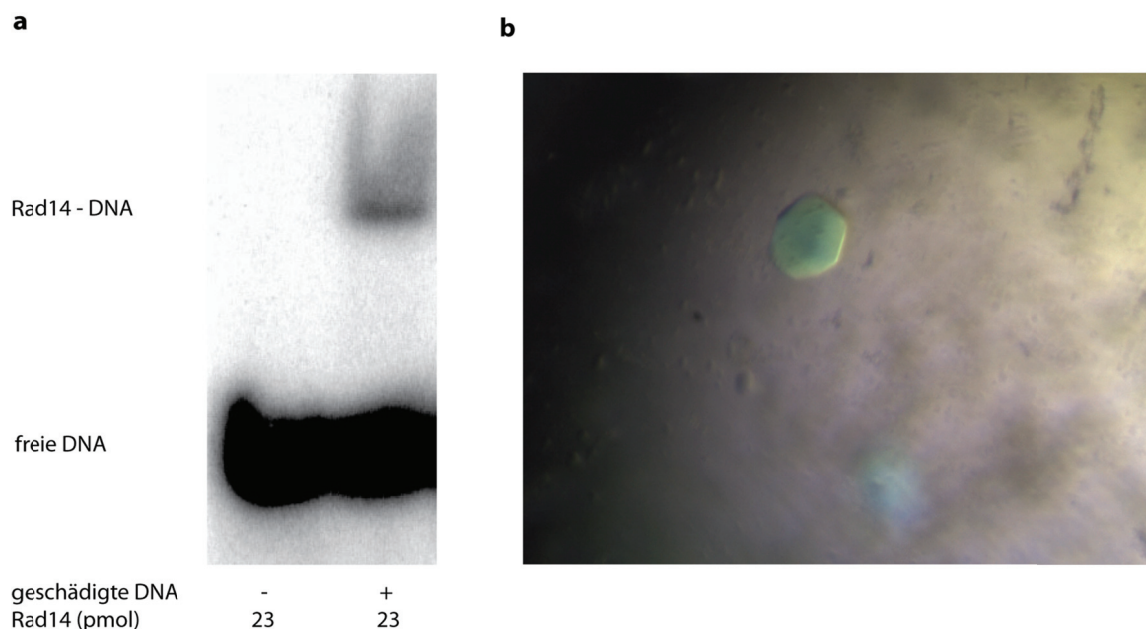


Abbildung 6.30: (a) DNA-Bindungsstudie von Rad14-DBD mit AAF-geschädigter und ungeschädigter DNA. In Spur 1 wurde ungeschädigte DNA (ODN **28**, 33 fmol) und in Spur 2 AAF-geschädigte DNA (ODN **25**, 33 fmol) mit 23 pmol Rad14short verwendet. (b) Abbildung eines Co-Kristalls mit Rad14-DBD und einem AAF-geschädigten 16mer.

Da für die Lösung der Kristallstruktur kein Molekularer Ersatz verwendet werden konnte, musste das Protein mit Selenomethionin angereichert werden. Dazu wurde das Expressionsplasmid pPSG-IBA3-Rad14-DBD in den Methionin-auxotrophen-Stamm *E. coli* B834 (DE3) transformiert. Die Expression erfolgte in einem LeMaster-Medium und die Aufreinigung des Proteins geschah analog zu der des in normalem Medium exprimierten Proteins. Es musste allerdings darauf geachtet werden, dass die Puffer zuerst entgast wurden und als Reduktionsmittel DTT statt β -Mercaptoethanol verwendet wurde. Bei der bereits oben angegebenen Bedingung entstanden nach 2 Monaten wiederum Kristalle, die einer Synchrotronmessung unterzogen wurden (Abbildung 6.30). Die ersten Kristalle streuten nur bis ungefähr 6 Å, im Moment wird an der Lösung einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2.9 Å gearbeitet.

Tabelle 6.11: Darstellung der verwendeten Oligodesoxynukleotide. Bei ODN **37** wurde ein Überhang von einer Base verwendet.

ODN	Schaden	Sequenz
36	Z = dG-AAF	5'- TCTCTC Z CTCATCCAC -3' 3'- AGAGAG C GAGTAGGTG -5'
37	Z = dG-AAF	5'- TCTCTC Z CTCATCCAC -3' 3'- GAGAG C GAGTAGGTGG -5'

6.4 Mechanismus der Schadenserkenkung in der NER

NER ist das grundlegende Verteidigungssystem gegen große Addukte und UV-DNA- Schäden in den drei Reichen der Lebewesen.^[165] Der genaue Mechanismus, wie eine so große Anzahl verschiedenster DNA Schäden erkannt werden kann ist bisher unbekannt.^[164] Anfangs wurden zwei

gegensätzliche Modelle vorgeschlagen, in denen entweder Rad14/XPA oder Rad4/XPC die primäre Schadenserkennung durchführen. Später wurde ein drittes Modell vorgeschlagen, in dem Rad4/XPC-Rad23/HR23B, Rad14/XPA und RPA in zufälliger Reihenfolge geschädigte DNA binden, welches in einem Multi-Komplex resultiert.^[221] Mit Hilfe einer Vielzahl von unterschiedlichen geschädigten und ungeschädigten DNA-Strängen, die definierte DNA-Schäden enthalten, konnten in dieser Arbeit die Bindungseigenschaften von Rad14 untersucht werden. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente kann gefolgert werden, dass Rad14 weder geschädigte Einzelstränge, noch typische *NER*-Substrate wie UV-induzierte CPD und T(6-4)T Schäden, oder *intrastrang* Pt-GTG *Crosslinks*, erkennt.

Anders als Rad4 ist Rad14 nicht in der Lage destabilisierte Doppelstränge zu erkennen. Dies zeigt sich auch deutlich, wenn man die Schmelzpunkte der geschädigten Stränge, die durch Rad14 erkannt werden, mit denen von ungeschädigten Kontrollsträngen vergleicht. Der CPD Schaden reduziert die Schmelztemperatur um 7°C und T(6-4)T erniedrigt die Temperatur noch deutlicher um 10°C, was durch den bekannten Helix-störenden Effekt des Dimers bestätigt wird. Beide Schäden werden weder in Einzel- noch in Doppelsträngen von Rad14 erkannt. Die Idee, dass die Destabilisierung der Helix kein Kriterium für die Bindung von Rad14 ist, wird durch die Bindungsstudien mit Pt-GTG bestätigt. Dieser *intrastrang Crosslink* wird nur schwach erkannt, obwohl es sich hierbei um einen der am stärksten helixverzerrenden Schäden handelt.

Im Falle der großen Adduktschäden, die durch eine Reaktion von elektrophilen Karzinogenen mit DNA entstehen, ändert sich die Situation.^[119] Diese Karzinogene reagieren mit DNA Basen und führen zu einer Vielzahl von DNA-Addukten, von denen einige nur leichte Störungen der Helixstruktur hervorrufen, wie z. B. die C8-Addukte von dA und dG.^[115] Jedoch handelt es sich bei diesen Schäden um hervorragende Substrate für die *NER*.^[165] Wie erwartet, werden die Schmelzpunkte von dG-AAF und dG-AF enthaltenen Doppelsträngen nur um 5°C bzw. 3°C erniedrigt und auch NMR-Untersuchungen zeigen, dass kein oder nur ein geringer Einfluss auf die Duplexstruktur besteht. Jedoch zeigen die hier beschriebenen Studien, dass

trotz der fehlenden Destabilisierung der Doppelhelix beide Schäden von Rad14 sehr effizient erkannt werden, nicht aber in dem korrespondierenden Einzelstrang. Zusätzlich führt die effiziente Bindung des vom Aminopyren abgeleiteten AAP-dG Schadens zu der Erkenntnis, dass planare aromatische Gruppen, die aus der DNA heraus in die große Furche zeigen, das molekulare Schlüsselmotiv für die Erkennung von Rad14 darstellen.

Unterstützt wird diese These durch die Experimente mit dem C5-Fluorescein-dU-Addukt, welches aufgrund des langen Spacers zwischen der Nukleobase und der aromatischen Fluorescein Einheit fast keinen destabilisierenden oder störenden Einfluss auf die Struktur der Doppelhelix aufweist. Dennoch wird diese Verbindung sehr effizient von Rad14 erkannt. Paradox wird die Situation mit den Cisplatin-Schäden. In diesem Fall kann eine klare Erkennung von Pt-GG detektiert werden, jedoch ist die Erkennung des *intrastrang* Pt-GTG *Crosslinks* schwächer. Dieses Ergebnis mag den Hinweis geben, dass Helix-störende Effekte eine effiziente Erkennung durch Rad14 schwächt oder verhindert.

Diese Ergebnisse erlauben nun ein neues Modell für die *NER*-Schadenserkennung vorzuschlagen. Eine gut begründete Tatsache ist, dass Rad4/XPC destabilisierte Duplexstrukturen unabhängig von der Art des Schadens erkennt, welcher die Störung hervorruft. Die Kristallstruktur von Rad4 zeigt, dass das Protein den Schaden selber nicht kontaktiert, aber wenige Basen von der Störung entfernt bindet. Bei diesem Rad4-spezifischen Mechanismus, der gestörte Strukturen erkennt, handelt es sich um *eine* Art der Schadenserkennung durch *NER*. Die hier beschriebenen Daten zeigen, dass Rad14/XPA eine *zweite* Art der Schadenserkennung ermöglicht, die unabhängig von Rad4/XPC ist. Auf dieser Stufe werden zu Beginn der *NER* nicht-Helix verzerrende Schäden, wie große Addukte, erkannt. Bei dem gemeinsamen strukturellen Motiv handelt es sich um ein planares aromatisches Ringsystem, welches in die große Furche der DNA zeigt. Zusätzlich erkennt Rad14 Pt-GG Schäden, jedoch bleibt dieser Mechanismus noch aufzuklären.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass *NER* mit zwei gegensätzlichen Schadenserkennungsmechanismen arbeitet. Schadens-

erkennungssystem 1 benötigt Rad4/XPC und detektiert verzerrte Duplexstrukturen. Schadenserkennungs-mechanismus 2 beinhaltet Rad14/XPA für die Bindung von großen Adduktschäden, die durch metabolische Aktivierung von aromatischen Molekülen, wie aromatischen Aminen und polyzyklischen aromatischen Molekülen, gebildet werden. Die hier aufgeführten Daten zeigen, dass die Schadenserkennung durch die *NER* von der Art des zu reparierenden Schadens abhängt. Zu klären bleibt inwiefern geöffnete Duplexstrukturen oder Fehlpaarungen der DNA die Bindung von Rad14/XPA zu großen Addukten verändert und welcher Mechanismus sich hinter dieser Schadenserkennung verbirgt. Um die molekulare Struktur der Bindung von Rad14/XPA zu geschädigter DNA genauer untersuchen zu können, wird eine Kristallstruktur unablässig sein.

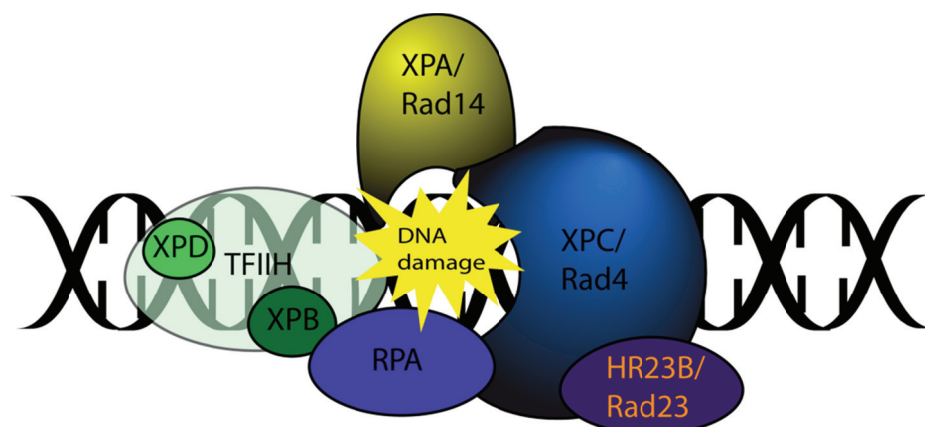


Abbildung 6.31: Schematische Darstellung, der an der Schadenserkennung beteiligten Proteine.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AcOH	Essigsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
C	Cytosin
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
Cry	Cryptochrom
CV	<i>column volumes</i> , Säulenvolumen
d	Tage
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)

ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
Ex.	Anregung (<i>excitation</i>)
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Gramm
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
His	Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HV	Hochvakuum (10^{-3} - 10^{-2} mbar)
hv	Photoreaktion
I	Intensität
IgG	Immunglobulin G

IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo
K _s	Bindungskonstante
kb	Kilobase(n)
konz.	konzentriert
L	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
Lsg.	Lösung
M	molar
m	Meter
m	milli (10 ⁻³)
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption assay</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
MS	Massenspektrum
μ	micro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
NBT	3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylylen)-bis-[2-(4-nitro-phenyl)-5-phenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumchlorid]
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
Net ₃	Triethylamin

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
ORF	offener Leserahmen
ori	<i>origin of replication</i>
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	<i>prep grade</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
ss	einzelsträngig
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle

7 Abkürzungsverzeichnis

TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEAA	Triethylamoniumacetat
TLS	<i>trans lesion sythesis</i>
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
u	<i>units</i>
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	<i>visible</i>
v/v	Volumenanteil (<i>volume per volume</i>)
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Massenanteil (<i>weight per volume</i>)
λ	Wellenlänge

8 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- [2] S. C. Ha, K. Lowenhaupt, A. Rich, Y.-G. Kim, K. K. Kim, *Nature* **2005**, 437, 1183-1186. Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases.
- [3] S. R. Rajsiki, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2000**, 447, 49-72. DNA repair: models for damage and mismatch recognition.
- [4] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, 11, 3610-3618. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid.
- [5] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 16895-16898. DNA replication fidelity.
- [6] P. Karran, M. G. Marinus, *Nature* **1982**, 296, 868-869. Mismatch correction at O6-methylguanine residues in *E. coli* DNA.
- [7] T. T. Ni, G. T. Marsischky, R. D. Kolodner, *Mol. Cell* **1999**, 4, 439-444. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*.
- [8] G. M. Li, H. Wang, L. J. Romano, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 24084-24088. Human MutS α specifically binds to DNA containing aminofluorene and acetylaminofluorene adducts.
- [9] W. Y. Feng, E. H. Lee, J. B. Hays, *Genetics* **1991**, 129, 1007-1020. Recombinagenic processing of UV-light photoproducts in nonreplicating phage DNA by the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system.
- [10] J. A. Mello, S. Acharya, R. Fishel, J. M. Essigmann, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 579-589. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin.
- [11] R. Wagner, M. Meselson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, 73, 4135-4139. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes.
- [12] B. R. Palmer, M. G. Marinus, *Gene* **1994**, 143, 1-12. The dam and dcm strains of *Escherichia coli* -- a review.

- [13] P. Modrich, R. Lahue, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 101-133. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology.
- [14] K. G. Au, K. Welsh, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12142-12148. Initiation of methyl-directed mismatch repair.
- [15] R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 302-323. DNA mismatch repair: functions and mechanisms.
- [16] M. H. Lamers, A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind, T. K. Sixma, *Nature* **2000**, 407, 711-717. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch.
- [17] A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 32153-32157. Structure and Function of Photolyase and in Vivo Enzymology: 50th Anniversary.
- [18] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, 306, 1789-1793. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair.
- [19] K. Malhotra, S. T. Kim, C. Walsh, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 15406-15411. Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase.
- [20] M. Muller, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 277-285. Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes.
- [21] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10076-10080. Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase.
- [22] A. F. Glas, M. J. Maul, M. Cryle, T. R. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106, 11540-11545. The archaeal cofactor F0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes.
- [23] M. J. Maul, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2009**.
- [24] J. C. Pieck, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2007**.
- [25] T. Lindahl, B. Rydberg, T. Hjelmgren, M. Olsson, A. Jacobsson, *Basic Life Sci.* **1982**, 20, 89-102. Cellular defense mechanisms against alkylation of DNA.

- [26] B. Sedgwick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 148-157. Repairing DNA-methylation damage.
- [27] M. A. Kurowski, A. S. Bhagwat, G. Papaj, J. M. Bujnicki, *BMC Genomics* **2003**, 4, 48. Phylogenomic identification of five new human homologs of the DNA repair enzyme AlkB.
- [28] Y. Mishina, E. M. Duguid, C. He, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 215-232. Direct reversal of DNA alkylation damage.
- [29] D. M. Noll, T. M. Mason, P. S. Miller, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 277-301. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA.
- [30] M. Christmann, M. T. Tomicic, W. P. Roos, B. Kaina, *Toxicology* **2003**, 193, 3-34. Mechanisms of human DNA repair: an update.
- [31] B. Dalhus, J. K. Laerdahl, P. H. Backe, M. Bjoras, *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**. DNA base repair - recognition and initiation of catalysis.
- [32] D. O. Zharkov, *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 1544-1565. Base excision DNA repair.
- [33] J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 348-349. One-electron oxidation of DNA and inflammation processes.
- [34] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, J. L. Ravanat, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1997**, 131, 1-87. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance.
- [35] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. L. Ravanat, *Mutat. Res.* **2003**, 531, 5-23. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features.
- [36] S. Steenken, S. V. Jovanovic, L. P. Candeias, J. Reynisson, *Chemistry* **2001**, 7, 2829-2833. Is "frank" DNA-strand breakage via the guanine radical thermodynamically and sterically possible?
- [37] J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, 44, 239-267. The role of oxidative stress in carcinogenesis.
- [38] S. G. Nyaga, P. Jaruga, A. Lohani, M. Dizdaroglu, M. K. Evans, *Cell Cycle* **2007**, 6, 1472-1478. Accumulation of oxidatively induced DNA damage in human breast cancer cell lines following treatment with hydrogen peroxide.

- [39] J. C. Fromme, G. L. Verdine, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 544-552. Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM.
- [40] K. E. McAuley-Hecht, G. A. Leonard, N. J. Gibson, J. B. Thomson, W. P. Watson, W. N. Hunter, T. Brown, *Biochemistry* **1994**, 33, 10266-10270. Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs.
- [41] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.
- [42] S. Schneider, S. Schorr, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 87-95. Crystal structure analysis of DNA lesion repair and tolerance mechanisms.
- [43] A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18, 1033-1077. Reactions of oxyl radicals with DNA.
- [44] J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14558-14559. Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells.
- [45] J. L. Ravanat, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. Medeiros, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 40601-40604. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA.
- [46] A. Klungland, T. Lindahl, *Embo J.* **1997**, 16, 3341-3348. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1).
- [47] J. C. Fromme, A. Banerjee, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 43-49. DNA glycosylase recognition and catalysis.
- [48] M. Sugahara, T. Mikawa, T. Kumasaka, M. Yamamoto, R. Kato, K. Fukuyama, Y. Inoue, S. Kuramitsu, *Embo J.* **2000**, 19, 3857-3869. Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8.
- [49] J. T. Stivers, *Chemistry* **2008**, 14, 786-793. Extrahelical damaged base recognition by DNA glycosylase enzymes.
- [50] B. Dalhus, I. H. Helle, P. H. Backe, I. Alseth, T. Rognes, M. Bjoras, J. K. Laerdahl, *Nucl. Acids Res.* **2007**, 35, 2451-2459. Structural insight into repair of alkylated DNA by a new superfamily of DNA glycosylases comprising HEAT-like repeats.

- [51] D. O. Zharkov, G. Shoham, A. P. Grollman, *DNA Repair (Amst)* **2003**, 2, 839-862. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases.
- [52] O. G. Berg, R. B. Winter, P. H. von Hippel, *Biochemistry* **1981**, 20, 6929-6948. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory.
- [53] G. L. Verdine, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 329-334. How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome?
- [54] L. Chen, K. A. Haushalter, C. M. Lieber, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 345-350. Direct visualization of a DNA glycosylase searching for damage.
- [55] S. S. Parikh, G. Walcher, G. D. Jones, G. Slupphaug, H. E. Krokan, G. M. Blackburn, J. A. Tainer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 5083-5088. Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects.
- [56] A. L. Lu, D. Y. Chang, *Cell* **1988**, 54, 805-812. A novel nucleotide excision repair for the conversion of an A/G mismatch to C/G base pair in *E. coli*.
- [57] A. Banerjee, W. L. Santos, G. L. Verdine, *Science* **2006**, 311, 1153-1157. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions.
- [58] P. C. Blainey, A. M. van Oijen, A. Banerjee, G. L. Verdine, X. S. Xie, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 5752-5757. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA.
- [59] M. Bhagwat, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1996**, 35, 659-665. 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive beta- and delta-elimination mechanisms, respectively.
- [60] L. Serre, K. Pereira de Jesus, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *Embo J.* **2002**, 21, 2854-2865. Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA.
- [61] F. Coste, M. Ober, T. Carell, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 44074-44083. Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase.

- [62] F. Hebra, M. Kaposi, *New Sydenham Society* **1874**, 61, 252-258. On diseases of the skin, including the exanthemata.
- [63] M. Kaposi, *Ann. Dermatol. Venereol.* **1883**, 4, 29-38. Xeroderma Pigmentosum.
- [64] A. C. C. de Sanctis, *Riv. Sper. Freniatr. Med. Leg. Alienazioni Ment.* **1932**, 56, 269-292. L'idiozia xerdomermica.
- [65] K. K. D. Bootsma, J. Claever, J. H. J. Hoeijmakers, *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill Book Co, New York, **1997**.
- [66] K. H. Kraemer, M. M. Lee, J. Scotto, *Arch. Dermatol.* **1987**, 123, 241-250. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases.
- [67] E. C. Friedberg, A. J. Bardwell, L. Bardwell, W. J. Feaver, R. D. Kornberg, J. Q. Svejstrup, A. E. Tomkinson, Z. Wang, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1995**, 347, 63-68. Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription.
- [68] M. A. Nance, S. A. Berry, *Am. J. Med. Genet.* **1992**, 42, 68-84. Cockayne syndrome: review of 140 cases.
- [69] J. Q. Svejstrup, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 21-29. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair.
- [70] J. E. Cleaver, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 564-573. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair.
- [71] C. H. Tay, *Arch. Dermatol.* **1971**, 104, 4-13. Ichthyosiform Erythroderma, Hair Shaft Abnormalities, and Mental and Growth Retardation: A New Recessive Disorder.
- [72] J. de Boer, J. H. Hoeijmakers, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 453-460. Nucleotide excision repair and human syndromes.
- [73] E. Bergmann, J. M. Egly, *Trends Genet.* **2001**, 17, 279-286. Trichothiodystrophy, a transcription syndrome.
- [74] B. A. Gilchrest, *Photodamage*, Blackwell Science Inc. , Cambridge, MA, **1995**.
- [75] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2203-2237. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.

- [76] A. Sarasin, *DNA Repair (Amst)* **2003**, 2, 437-439. Choice between death by senescence or by cancer?
- [77] P. V. J. Cadet, *Bioorganic Photochemistry*, Wiley, New-York, **1990**.
- [78] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 13765-13770. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation.
- [79] G. P. Pfeifer, *Photochemistry and Photobiology* **1997**, 65, 270-283. Formation and Processing of UV Photoproducts: Effects of DNA Sequence and Chromatin Environment.
- [80] A. A. Shaw, A. M. Falick, M. D. Shetlar, *Biochemistry* **1992**, 31, 10976-10983. Photoreactions of thymine and thymidine with N-acetyltirosine.
- [81] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 591-597. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species.
- [82] P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4256-4263. Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: Intermolecular energy and electron transfer.
- [83] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, 40, 2495-2501. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.
- [84] V. I. Danilov, A. Les, J. L. Alderfer, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, 19, 179-191. A theoretical study of the cis-syn pyrimidine dimers in the gas phase and water cluster and a tautomer-bypass mechanism for the origin of UV-induced mutations.
- [85] N. Jiang, J. S. Taylor, *Biochemistry* **1993**, 32, 472-481. In vivo evidence that UV-induced C → T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products.
- [86] Y. Tu, R. Dammann, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **1998**, 284, 297-311. Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo.
- [87] M. J. Horsfall, A. Borden, C. W. Lawrence, *J. Bacteriol* **1997**, 179, 2835-2839. Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer.

- [88] A. Burger, D. Fix, H. Liu, J. Hays, R. Bockrath, *Mutat. Res.* **2003**, 522, 145-156. In vivo deamination of cytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimers in *E. coli*: a feasible part of UV-mutagenesis.
- [89] M. Ruiz-Rubio, R. Bockrath, *Mutat. Res.* **1989**, 210, 93-102. On the possible role of cytosine deamination in delayed photoreversal mutagenesis targeted at thymine-cytosine dimers in *E. coli*.
- [90] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8535-8540. Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase.
- [91] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32580-32590. Reaction mechanism of (6-4) photolyase.
- [92] T. Douki, T. Zalizniak, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 66, 171-179. Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects.
- [93] H. Kamiya, S. Iwai, H. Kasai, *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26, 2611-2617. The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells.
- [94] J. K. Kim, D. Patel, B. S. Choi, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 44-50. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity.
- [95] K. McAteer, Y. Jing, J. Kao, J. S. Taylor, M. A. Kennedy, *J. Mol. Biol.* **1998**, 282, 1013-1032. Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a Cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA.
- [96] J. H. Lee, C. J. Park, J. S. Shin, T. Ikegami, H. Akutsu, B. S. Choi, *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, 2474-2481. NMR structure of the DNA decamer duplex containing double T*G mismatches of cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer: implications for DNA damage recognition by the XPC-hHR23B complex.
- [97] J. K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 228, 849-854. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.
- [98] D. E. Szymkowski, K. Yarema, J. M. Essigmann, S. J. Lippard, R. D. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 10772-10776. An intrastrand

d(GpG) platinum crosslink in duplex M13 DNA is refractory to repair by human cell extracts.

- [99] R. Kusumoto, C. Masutani, K. Sugasawa, S. Iwai, M. Araki, A. Uchida, T. Mizukoshi, F. Hanaoka, *Mutat. Res.* **2001**, *485*, 219-227. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro.
- [100] K. Sugasawa, T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 507-521. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair.
- [101] J. T. Reardon, A. Sancar, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 2539-2551. Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease.
- [102] P. H. Clingen, C. F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, M. H. Green, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2245-2248. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells.
- [103] D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, E. Sage, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26732-26742. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis.
- [104] J. E. Donnellan, Jr., R. B. Setlow, *Science* **1965**, *149*, 308-310. Thymine Photoproducts but not Thymine Dimers Found in Ultraviolet-Irradiated Bacterial Spores.
- [105] J. C. Pieck, U. Hennecke, A. J. Pierik, M. G. Friedel, T. Carell, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36317-36326. Characterization of a new thermophilic spore photoproduct lyase from *Geobacillus stearothermophilus* (SplG) with defined lesion containing DNA substrates.
- [106] W. G. Humphreys, F. F. Kadlubar, F. P. Guengerich, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 8278-8282. Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: evidence for initial adduct formation at the N7 position.
- [107] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts.
- [108] M. Kartalou, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 1-21. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins.

- [109] J. C. Huang, D. B. Zamble, J. T. Reardon, S. J. Lippard, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 10394-10398. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease.
- [110] D. B. Zamble, D. Mu, J. T. Reardon, A. Sancar, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004-10013. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease.
- [111] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C. , **1995**.
- [112] A. H. Conney, *Cancer Research* **1982**, *42*, 4875-4917. Induction of Microsomal-Enzymes by Foreign Chemicals and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons - Clowes,G.H.A. Memorial Lecture.
- [113] B. Beije, L. Moller, *Mutation Research* **1988**, *196*, 177-209. 2-Nitrofluorene and Related-Compounds - Prevalence and Biological Effects.
- [114] N. E. Geacintov, M. Cosman, B. E. Hingerty, S. Amin, S. Broyde, D. J. Patel, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 111-146. NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adducts: Principles, patterns, and diversity.
- [115] R. H. Heflich, R. E. Neft, *Mutat. Res.* **1994**, *318*, 73-114. Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites.
- [116] P. Belguise-Valladier, R. P. Fuchs, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10091-10100. Strong sequence-dependent polymorphism in adduct-induced DNA structure: analysis of single N-2-acetylaminofluorene residues bound within the NarI mutation hot spot.
- [117] P. Belguise-Valladier, R. P. Fuchs, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 903-913. N-2-aminofluorene and N-2 acetylaminofluorene adducts: the local sequence context of an adduct and its chemical structure determine its replication properties.
- [118] L. M. Eckel, T. R. Krugh, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 89-94. 2-Aminofluorene modified DNA duplex exists in two interchangeable conformations.
- [119] L. C. Gillet, J. Alzeer, O. D. Scharer, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 1961-1969. Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis.

- [120] R. B. Setlow, W. L. Carrier, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1964**, *51*, 226-231. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: an Error-Correcting Mechanism.
- [121] R. P. Boyce, P. Howard-Flanders, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1964**, *51*, 293-300. Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in *E. Coli* K-12.
- [122] P. C. Hanawalt, R. H. Haynes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *19*, 462-467. Repair Replication of DNA in Bacteria: Irrelevance of Chemical Nature of Base Defect.
- [123] P. Howard-Flanders, R. P. Boyce, L. Theriot, *Genetics* **1966**, *53*, 1119-1136. Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA.
- [124] B. Van Houten, *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 18-51. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*.
- [125] J. J. Truglio, D. L. Croteau, B. Van Houten, C. Kisker, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 233-252. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system.
- [126] S. J. Mazur, L. Grossman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4432-4443. Dimerization of *Escherichia coli* UvrA and its binding to undamaged and ultraviolet light damaged DNA.
- [127] D. K. Orren, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 5237-5241. The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex.
- [128] B. Van Houten, A. Snowden, *Bioessays* **1993**, *15*, 51-59. Mechanism of action of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease: clues to the damage recognition problem.
- [129] Y. Zou, H. Bassett, R. Walker, A. Bishop, S. Amin, N. E. Geacintov, B. Van Houten, *Journal of Molecular Biology* **1998**, *281*, 107-119. Hydrophobic forces dominate the thermodynamic characteristics of UvrA-DNA damage interactions.
- [130] M. J. DellaVecchia, D. L. Croteau, M. Skorvaga, S. V. Dezhurov, O. I. Lavrik, B. Van Houten, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45245-45256. Analyzing the handoff of DNA from UvrA to UvrB utilizing DNA-protein photoaffinity labeling.
- [131] D. K. Orren, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15796-15803. Formation and enzymatic properties of the UvrB.DNA complex.

- [132] J. J. Truglio, E. Karakas, B. Rhau, H. Wang, M. J. DellaVecchia, B. Van Houten, C. Kisker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 360-364. Structural basis for DNA recognition and processing by UvrB.
- [133] M. Machius, L. Henry, M. Palnitkar, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 11717-11722. Crystal structure of the DNA nucleotide excision repair enzyme UvrB from *Thermus thermophilus*.
- [134] T. R. Waters, J. Eryilmaz, S. Geddes, T. E. Barrett, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6423-6427. Damage detection by the UvrABC pathway: Crystal structure of UvrB bound to fluorescein-adducted DNA.
- [135] J. J. Lin, A. M. Phillips, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17693-17700. Active site of (A)BC excinuclease. II. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision.
- [136] I. Husain, B. Van Houten, D. C. Thomas, M. Abdel-Monem, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 6774-6778. Effect of DNA polymerase I and DNA helicase II on the turnover rate of UvrABC excision nuclease.
- [137] G. F. Moolenaar, R. S. Uiterkamp, D. A. Zwijnenburg, N. Goosen, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 462-468. The C-terminal region of the *Escherichia coli* UvrC protein, which is homologous to the C-terminal region of the human ERCC1 protein, is involved in DNA binding and 5'-incision.
- [138] T. Ikegami, I. Kuraoka, M. Saijo, N. Kodo, Y. Kyogoku, K. Morikawa, K. Tanaka, M. Shirakawa, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 701-706. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA.
- [139] S. Rademakers, M. Volker, D. Hoogstraten, A. L. Nigg, M. J. Mone, A. A. Van Zeeland, J. H. Hoeijmakers, A. B. Houtsmuller, W. Vermeulen, *Mol Cell Biol* **2003**, *23*, 5755-5767. Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions.
- [140] S. Prakash, L. Prakash, *Mutat. Res.* **2000**, *451*, 13-24. Nucleotide excision repair in yeast.
- [141] D. L. Mitchell, R. S. Nairn, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 805-819. The biology of the (6-4) photoproduct.
- [142] A. van Hoffen, J. Venema, R. Meschini, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders, *Embo J.* **1995**, *14*, 360-367. Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts.

- [143] P. Hanawalt, I. Mellon, *Curr. Biol.* **1993**, 3, 67-69. Stranded in an active gene.
- [144] E. C. Friedberg, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 15-42. Relationships between DNA repair and transcription.
- [145] B. A. Donahue, S. Yin, J. S. Taylor, D. Reines, P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 8502-8506. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template.
- [146] S. Tornaletti, D. Reines, P. C. Hanawalt, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 24124-24130. Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA.
- [147] D. Tantin, A. Kansal, M. Carey, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 6803-6814. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes.
- [148] E. Citterio, V. Van Den Boom, G. Schnitzler, R. Kanaar, E. Bonte, R. E. Kingston, J. H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 7643-7653. ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor.
- [149] S. Kamiuchi, M. Saijo, E. Citterio, M. de Jager, J. H. Hoeijmakers, K. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 201-206. Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair.
- [150] D. Tantin, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27794-27799. RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIH components xeroderma pigmentosum B and p62.
- [151] N. Iyer, M. S. Reagan, K. J. Wu, B. Canagarajah, E. C. Friedberg, *Biochemistry* **1996**, 35, 2157-2167. Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein.
- [152] D. Mu, M. Wakasugi, D. S. Hsu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 28971-28979. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease.

- [153] R. S. Feldberg, L. Grossman, *Biochemistry* **1976**, *15*, 2402-2408. A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA.
- [154] B. O. Wittschieben, S. Iwai, R. D. Wood, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39982-39989. DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA.
- [155] Y. Fujiwara, C. Masutani, T. Mizukoshi, J. Kondo, F. Hanaoka, S. Iwai, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20027-20033. Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein.
- [156] T. Riedl, F. Hanaoka, J. M. Egly, *Embo J.* **2003**, *22*, 5293-5303. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA.
- [157] A. Tapias, J. Auriol, D. Forget, J. H. Enzlin, O. D. Scharer, F. Coin, B. Coulombe, J. M. Egly, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19074-19083. Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors.
- [158] J. T. Reardon, A. Sancar, *Cell Cycle* **2004**, *3*, 141-144. Thermodynamic cooperativity and kinetic proofreading in DNA damage recognition and repair.
- [159] M. S. Wold, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 61-92. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism.
- [160] W. L. de Laat, E. Appeldoorn, K. Sugasawa, E. Weterings, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2598-2609. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair.
- [161] Z. He, L. A. Henricksen, M. S. Wold, C. J. Ingles, *Nature* **1995**, *374*, 566-569. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair.
- [162] J. L. Burns, S. N. Guzder, P. Sung, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11607-11610. An affinity of human replication protein A for ultraviolet-damaged DNA.
- [163] Y. Lao, X. V. Gomes, Y. Ren, J. S. Taylor, M. S. Wold, *Biochemistry* **2000**, *39*, 850-859. Replication protein A interactions with DNA. III. Molecular basis of recognition of damaged DNA.

- [164] O. Maillard, U. Camenisch, K. B. Blagoev, H. Naegeli, *Mutat. Res.* **2008**, *658*, 271-286. Versatile protection from mutagenic DNA lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair.
- [165] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253-276. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair.
- [166] B. S. Thoma, K. M. Vasquez, *Mol. Carcinog.* **2003**, *38*, 1-13. Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair.
- [167] J. M. Ng, W. Vermeulen, G. T. van der Horst, S. Bergink, K. Sugawara, H. Vrieling, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1630-1645. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein.
- [168] L. E. Jansen, R. A. Verhage, J. Brouwer, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33111-33114. Preferential binding of yeast Rad4.Rad23 complex to damaged DNA.
- [169] M. Winnacker, S. Breeger, R. Strasser, T. Carell, *Chembiochem* **2009**, *10*, 109-118. Novel diazirine-containing DNA photoaffinity probes for the investigation of DNA-protein-interactions.
- [170] E. A. Maltseva, N. I. Rechkunova, I. O. Petruseva, W. Vermeulen, O. D. Scharer, O. I. Lavrik, *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 77-84. Crosslinking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages.
- [171] Y. S. Krasikova, N. I. Rechkunova, E. A. Maltseva, I. O. Petruseva, V. N. Silnikov, T. S. Zatsepin, T. S. Oretskaya, O. D. Scharer, O. I. Lavrik, *Biochemistry (Mosc)* **2008**, *73*, 886-896. Interaction of nucleotide excision repair factors XPC-HR23B, XPA, and RPA with damaged DNA.
- [172] K. Sugawara, J. M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. J. van der Spek, A. P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 223-232. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair.
- [173] R. D. Gietz, S. Prakash, *Gene* **1988**, *74*, 535-541. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD4 gene required for excision repair of UV-damaged DNA.
- [174] R. Legerski, C. Peterson, *Nature* **1992**, *360*, 610. Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C.

- [175] J. F. Watkins, P. Sung, L. Prakash, S. Prakash, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 7757-7765. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function.
- [176] T. G. Ortolan, L. Chen, P. Tongaonkar, K. Madura, *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32*, 6490-6500. Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway.
- [177] S. N. Guzder, P. Sung, L. Prakash, S. Prakash, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31541-31546. Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the Rad4 and Rad23 proteins, for ultraviolet damaged DNA.
- [178] J. H. Min, N. P. Pavletich, *Nature* **2007**, *449*, 570-575. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein.
- [179] K. Sugasawa, *Adv Exp Med Biol* **2008**, *637*, 47-56. XPC: its product and biological roles.
- [180] K. Sugasawa, Y. Shimizu, S. Iwai, F. Hanaoka, *DNA Repair (Amst)* **2002**, *1*, 95-107. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex.
- [181] T. Hey, G. Lipps, K. Sugasawa, S. Iwai, F. Hanaoka, G. Krauss, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6583-6587. The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay.
- [182] M. Bankmann, L. Prakash, S. Prakash, *Nature* **1992**, *355*, 555-558. Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins.
- [183] G. W. Jones, S. H. Reed, R. Waters, *Yeast* **1997**, *13*, 31-36. Characterization of the rad14-2 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the recognition of UV photoproducts by the Rad14 protein.
- [184] S. N. Guzder, C. H. Sommers, L. Prakash, S. Prakash, *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1135-1141. Complex formation with damage recognition protein Rad14 is essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 nuclease to perform its function in nucleotide excision repair in vivo.
- [185] S. Ghaemmaghami, W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea, J. S. Weissman, *Nature* **2003**, *425*, 737-741. Global analysis of protein expression in yeast.

- [186] S. N. Guzder, P. Sung, L. Prakash, S. Prakash, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5433-5437. Yeast DNA-repair gene RAD14 encodes a zinc metalloprotein with affinity for ultraviolet-damaged DNA.
- [187] K. Rodriguez, J. Talamantez, W. Huang, S. H. Reed, Z. Wang, L. Chen, W. J. Feaver, E. C. Friedberg, A. E. Tomkinson, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34180-34189. Affinity purification and partial characterization of a yeast multiprotein complex for nucleotide excision repair using histidine-tagged Rad14 protein.
- [188] S. Ichiro, I. Kunimitsu, M. Toshiro, O. Yoshio, K. Tanaka, *Gene* **1993**, *136*, 345-348. Genomic characterization of the human DNA excision repair-controlling geneXPAC.
- [189] B. Koberle, V. Roginskaya, R. D. Wood, *DNA Repair (Amst)* **2006**, *5*, 641-648. XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells.
- [190] Y. Liu, Y. Liu, Z. Yang, C. Utzat, G. Wang, A. K. Basu, Y. Zou, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7361-7368. Cooperative interaction of human XPA stabilizes and enhances specific binding of XPA to DNA damage.
- [191] C. J. Jones, R. D. Wood, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12096-12104. Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA.
- [192] U. Camenisch, R. Dip, M. Vitanescu, H. Naegeli, *DNA Repair (Amst)* **2007**, *6*, 1819-1828. Xeroderma pigmentosum complementation group A protein is driven to nucleotide excision repair sites by the electrostatic potential of distorted DNA.
- [193] U. Camenisch, R. Dip, S. B. Schumacher, B. Schuler, H. Naegeli, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 278-284. Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair.
- [194] D. M. LeMaster, F. M. Richards, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7263-7268. ¹H-¹⁵N heteronuclear NMR studies of Escherichia coli thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type.
- [195] F. Perrin, *J. Phys. Paris* **1926**, *7*, 390-401. The polarisation of fluorescence light. Average life of molecules in their excited state.
- [196] W. B. Dandliker, M.-L. Hsu, J. Levin, B. Ramanath Rao, J. L. a. H. V. V. John, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 74*, Academic Press, **1981**, pp. 3-28.

- [197] W. B. Dandliker, J. Dandliker, S. A. Levison, R. J. Kelly, A. N. Hicks, J. U. White, C. H. W. H. a. S. N. Timasheff, in *Methods in Enzymology*, Vol. **Volume 48**, Academic Press, **1978**, pp. 380-415.
- [198] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4205-4208. Preparation of C8-amine and acetamine adducts of 2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis.
- [199] S. Shibutani, R. Gentles, F. Johnson, A. P. Grollman, *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 813-818. Isolation and characterization of oligodeoxynucleotides containing dG-N2-AAF and oxidation products of dG-C8-AF.
- [200] J. Butenandt, A. P. M. Eker, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 642-654. Synthesis, crystal structure, and enzymatic evaluation of a DNA-photolesion isostere.
- [201] M. Wei, S. M. Cohen, A. P. Silverman, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38774-38780. Effects of spectator ligands on the specific recognition of intrastrand platinum-DNA cross-links by high mobility group box and TATA-binding proteins.
- [202] M. Ober, H. Muller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143-18149. Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.
- [203] K. Pereira de Jesus, L. Serre, N. Hervouet, V. Bouckson-Castaing, C. Zelwer, B. Castaing, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 679-682. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a complex between the *Lactococcus lactis* Fpg DNA-repair enzyme and an abasic site containing DNA.
- [204] A. Banerjee, W. Yang, M. Karplus, G. L. Verdine, *Nature* **2005**, *434*, 612-618. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA.
- [205] P. Amara, L. Serre, *DNA Repair (Amst.)* **2006**, *5*, 947-958. Functional flexibility of *Bacillus stearothermophilus* formamidopyrimidine DNA-glycosylase.
- [206] K. C. Holmes, M. Tirion, D. Popp, M. Lorenz, W. Kabsch, R. A. Milligan, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1993**, *332*, 15-22; discussion 22-14. A comparison of the atomic model of F-actin with cryo-electron micrographs of actin and decorated actin.

- [207] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240-255. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.
- [208] Y. Qi, M. C. Spong, K. Nam, A. Banerjee, S. Jiralerspong, M. Karplus, G. L. Verdine, *Nature* **2009**, *462*, 762-766. Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme.
- [209] F. Coste, M. Ober, Y. V. Le Bihan, M. A. Izquierdo, N. Hervouet, H. Mueller, T. Carell, B. Castaing, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 706-717. Bacterial base excision repair enzyme Fpg recognizes bulky N7-substituted-FapydG lesion via unproductive binding mode.
- [210] Y. Qi, M. C. Spong, K. Nam, M. Karplus, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **2009**, *285*, 1468-1478. Entrapment and structure of an extrahelical guanine attempting to enter the active site of a bacterial DNA glycosylase, MutM.
- [211] A. Rosler, G. Panayotou, D. P. Hornby, T. Barlow, T. Brown, L. H. Pearl, R. Savva, G. M. Blackburn, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1505-1516. The mechanism of DNA repair by uracil-DNA glycosylase: studies using nucleotide analogues.
- [212] K. Nam, G. L. Verdine, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18208-18209. Analysis of an anomalous mutant of MutM DNA glycosylase leads to new insights into the catalytic mechanism.
- [213] S. Wei, E. C. Friedberg, *Mutat. Res.* **1998**, *400*, 127-133. A fragment of the yeast DNA repair protein Rad4 confers toxicity to *E. coli* and is required for its interaction with Rad7 protein.
- [214] I. Kuraoka, E. H. Morita, M. Saijo, T. Matsuda, K. Morikawa, M. Shirakawa, K. Tanaka, *Mutat. Res.* **1996**, *362*, 87-95. Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein.
- [215] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491-498. The mechanism of action of DNA photolyases.
- [216] Y. Zhou, L. J. Romano, *Biochemistry* **1993**, *32*, 14043-14052. Solid-phase synthesis of oligonucleotides containing site-specific N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)fluorene adducts using 9-fluorenylmethoxycarbonyl as the base-protecting group.
- [217] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chemistry* **2002**, *8*, 293-301. Synthesis, stability, and conformation of the formamidopyrimidine G DNA lesion.

- [218] J. Butenandt, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Synthesis-Stuttgart* **1999**, 1085-1105. Synthesis of DNA lesions and DNA-lesion-containing oligonucleotides for DNA-repair studies.
- [219] A. Alt, K. Lammens, C. Chiocchini, A. Lammens, J. C. Pieck, D. Kuch, K. P. Hopfner, T. Carell, *Science* **2007**, 318, 967-970. Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase.
- [220] M. F. van Oosterwijk, R. Filon, A. J. de Groot, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13599-13604. Lack of transcription-coupled repair of acetylaminofluorene DNA adducts in human fibroblasts contrasts their efficient inhibition of transcription.
- [221] M. Missura, T. Buterin, R. Hindges, U. Hubscher, J. Kasparkova, V. Brabec, H. Naegeli, *Embo J.* **2001**, 20, 3554-3564. Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair.

9 Anhang

Tabelle 9.1: Tabelle zur Bestimmung der PCR Primer-Annealingtemperatur anhand der empirisch ermittelten Schmelzpunkte in °C.

GC	Länge des Primers																	
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	28.7	31.2	33.5	35.5	37.2	38.9	40.3	41.6	42.8	43.9	44.9	45.9	46.7	47.6	48.3	49.0	49.7	50.3
2	31.4	33.8	35.9	37.7	39.4	40.9	42.3	43.5	44.6	45.6	46.6	47.5	48.3	49.0	49.7	50.4	51.0	51.6
3	34.2	36.4	38.3	40.0	41.6	43.0	44.2	45.3	46.4	47.3	48.2	49.0	49.8	50.5	51.1	51.7	52.3	52.8
4	36.9	38.9	40.7	42.3	43.7	45.0	46.2	47.2	48.2	49.1	49.9	50.6	51.3	51.9	52.5	53.1	53.6	54.1
5	39.9	41.5	43.1	44.6	45.9	47.1	48.1	49.1	50.0	50.8	51.5	52.2	52.8	53.4	54.0	54.5	54.9	55.4
6	42.4	44.1	45.5	46.9	48.0	49.1	50.1	50.9	51.7	52.5	53.1	53.8	54.3	54.9	55.4	55.8	56.3	56.7
7	45.1	46.6	47.9	49.1	50.2	51.2	52.0	52.8	53.5	54.2	54.8	55.3	55.9	56.3	56.8	57.2	57.6	58.0
8	47.8	49.2	50.4	51.4	52.4	53.2	54.0	54.7	55.3	55.9	56.4	56.9	57.4	57.8	58.2	58.6	58.9	59.2
9	50.6	51.7	52.8	53.7	54.5	55.3	55.9	56.5	57.1	57.6	58.1	58.5	58.9	59.3	59.6	59.9	60.2	60.5
10	53.3	54.3	55.2	56.0	56.7	57.3	57.9	58.4	58.9	59.3	59.7	60.1	60.4	60.7	61.0	61.3	61.6	61.8
11	56.0	56.9	57.6	58.2	58.8	59.4	59.8	60.3	60.6	61.0	61.3	61.6	61.9	62.2	62.4	62.7	62.9	63.1
12	58.8	59.4	60.0	60.5	61.0	61.4	61.8	62.1	62.4	62.7	63.0	63.2	63.4	63.7	63.9	64.0	64.2	64.4
13	61.5	62.0	62.4	62.8	63.1	63.5	63.7	64.0	64.2	64.4	64.6	64.8	65.0	65.1	65.3	65.4	65.5	65.6
14	64.2	64.6	64.8	65.1	65.3	65.5	65.7	65.8	66.0	66.1	66.3	66.4	66.5	66.6	66.7	66.8	66.8	66.9
15	67.0	67.1	67.2	67.4	67.5	67.6	67.6	67.7	67.8	67.8	67.9	68.0	68.0	68.1	68.1	68.1	68.2	68.2
16	69.7	69.7	69.7	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5
17	72.4	72.2	72.1	71.9	71.8	71.7	71.5	71.4	71.3	71.3	71.2	71.1	71.0	71.0	70.9	70.9	70.8	70.8
18	75.2	74.8	74.5	74.2	73.9	73.7	73.5	73.3	73.1	73.0	72.8	72.7	72.6	72.4	72.3	72.2	72.1	72.1

Sequenz des *fpg* Gens aus *Lactococcus lactis* *Cremoris* sk11 (819 bp)

ATGCCAGAATTACCAGAAGTTGAAACCGTTAGAAGAGAACTTGAAAAAGAATTGTTGGACA
AAAAATTATATCTATAGAAGCCACTTATCCAAGAATGGTCTTAAGTGTGTTGAGCAATTGAAAA
AAGAATTGACAGGAAAAATCATTGAGGGCATCTTGCGGAGGGAAATATTTAATTTTTGAAATT
GGAGATGACTTTCGCTTGATTTCTCATTACGAATGGAAGGGAAATATCGCTTAGCAACACTT
GATGCACCAAGAGAAAAAGCATGACCATTTGACAATGAAATTTTCTGATGGGCAGTTAATCTAT
GCCGATGTAAGGAAATTTGGAAGTTGGGAATTGATTTCTACTGACCAAGTGATTCCCTATTTTC
TGAACAAAAAAATTGGACCAGAACCGACCTATGAAGATTTTGATGAAAAGCTTTTTCGAGAGA
AATTAAGAAAATCAACAAAGAAAATAAAACCTTATTTACTTGAGCAAACCCTTGTTGCTGGGC
TTGGCAATATTTATGTTGATGAAGTGCTCTGGTTAGCAAAAATTCATCCAGAAAAAGAGGCTA
ATCAGCTGACAGAAAGTTCCATCCACCTTTTGCACGACTCAATTATTGAAATTTTGCAAAAAGC
GATTAAGCTTGGTGGTTCAAGTATTAGAACTTATAGTGCCTTAGGATCAACTGGTAAAATGCA
AAATGAGTTGCAAGTTTATGGTAAACGGGTGAAAAATGTTCCCGTTGTGGTGCAGAGATTC
AAAAAATAAAAGTTGCTGGTTCGAGGCACTCATTTTTGCCAGTTTGTGAGCAAAAAATAA

Sequenz des *rad14* Gens aus *S. cerevisiae* (1116 bp)

ATGACTCCCGAACAAAAGGCCAACTAGAGGCTAACAGGAAATTAGCAATAGAACGGTTAAG
AAAAAGGGGAATACTGAGTAGCGACCAATTGAATCGAATAGAAAGTAGGAATGAACCTTTAA
AAACCCGGCCTCTCGCAGTTACTAGTGGCAGCAATCGGGATGATAATGCAGCAGCCGCAGTA
CATGTGCCAAATCATAATGGACAACCGTCTGCGCTTGCTAACACTAACACTAACTACTTCAC
TTTATGGTAGCGGAGTAGTTGATGGAAGTAAAAGGGATGCGTCGGTACTCGACAAAAGGCCA
ACGGATAGAATCAGACCTAGCATAAGGAAACAAGATTACATTGAGTACGATTTTGCCACCATG
CAGAACTTGAATGGTGGTTATATCAACCCTAAGGACAAGCTTCCAAATTCTGACTTTACCGATG
ACCAAGAATTTGAATCTGAGTTTGGATCTAAAAAGCAGAAGACACTACAGGACTGGAAAAAG
GAACAACCTTGAACGGAAAATGCTGTACGAAAATGCACCTCCTCCAGAGCATATTTCAAAGGCG
CCGAAATGTATTGAATGTCATATTAATATTGAGATGGATCCTGTGCTACATGATGTGTTCAAGT
TACAAGTTTGTAACAGTGTTCTAAGGAGCATCCAGAAAAGTATGCACTACTGACGAAAACA
GAATGTAAGGAAGATTACTTTTTAACAGACCCCGAATTGAATGATGAGGATCTCTTTCATAGA
CTAGAAAAGCCGAACCCTCATTCGGGGACATTTGCAAGAATGCAACTATTTGTTAGATGTGAA
GTGGAAGCCTTTGCGTTCAAGAAATGGGGTGGAGAAGAAGGTTTAGATGAGGAATGGCAAC

GTCGTGAAGAAGGAAAGGCTCACAGAAGGGAGAAAAAATACGAAAAGAAAATCAAGGAAAT
GCGACTGAAAACAAGAGCTCAAGAATATACTAATAGATTAAGAGAAAAGAAGCATGGGAAA
GCCCATATTCATCATTTTAGTGATCCAGTTGATGGAGGTATTGATGAAGACGGTTATCAAATTC
AAAGAAGAAGATGTACAGACTGCGGGCTAGAACTGAAGAAATTGACATTTAA

Sequenz des *rad14* Gens aus *S. cerevisiae* (N-terminal verkürzt, 1089 bp)

ATGGAGGCTAACAGGAAATTAGCAATAGAACGGTTAAGAAAAAGGGGAATACTGAGTAGCG
ACCAATTGAATCGAATAGAAAGTAGGAATGAACCTTTAAAAACCCGGCCTCTCGCAGTTACTA
GTGGCAGCAATCGGGATGATAATGCAGCAGCCGCAGTACATGTGCCAAATCATAATGGACAA
CCGTCTGCGCTTGCTAACACTAACACTAACTACTTCACTTTATGGTAGCGGAGTAGTTGATG
GAAGTAAAAGGGATGCGTCAGTACTCGACAAAAGGCCAACGGATAGAATCAGACCTAGCATA
AGGAAACAAGATTACATTGAGTACGATTTTGCCACCATGCACAACCTTGAATGGTGGTTATATC
AACCTTAAGGACAAGCTTCCAAATTCTGACTTTACCGATGACCAAGAATTTGAATCTGAGTTTG
GATCTAAAAAGCAGAAGACACTACAGGACTGGAAAAAGGAACAACCTTGAACGGAAAAATGCT
GTACGAAAATGCACCTCCTCCAGAGCATATTTCAAAGGCGCCGAAATGTATTGAATGTCATAT
TAATATTGAGATGGATCCTGTGCTACATGATGTGTTCAAGTTACAAGTTTGTAACAGTGTCT
AAGGAGCATCCAGAAAAGTATGCACTACTGACGAAAACAGAATGTAAGGAAGATTACTTTTT
AACAGACCCCGAATTGAATGATGAGGATCTCTTTCATAGACTAGAAAAGCCGAACCCTCATTC
GGGGACATTTGCAAGAATGCAACTATTTGTTAGATGTGAAGTGGAAGCCTTTACGTTCAAGAA
ATGGGGTGGGGAAGAAGGTTTAGATGAGGAATGGCAACGTCGTGAAGAAGGAAAGGCTCAC
AGAAGGGAGAAAAAATACGAAAAGAAAATCAAGGAAATGCGACTGAAAACAAGAGCTCAAG
AATATACTAATAGATTAAGGGAAAAGAAGCATGGGAAAGCCCATATTCATCATTTTAGTGATC
CAGTTGATGGAGGTATTGATGAAGACGGTTATCAAATTCAAAGAAGAAGATGTACAGACTGC
GGGCTAGAACTGAAGAAATTGACATTTAA

Sequenz des *rad14* Gens aus *S. cerevisiae* (DNA bindendes Fragment, 363 bp)

ATGGCGCCGAAATGTATTGAATGTCATATTAATATTGAGATGGATCCTGTGCTACATGATGTG
TTCAAGTTACAAGTTTGTAAACAGTGTTCTAAGGAGCATCCAGAAAAGTATGCACTACTGACG
AAACAGAATGTAAGGAAGATTACTTTTTAACAGACCCCGAATTGAATGATGAGGATCTCTTT
CATAGACTAGAAAAGCCGAACCCTCATTCGGGGACATTTGCAAGAATGCAACTATTTGTTAGA
TGTGAAGTGGAAGCCTTTGCGTTCAAGAAATGGGGTGGAGAAGAAGGTTTAGATGAGGAAT
GGCAACGTCGTGAAGAAGGAAAGGCTCACAGAAGGGAGAAAAAATACTAA

Curriculum vitae**Persönliche Daten**

Name:	Ralf Strasser	Familienstand:	ledig
Geburtsdatum:	08. Mai 1978	Staatsangehörigkeit:	Österreich
Geburtstort:	München		

Schul Ausbildung

09/84 – 07/88	Grundschule an der Führichstrasse, München
09/88 – 06/97	Michaeligymnasium München

Hochschulstudium

10/97 – 02/00	Studium der Biotechnologie an der FH Weihenstephan
10/00 – 09/05	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität
02/04 – 03/04	Organisch-Chemisches-Forschungspraktikum Université René Descartes, Paris, Frankreich
03/05 – 09/05	Diplomarbeit bei <i>Prof. Dr. Thomas Carell</i> , LMU München („Isolierung von Schlüsselproteinen in der DNA Nukleotidexcisionsreparatur“)
09/05	Hochschulabschluss: Dipl.-Chem. Univ.

Promotion

12/05 – 08/09	Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand in der Arbeitsgruppe bei <i>Prof. Dr. Thomas Carell</i> an der Ludwig- Maximilians-Universität
---------------	---

München, 12.08.2010

