

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

**Co-Kristallisation von Polymerase κ und ι
im Komplex mit DNA**

-

**Einbau von Pyrrolysin-Analoga durch Amber-Suppression und Einsatz von
nativer-chemischer Click-Ligation zur Modifikation von DNA-Polymerasen**

-

**Optimierung der Analytik von trypsin-verdauten Peptiden
und intakten Proteinen durch
LC-MS-Messung mittels einer LTQ Orbitrap XL**

Christian Andreas Deiml

aus

Pegnitz

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 21.11.2013

.....
Christian Deiml

Dissertation eingereicht am

21. November 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. Herres-Pawlis

Mündliche Prüfung am

16. Januar 2014

“If a man who can’t count finds a four leaf clover, is he lucky?”

Stanislaw Lem

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt

Publikationen

E. Kaya, M. Vrabel, C. A. Deiml, S. Prill, and T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 18, 4466-4468. *A genetically encoded norbornene-amino acid allows mild and selective cu-free click modification of proteins.*

Vorträge und Poster

Vortrag: „The Y-Family DNA Polymerases“, Rabensteiner Kolleg, Pottenstein, Germany, Mai 2009.

Poster-Präsentation: "Investigation of Polymerase κ using click chemistry", EMBO Conference Chemical Biology, Heidelberg, Germany, September 2010.

Poster-Präsentation: "Analysis of Polymerase κ 's abilities in translesion synthesis", EMBO practical course: Methods in chemical biology 2011, Heidelberg, Germany, April 2011.

Weitere Publikationen

T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 7008-7012. *The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA.*

M. Münzel, U. Lischke, D. Stathis, T. Pfaffeneder, F. A. Gnerlich, C. A. Deiml, S. C. Koch, K. Karaghiosoff, T. Carell, *Chemistry* **2011**, 49, 13782-13788. *Improved synthesis and evaluation of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.*

D. Stathis, U. Lischke, S. C. Koch, C. A. Deiml, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 10, 4925-4930. *Discovery and mutagenicity of a guanidinoformimine lesion as a new intermediate of the oxidative deoxyguanosine degradation pathway.*

A. Hienzsch, C. A. Deiml, V. Reiter, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2013**, *Total synthesis of the hypermodified RNA bases wybutosine and hydroxywybutosine and their quantification together with other modified RNA bases in plant materials.*

Danksagungen

Ich möchte mich im Besonderen bei Herrn Prof. Dr. Thomas Carell für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Gruppe durchzuführen, für die Freiheit in der Gestaltung des Projekts und für die Unterstützung beim Abschluss der Promotion parallel zur neuen Arbeitsstelle.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Schwägerin gebührt nicht zu ermessender Dank, da sie mir immer beistehen und immer helfen. Für diese Sicherheit und bedingungslose Liebe möchte ich euch herzlich danken.

Meinem Neffen Florian und meiner Nichte Rosalie möchte ich für die Ablenkung danken, da sie mich oft mit ihrer Lebensfreude in die Realität zurückgeholt haben, wenn die Wissenschaft überwältigend wurde.

Für biologische, chemisch-biologische, bioorganische und sonstige wissenschaftliche Beratung und seine Hilfe bei der Projektplanung möchte ich Dr. Markus Müller danken.

Dr. Sabine Schneider gebührt Dank für die wissenschaftliche Anleitung meiner selbst in den ersten Monaten, in denen sie meine Fragen mit Geduld beantwortet hat. Ebenso für den andauernden Einsatz im Bereich der Röntgenstrukturen.

Außerdem möchte ich den Korrekturlesern meiner Arbeit (Dr. Markus Müller, Dr. Martin Münzel, Dr. Milan Vrabec, Michael Ehrlich) nochmals herzlich danken.

Frau Gärtner möchte ich für ihre Unterstützung bei allen bürokratischen Wirren des akademischen Systems danken.

Darüber hinaus möchte ich dem ganzen Arbeitskreis Carell für eine weit über eine normale Arbeitsatmosphäre hinausgehende Freundlichkeit, Freundschaftlichkeit und Hilfsbereitschaft danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	VI
2	Summary	IX
3	Einleitung	1
3.1	DNA-Reparatur	1
3.1.1	DNA-Schädigung	1
3.1.2	Klassen von DNA-Schäden.....	1
3.1.2.1	UV-Schäden	1
3.1.2.2	Sperrige Addukte.....	2
3.1.2.3	Oxidative Schäden.....	3
3.1.2.4	Cisplatin-induzierte-DNA-Schäden	4
3.1.3	DNA-Reparatursysteme	5
3.1.3.1	Basenexzisionsreparatur.....	5
3.1.3.2	Nukleotidexzisionsreparatur.....	6
3.1.4	Schadens-Toleranz-Systeme	8
3.1.4.1	TLS-Polymerasen.....	10
3.1.4.2	DNA-Polymerase η	12
3.1.4.3	DNA-Polymerase ι	13
3.1.4.4	DNA-Polymerase κ	14
3.1.4.5	DNA-Polymerase ζ	15
3.1.4.6	Rev1	16
3.2	Proteinmodifikation.....	16
3.2.1	Modifikation von Lysinen und Cysteinen.....	16
3.2.2	Positionsspezifische Proteinmodifikationsmethoden.....	17
3.2.2.1	Tag-basierte-Methoden	17
3.2.2.2	Methoden der chemischen Biologie (semi-synthetische-Proteine).....	18
3.2.3	Einbau unnatürlicher Aminosäuren.....	18
3.2.3.1	Grundzüge der Translation.....	18
3.2.3.2	Natürliche Erweiterungen des genetischen Codes	19
3.2.3.3	Künstliche Erweiterung des genetischen Codes.....	19
3.2.3.4	Suppression von Terminationscodons.....	20
3.2.3.5	Tyrosin-basiertes-System.....	20
3.2.3.6	Pyrrolysin-System	21

3.2.3.7	Methoden der Suppressionsoptimierung.....	22
3.2.4	Click-Chemie	23
3.2.4.1	Grundlagen der Click-Chemie	23
3.2.4.2	Kupferfreie-Click-Reaktionen.....	24
3.2.4.3	Click-Reaktion an unnatürlichen Aminosäuren.....	24
3.2.4.4	Alternative bioorthogonale Reaktionen	26
3.3	Massenspektrometrie.....	28
3.3.1	Ionisationstechniken.....	28
3.3.1.1	Elektrische Ionisation - EI.....	29
3.3.1.2	Chemische Ionisation - CI.....	29
3.3.1.3	<i>Atmospheric pressure chemical ionisation</i> - APCI.....	30
3.3.1.4	Elektrospray Ionisation - ESI	30
3.3.1.5	Nano-ESI.....	31
3.3.1.6	<i>Atmospheric pressure photo ionization</i> APPI.....	32
3.3.1.7	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i> (MALDI)	33
3.3.1.8	<i>Fast atom bombardment</i> (FAB).....	33
3.3.2	Massenanalytik.....	34
3.3.2.1	Sektorfeldgeräte	34
3.3.2.2	<i>Time of flight</i> - Massenanalytik (TOF-MS).....	34
3.3.2.3	TOF/TOF-MS.....	34
3.3.2.4	Quadrupol.....	35
3.3.2.5	Q-TOF	35
3.3.2.6	QQQ-MS	36
3.3.2.7	3D-Quadrupol-Ionenfallen-Massendetektor (3D-QIT-MS).....	36
3.3.2.8	Lineare Quadrupol-Ionenfalle (LTQ-MS)	37
3.3.2.9	Fourier-Transformation-Ionen-Zyklotron-Resonanz (FTICR)	38
3.3.2.10	LTQ-FTICR-MS (LTQ FT <i>ion cyclotron resonance</i> -MS)	38
3.3.2.11	LTQ Orbitrap-MS	39
4	Ziel der Arbeit.....	43
5	Ergebnisse	45
5.1	Co-Kristallisation von Y-Familie-Polymerasen und DNA	45
5.1.1	Expression und Reinigung von humaner DNA-Polymerase κ	45
5.1.2	Kristallisation von humaner Pol κ_5	48
5.1.2.1	Konstruktion der neuen Polymerase-Expressionsplasmide	49

5.1.2.2	Reinigung von Polk _s aus IBA33X.....	50
5.1.2.3	Kristallisation des Polk _s -33X-Proteins.....	52
5.1.2.4	Reinigung von Polk _s aus IBA43.....	54
5.1.2.5	Kristallisation von Polk _s 43 mit ungeschädigter DNA.....	55
5.1.3	Klonierung und Expression von humaner Polymerase ι.....	61
5.1.4	Kristallisation von Polt _s mit ungeschädigter DNA.....	63
5.2	Analyse der Prozessivität von TLS-Polymerasen.....	63
5.2.1.1	Voranalysen der Aktivität von Y-Familie-DNA-Polymerasen.....	64
5.2.1.2	Inhibitorstudien mit Polymerase η, κ und ι.....	65
5.3	Entwicklung von nativen Click-Chemie-Systemen.....	71
5.3.1	Modifikation von Proteinen durch Cu-Click.....	71
5.3.2	Entwicklung von kupferfreien Click-Varianten an Norbornen.....	72
5.3.2.1	Evolution von pylRS durch iterative Sättigungsmutagenese.....	73
5.3.2.2	Optimierung der Menge an tRNA ^{Pyl} und PylRS.....	75
5.3.2.3	Co-Expressions-System für die Inkorporation des Norbornen-Analogons..	77
5.4	Anwendung von Amber-Suppression und Click-Chemie.....	78
5.4.1	Modifikation von Polymerasen für FRET-Studien.....	78
5.4.1.1	Klonierung und Expression von Polk _s zur Suppression.....	78
5.4.1.2	Kupferfreier Click an Polk _s mut.....	79
5.4.1.3	Evaluation des kupferfreien Clicks mit Nitrilimininen an Polk _s	82
5.4.2	Entwicklung der nativen-chemischen Click-Ligation.....	89
5.4.2.1	Einfluss von Co-Faktoren auf TLS-Polymerasen.....	89
5.4.2.2	Prinzip der nativen chemischen Ligation.....	90
5.4.2.3	<i>Proof of principle</i> mit Polk _s	92
5.4.3	Anwendung der nativen chemischen-Click-Ligation.....	93
5.4.3.1	Expression und Reinigung von humaner Polymerase κ (1 – 870).....	93
5.4.3.2	Klonierung der zur Ligation benötigten Proteinabschnitte.....	94
5.4.3.3	Native-Click-Ligation von Polk _s und YFP.....	95
5.5	Analyse von modifizierten Proteinen durch Massenspektrometrie.....	99
5.5.1.1	Veränderungen an der Ultimate 3000 Nano-HPLC.....	99
5.5.1.2	Optimierung der Ionisation durch eine neue Ionenquelle.....	100
6	Ausblick.....	104
7	Materialien und Methoden:.....	107
7.1	Materialien.....	107

7.1.1	Chemikalien	107
7.1.2	Geräte	107
7.1.3	Plasmide	108
7.1.4	Stämme	109
7.1.5	Kits	110
7.1.6	Enzyme	110
7.1.7	Oligonukleotide	110
7.1.7.1	DNA-Stränge zur Kristallisation	111
7.1.7.2	DNA-Stränge für Primer-Verlängerungsstudien	111
7.1.7.3	Sequenzierungsprimer	112
7.1.7.4	Mutationsprimer	112
7.1.7.5	Klonierungssequenzen	113
7.1.8	Chromatographie-Säulen	114
7.1.9	Pufferbedingungen	115
7.1.10	Medien	117
7.2	Methoden	118
7.2.1	Molekularbiologische Methoden	118
7.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	118
7.2.1.2	Einzelkolonie-PCR (<i>single colony PCR</i>)	119
7.2.1.3	Positionsspezifische Mutagenese	119
7.2.1.4	Primer-Verlängerungsstudien	121
7.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	121
7.2.1.6	Agarose-Gel	121
7.2.1.7	Polyacrylamidgele	122
7.2.1.8	Stargate-Klonierung	123
7.2.1.9	TOPO-Klonierung:	124
7.2.1.10	Klassische Klonierung	125
7.2.2	Proteinbiochemische Methoden	125
7.2.2.1	SDS-PAGE	125
7.2.2.2	Western-Blot	126
7.2.2.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	128
7.2.3	Zellaufschlussmethoden:	128
7.2.3.1	Homogenisator (Emulsi-Felx C5)	128
7.2.3.2	<i>French press</i>	129

7.2.3.3	Vorbereitung des Zellysates für die weitere Reinigung.....	129
7.2.4	Proteinreinigungsmethoden:.....	130
7.2.4.1	Reinigung 6x-Histidin-modifizierter Proteine	130
7.2.4.2	Reinigung Streptavidin-Tag-markierter Proteine.....	131
7.2.4.3	Reinigung des Polymerase- κ _s -43-Proteins	131
7.2.5	Mikrobiologische Methoden	131
7.2.5.1	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	131
7.2.5.2	Herstellung chemisch-kompenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	132
7.2.5.3	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	132
7.2.5.4	Expression von rekombinaten Proteinen in Schüttelkultur	133
7.2.5.5	Expression in einem Fermenter (Minifors, Infors).....	134
7.2.6	Einbau unnatürlicher Aminosäuren.....	135
7.2.6.1	Konfokale Mikroskopie.....	135
7.2.6.2	Fluoreszenzplattenlesegerät	135
7.2.7	LCMS (Dionex Ultimate 3000, LTQ Orbitrap XL).....	136
7.2.7.1	Präparierung der verdauten Proteinproben.....	136
7.2.7.2	LCMS-Nano-Säulen-Herstellung.....	137
7.2.7.3	LC-MS Kalibrierung	138
7.2.7.4	LC-MS Messung von tryptisch verdauten Proteinproben.....	138
7.2.7.5	LC-MS-Messung von intakten Proteinen.....	139
7.2.8	Organische Synthese	139
7.2.8.1	DNA-Schäden	139
7.2.8.2	Polymerase-Inhibitoren	139
7.2.8.3	Suppressions-Komponenten.....	139
8	Abkürzungsverzeichnis	141
9	Literaturverzeichnis.....	145



1 Zusammenfassung

Unser Erbgut ist täglich Schädigungen ausgesetzt, die kompetent von DNA-Reparatursystemen korrigiert werden. Die *translesion synthesis* (TLS), also das gezielte Überlesen von geschädigten Basen durch spezialisierte TLS-DNA-Polymerasen, bietet im Falle des Versagens der DNA-Reparatur eine Alternative zum Arrest des Zellzyklus' oder des Zelltodes (Apoptose).

Im Menschen liegen vier TLS-Polymerasen vor (η , ι , κ und ζ). Diese agieren allein oder in unterschiedlichen Kombinationen, je nach Klasse des DNA-Schadens. Von besonderem Interesse sind die sperrigen Addukte, da diese starke Störungen und Mutationen in der DNA hervorrufen. Im Fokus steht hier das Acetylaminofluoren (AAF, 7). Die hierfür prädestinierten Polymerasen sind Polymerase η , ι und κ . Mit Hilfe einer Kristallstruktur könnte man Detailinformationen zu Mechanismus und Funktionsweise der betreffenden Polymerasen erhalten. Die Struktur von Polymerase η im Komplex mit AAF-geschädigter DNA wurde bereits von Dr. S. Schneider and Dr. S. Schorr gelöst (PDB Code 2XGQ).

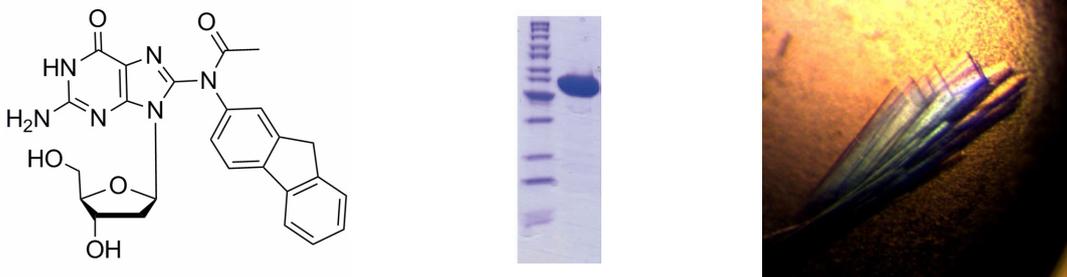


Abbildung 1: Schritte auf dem Weg zur Kristallisation einer Polymerase: DNA-Schaden (Acetylaminofluoren (7), links); reines Protein (SDS-Gel mit humaner Polymerase κ , Mitte); Kristalle von humaner Polymerase κ (rechts).

In dieser Arbeit wurden die Polymerasen κ und ι in verkürzter Form kloniert und exprimiert. Nach der jeweiligen Reinigung konnten etwa 50 mg Polymerase κ und etwa 20 mg Polymerase ι pro Liter Kulturmedium erhalten werden. Die Kristallisation von humaner Polymerase κ im Komplex mit ungeschädigter DNA ergab einheitlich gewachsene Kristalle, die durch *microseeding* optimiert werden konnten. Aufgrund nicht ausreichender Streueigenschaften der Kristalle (zu geringe Auflösung) konnte jedoch die Kristallstruktur noch nicht gelöst werden. Die erhaltenen Bedingungen bilden aber sehr gute Voraussetzungen für zukünftige Analysen. Humane Polymerase ι wurde in ersten Kristallisationstests eingesetzt, welche als Grundlagen für folgende Kristallisationsexperimente dienen.

Verschiedene Inhibitoren von Y-Familie-DNA-Polymerasen wurden auf deren Aktivität bezüglich Polymerase η , ι und κ untersucht. Die Inhibitoren können auch Daten im Zusammenhang mit dem Insertionsverhalten von Polymerasen liefern. Zusätzlich wurden diese auch zur Stabilisierung der Polymerase im Kristallgitter eingesetzt.

Es wurden fünf verschiedene Inhibitoren untersucht (Derivate von 3-*O*-Methylfunicon: Rapicon **25**, 3-*O*-MEF **26**, Derivate von β -Sitosteryl-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid (SLG, **27**): β -Sitosteryl-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid (CLG, **28**), β -Cholesterol-glukose (CG, **29**) und Penta-*O*-galloyl- β -D-glukose (PGG, **28**). Diese wurden von Micheal Ehrlich synthetisiert. Dabei stellen CLG und 3-*O*-MEF Derivate bekannter Inhibitoren dar, die für eine vereinfachte Synthese optimiert werden sollten, ohne dabei an Aktivität einzubüßen. Die Analysen zeigten, dass PGG und CLG sehr gute Inhibitoren für Pol κ waren. Studien der Struktur-Aktivitätsbeziehungen belegten, dass die Derivatisierung des Steroidrestes zu Cholesterol keine Auswirkung auf die Aktivität hat, die Herstellungskosten aber deutlich senkt. Dagegen bestätigte sich, dass die fehlenden Seitengruppen des Rapicons entscheidend für dessen Aktivität sind, da die Katalysefunktion der DNA-Polymerasen nur minimal beeinflusst wurde.

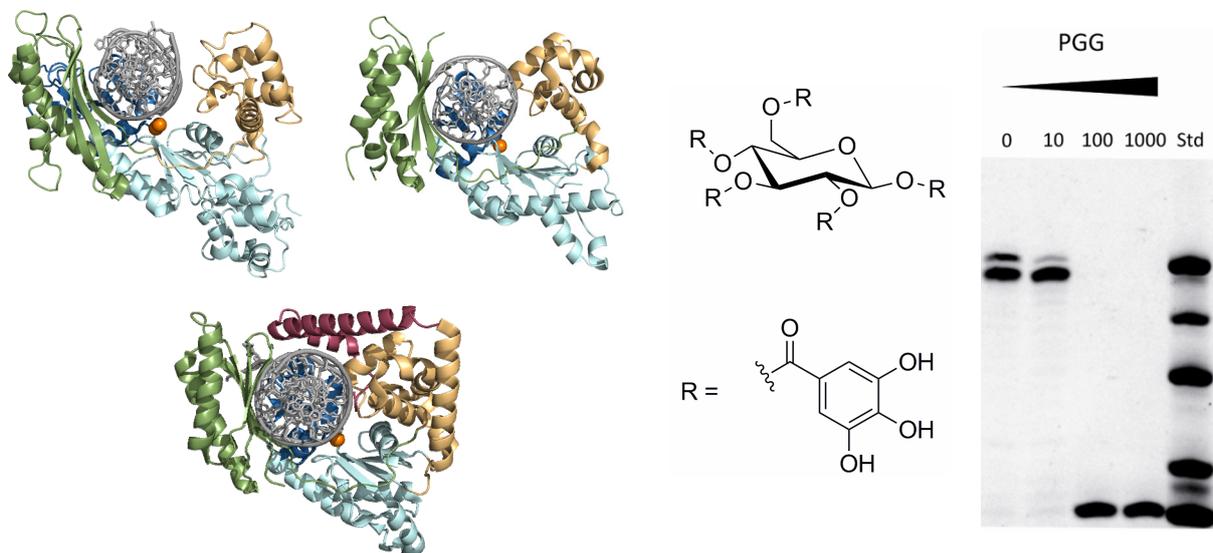


Abbildung 2: Komponenten einer Inhibitor-Primer-Verlängerungsstudie; Y-Familie DNA-Polymerasen η , ι und κ (links); PGG (**31**) als Beispiel eines Polymeraseinhibitors (Mitte); denaturierendes Polyacrylamidgel einer Inhibitor-Primer-Verlängerungsstudie.

Weiterhin wurde eine native Methode zur positionsspezifischen Markierung von DNA-Polymerasen mit funktionellen Gruppen, besonders Fluorophoren, entwickelt. Hierfür sollte das Pyrrolysin-System mittels Amber-Suppression verwendet werden. Als reaktive

Gruppe wurde ein Norbornen-Derivat verwendet, da dieses eine Click-Reaktion eingeht ohne Kupfer als Katalysator zu benötigen. Dieses wurde erfolgreich über drei verschiedene Varianten modifiziert. Zusätzlich wurde ein bifunktionaler Linker entwickelt, der eine positionsspezifische Verbindung von zwei Proteinen ermöglichen sollte. Dabei kann eine reaktive Gruppe des Linkers nach dem ersten Reaktionsschritt mit UV-Licht aktiviert werden (Abbildung 3). Als Vorversuch wurden zwei Moleküle Polymerase κ verbunden. Die Konstruktion einer Vollängenversion von Polymerase κ aus zwei Teilabschnitten scheiterte an der Löslichkeit der C-terminalen Domäne. Es konnte allerdings eine Ligation der N-terminalen Domäne von Polymerase κ und YFP unter nativen Cu-freien Bedingungen erreicht werden.

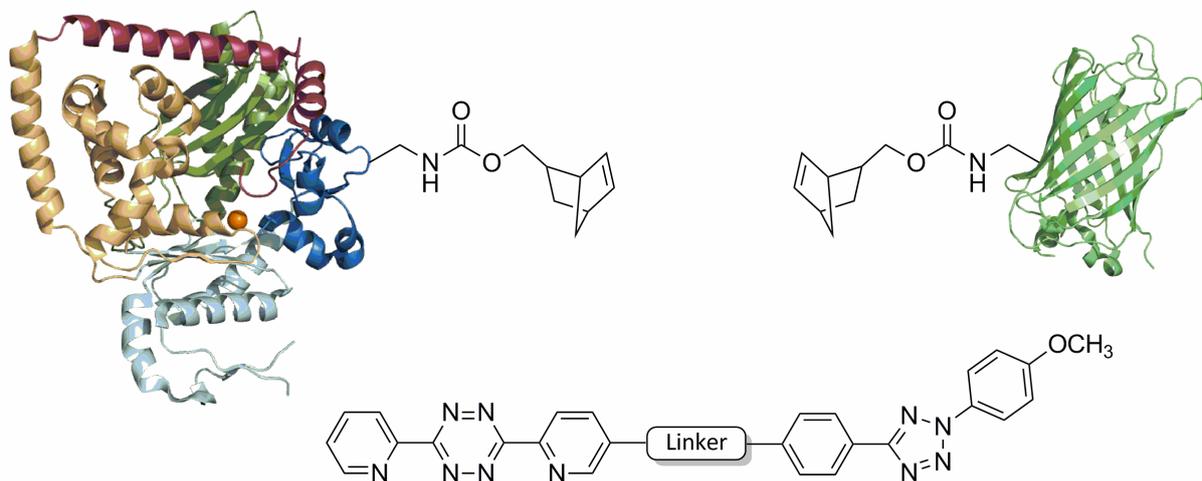


Abbildung 3: Norbornen-modifizierte Polymerase κ (19 – 526) und eYFP sowie der verwendete bifunktionale Linker, welche kupferfrei in einer Click-Reaktion eingesetzt wurden.

Die Analytik der Proteinmodifikationen erfolgte mittels Massenspektrometrie auf einem LTQ-Orbitrap XL-System mit einer Ultimate 3000 Nano-HPLC-Anlage. Es wurde eine Vielzahl von Optimierungen und Installationen von neuen Komponenten durchgeführt, die es ermöglichten akkurate Proteommessungen durchzuführen, massengenaue Analysen von trypsin-verdauten Einzelproteinen, sowie Molekularpeakmessungen von Vollängenproteinen. Die eingebrachten Veränderungen führten zu qualitativ hochwertigen Ergebnissen im Bereich der Reproduzierbarkeit, Robustheit, Trennleistung, Ionisierung und Sensitivität des Systems.



2 Summary

Our DNA is daily exposed to damaging agents that create lesions, which are competently addressed by DNA repair systems. Translesion synthesis (TLS), the lesion-readover by specialized TLS DNA polymerases, constitutes an alternative to cell cycle arrest or cell death (apoptosis) in case of the failure of DNA repair. Humans possess four TLS polymerases (η , ι , κ and ζ) which act either alone or in different combinations, dependent on the class of damage. Here, the bulky adducts are of special interest, because of the severe distortions and mutations they cause in DNA.

The most prominent TLS polymerases for this purpose are Pol η , ι , and κ . The structure of polymerase η and AAF-damaged DNA was solved by Dr. S. Schneider and Dr. S. Schorr (PDB code 2XGQ).

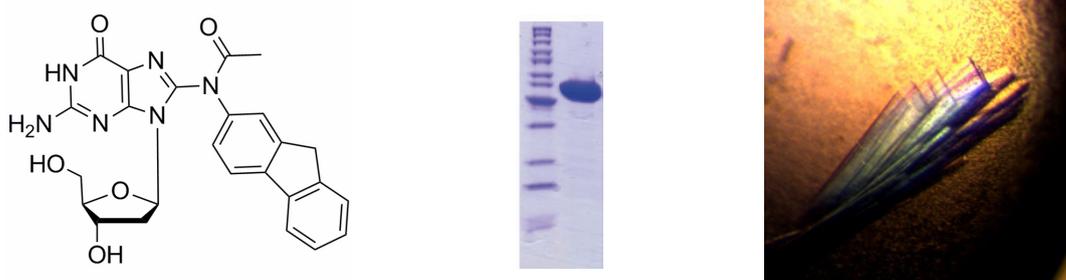


Figure 1: Steps on the way to a crystal structure of a DNA polymerase: DNA lesion (acetylaminofluorene, AAF (7), left); pure protein (SDS-gel of human polymerase κ , middle); crystals of human polymerase κ (right).

During this thesis polymerase κ and ι were cloned and expressed in truncated forms. After their purification a high yield of about 50 mg of polymerase κ and 20 mg Polymerase ι could be obtained per liter cell culture medium. The crystallization of human polymerase κ yielded homogeneous crystals, which could be optimized by microseeding. Due to insufficient diffraction, the structure of Pol κ could, however, not be solved. The crystallization conditions are excellent starting points for further studies.

Human polymerase ι was used in first crystallization trials, which will serve as a basis for following experiments.

Various inhibitors of Y-family DNA polymerases were tested regarding their activity against polymerase η , ι , and κ . The inhibitors can also yield data linked with the insertion preferences of DNA polymerases. In addition they were used to stabilize DNA polymerases in their crystal lattice.

Five inhibitors were tested (derivatives of 3-*O*-methylfunicone (Rapicone **26**, 3-*O*-MEF **27**), β -sitosteryl-(6'-*O*-lineoyl)-glucosid (SLG, CLG **29**, CG **30**) and penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG, **31**)). SLG and 3-*O*-MEF represent derivatives of known inhibitors, which should be optimized for cost efficient synthesis without a loss of activity. All inhibitors were optimized and synthesized by Michael Ehrlich.

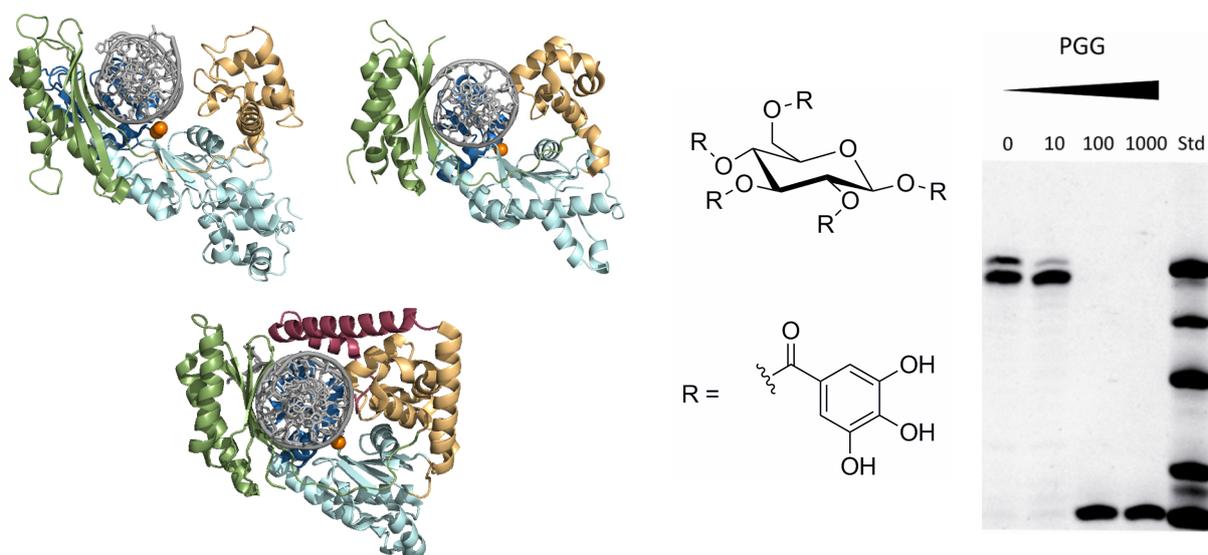


Figure 2: Components used in primer extension inhibitor studies; Y-family DNA polymerases η , ι und κ (left); PGG (**31**) as an example for a polymerase inhibitor (middle); denaturing polyacrylamide gel of a primer extension inhibitor study.

The tests showed that PGG and SLG did potently inhibit translesion synthesis polymerases. The derivatization of the steroid residue of β -sitosterol to cholesterol showed no loss of activity, but the new compound was available at substantially lower costs. In contrast, it got clear that the side chain of rapicone is crucial for its activity, since the catalytic function of the DNA polymerase was influenced only to a small extent.

In a second project a methodology for site-specific labelling of DNA polymerases with functional groups, especially fluorophores was developed. For this purpose the pyrrolysine system was used in combination with the amber suppression technique. A norbornene derivative was chosen as the bioorthogonal reactive group which was successfully employed in three different reaction types. The advantage of norbornene is its ability to react without the need of a copper catalyst.

Additionally, a linker which allows the position specific linkage of two proteins was developed. As proof of principle two units of polymerase κ were fused. A following construction of full length polymerase κ from two truncated segments failed due to

insolubility of the C-terminal domain. However a fusion of N-terminal polymerase κ and eYFP was achieved under copper free conditions.

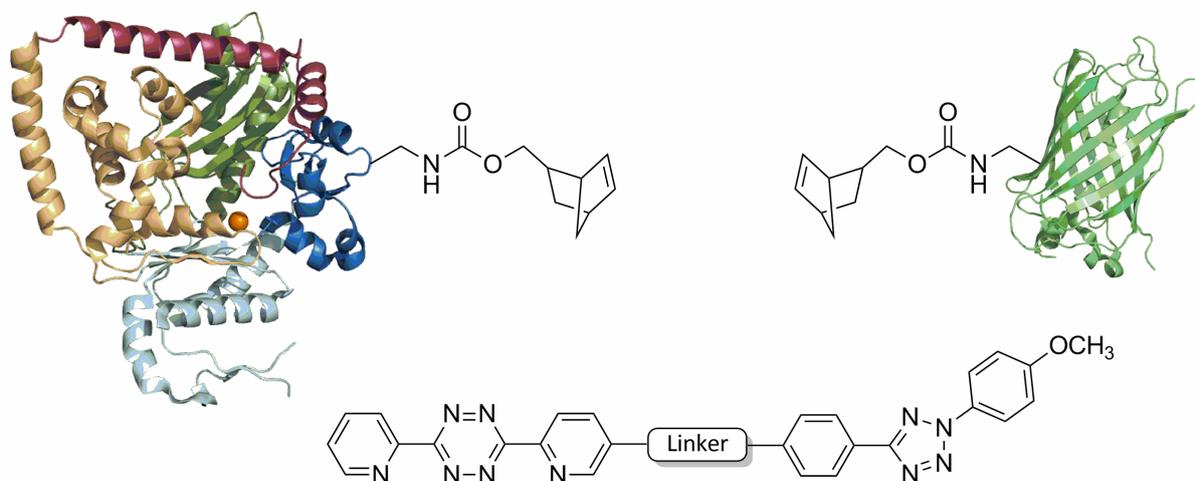


Figure 3: Norbornene-modified polymerase κ (19 – 526), eYFP, and the applied bifunctional linker.

The analysis of protein modification was performed by mass spectrometry on a LTQ Orbitrap XL system with an Ultimate 3000 Nano-HPLC system. A multitude of optimizations and installations of new components were achieved, which enable accurate proteome measurements, precise mass analysis of trypsin-digested peptides, and molecular peak measurements of intact proteins. The introduced changes led to high qualitative results. The obtained data showed a high reproducibility and robustness. The separation capabilities, ionization, and sensitivity were optimized.



3 Einleitung

3.1 DNA-Reparatur

3.1.1 DNA-Schädigung

Unser Erbgut ist täglich schädigenden Einflüssen ausgesetzt, sowohl durch reaktive Nebenprodukte aus Katabolismus und Metabolismus, als auch durch externe DNA-schädigende Agenzien. Dies führt zu etwa $10^4 - 10^6$ DNA-Schäden pro Zelle pro Tag im menschlichen Körper.^[1] Um dieser Gefahr potentiell mutagener DNA-Veränderungen Herr zu werden, verfügt unser Körper über verschiedene DNA-Reparatur- und DNA-Schadens-Toleranzsysteme, welche auf verschiedenen Ebenen des Zellzyklus' aktiv sind.^[2-3]

In Zellen, in denen die DNA stark geschädigt wurde, kann der Zellzyklus unterbrochen werden. Dabei kann je nach Situation entweder die DNA-Reparatur initiiert, Systeme zur Schadenstoleranz (TLS-Systeme) rekrutiert, die Mutation akzeptiert oder die Apoptose eingeleitet werden (siehe Abbildung 4).^[4-5]

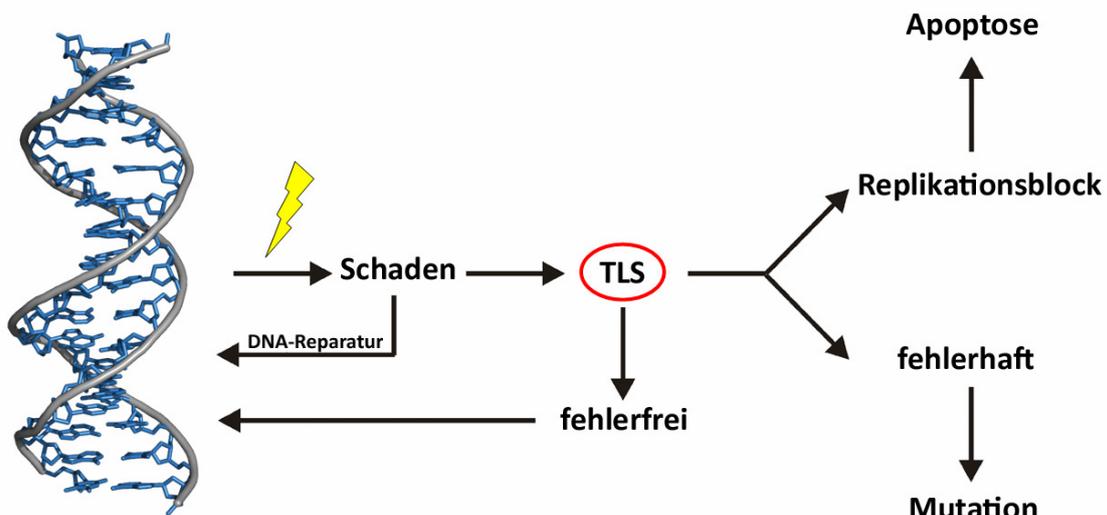


Abbildung 4: Flussdiagramm über die DNA-Reparatur (B-DNA PDB-Code: 3BSE).

3.1.2 Klassen von DNA-Schäden

3.1.2.1 UV-Schäden

UV-Schäden entstehen durch die von kurzwelligem Licht katalysierten Reaktionen von benachbarten Pyrimidinbasen. Adenosin-Basen zeigen ebenso UV-Photoreaktivität,

allerdings soll auf diese hier nicht im Detail eingegangen werden.^[6] Typischerweise bilden sich bevorzugt Cyklobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs 80 – 90%, **1**) und 6-4 Pyrimidinpyrimidon-Photoprodukte (6-4 PPs, 10 – 20%, **2**). Letztere können weiter zum Dewar-Isomer (**3**) umgesetzt werden. Grundsätzlich verhindern UV-Schäden auf Grund der starken Strukturänderung die Replikation durch B-Familie-DNA-Polymerasen. Für die Erkennung von UV-Schäden wird dieser Umstand genutzt. Die durch die gestörte Basenstapelung entstehende intrinsische Flexibilität der Schadstellen ist ein deutliches Unterscheidungsmerkmal für die Schadenserkenung.^[7] Die Reparatur erfolgt in humanen Zellen über Nukleotidexzisionsreparatur. In vielen Organismen ermöglichen DNA-Photolyasen eine direkte Korrektur der Fehlbase.^[8-10] Eine gute Zusammenfassung bietet der Übersichtsartikel von Heil *et al.*^[6]

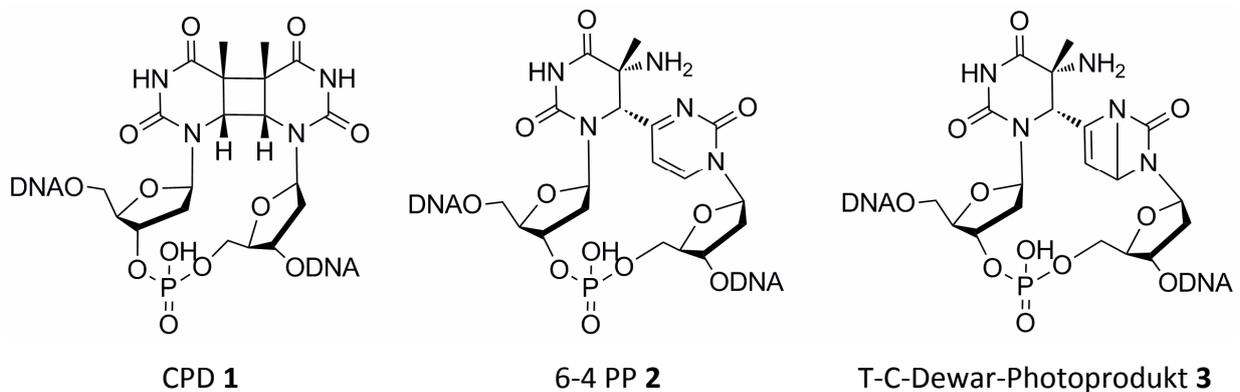


Abbildung 5: Übersicht von häufig auftretenden Photoschäden.

3.1.2.2 Sperrige Addukte

Sperrige Addukte entstehen aus unerwünschten Produkten der Entgiftungssysteme des menschlichen Körpers. Stark hydrophobe Substanzen werden bei dem Versuch, sie besser löslich zu machen und so ausscheiden zu können, in der Leber durch Cytochrom P450-Enzyme oxidiert. Dies führt allerdings zu einer reaktiven Aktivierung von Polyaromaten wie z. B. Benzpyrenen (BP, **4**) durch Epoxidierung (**5**), die es ihnen erlaubt, kovalent an nukleophile Stellen der DNA zu binden (**6**). Bei dieser Form von DNA-Schäden kann eine Relation zwischen der Exposition einer Person durch polyaromatische Kohlenwasserstoffe und der Menge an entstandenen sperrigen Addukten hergestellt werden. Speziell wurde dies auch im Falle von Zigarettenrauch bewiesen.^[11]

Die sperrigen Addukte, die meist aus großen Ringsystemen bestehen, führen zu einer Blockade der replikativen Polymerasen, wobei es bei manchen Schäden (z. B. dem

Acetylaminofluoren (AAF, 7)) zu einem Herausklappen der Base kommen kann, wobei das Addukt in das lipophile Zentrum der DNA klappt und somit die Baseninformation nicht dekodiert werden kann.^[12-13] Auch diese, die DNA-Struktur stark beeinflussenden Schäden, werden vom Nukleotidexzisionsreparatursystem (NER-System) erkannt und repariert.^[14]

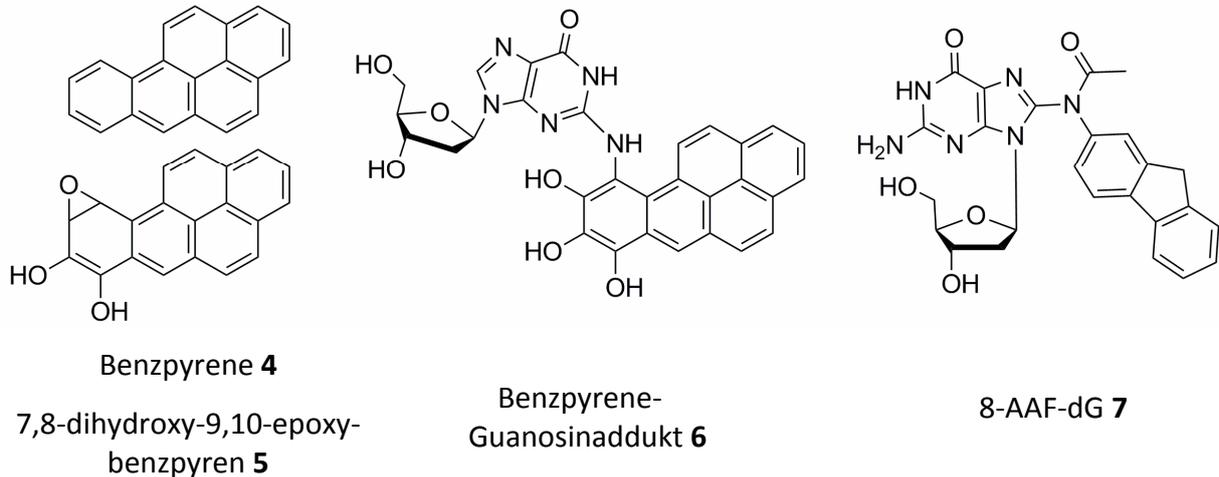
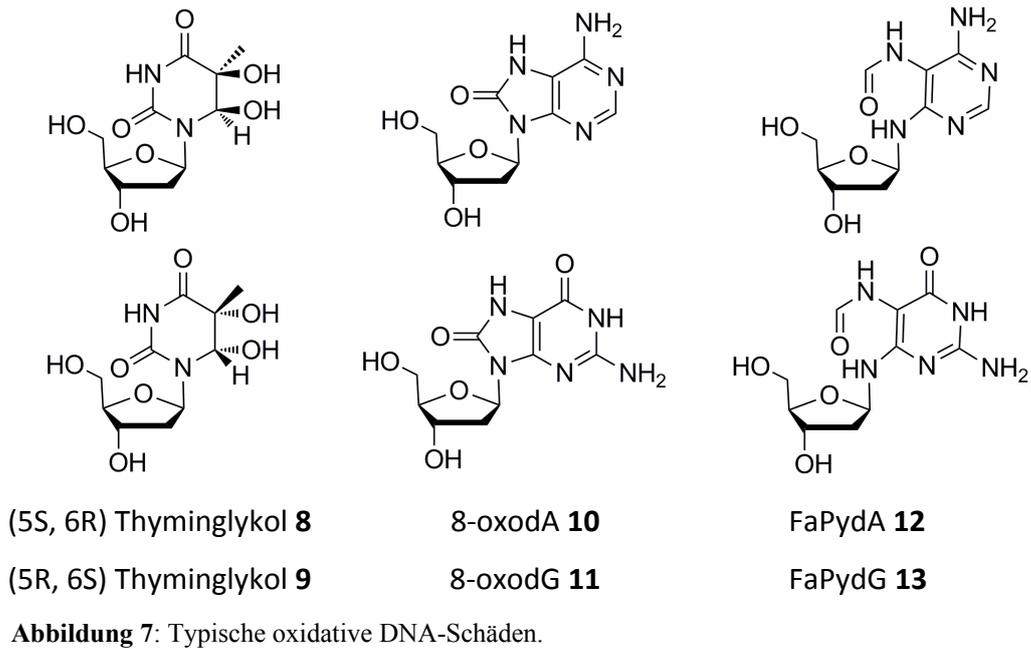


Abbildung 6: Übersicht von sperrigen Addukten und resultierenden DNA-Schäden.

3.1.2.3 Oxidative Schäden

Oxidative Schäden sind durch die Verwendung von Sauerstoff in aeroben Organismen unvermeidbar. Freie Radikale entstehen in vielen Stoffwechselwegen. Eine gute Zusammenfassung bietet der Übersichtsartikel von Cadenas.^[15] Typische Radikale sind $O_2^{\cdot-}$, welche z. B. durch Reduktionsequivalente der Cytochrom-Oxidasen generiert werden. Diese werden im Körper durch Superoxid-Dismutasen in Wasserstoffperoxid umgesetzt und dieses wird durch Katalasen und Peroxidasen abgebaut. H_2O_2 , welches diesem Zyklus entkommt, kann besonders in Gegenwart von reduzierten Metallionen (besonders Fe^{2+} und Cu^+) zu Hydroxylradikalen ($\cdot OH$) reagieren, welche ein typischer Ausgangspunkt für oxidative Schäden wie Thyminglykol (**8**, **9**), 8-Oxo-A (**10**) bzw. 8-Oxo-G (**11**) oder Formamidopyrimidine (FaPyA (**12**) bzw. FaPyG (**13**)) sind.^[16-19] Auf Grund ihrer Flexibilität haben FaPy- und 8-oxo-DNA-Schäden ein starkes Potential zur Mutagenese.^[20] Thyminglykol besitzt zwei chirale Kohlenstoffe, daher können sich zwei Diastereomerenpaare bilden. In wässriger Lösung bilden sich die *cis*-Stereoisomere (5S, 6R (**8**) und 5R, 6S (**9**)) bevorzugt.^[21]



3.1.2.4 Cisplatin-induzierte-DNA-Schäden

Cisplatin-Addukte sind im Normalfall erwünschte Schädigungen von DNA, die in der Krebstherapie durch das Cytostatikum Cisplatin erzeugt werden. Allerdings sind diese Cytostatika meist grundsätzlich unspezifisch und wirken nur durch die erhöhte Proliferationsrate von Karzinomen bevorzugt auf Krebszellen.

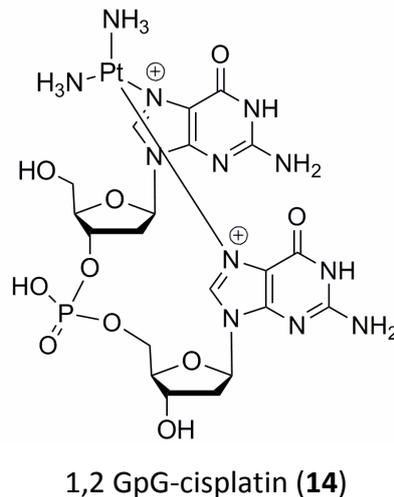


Abbildung 8: 1,2-GpG-cisplatin-DNA-Addukt.

Die Applikation der Substanzen erfolgt als inaktive Chlorid-Form $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$. Durch die hohe Konzentration an Chlorid-Ionen im Blutstrom (etwa 100 mM) bleibt dieser Komplex intakt. Erst wenn der neutrale Cisplatin-Komplex die Zellwand passiert, erfolgt durch die im

Cytoplasma deutlich geringere Cl^- -Konzentration (etwa 10 mM) die Hydrolyse zur aktiven Form $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Diese reaktive Form hat ein Potpourri an Zielen: DNA, RNA und andere Nukleophile.

Die Koordinierung an DNA erfolgt meist über die N7-Position von Guanin-Basen, was zu 1,2-GpG-Cisplatin-Addukten (14), 1,3-GpTpG-Cisplatinaddukten oder Interstrang-Quervernetzungen führen kann, welche eine starke Blockade für den Transkriptionsapparat darstellen.^[22]

3.1.3 DNA-Reparatursysteme

Grundsätzlich lässt sich die DNA-Reparatur in die Systeme der direkten DNA-Reparatur, der Basenexzisionsreparatur (BER), der Nukleotidexzisionsreparatur (NER), der Doppelstrangbruchreparatur und der DNA-Quervernetzungsreparatur gliedern.

In der direkten DNA-Reparatur wird die geschädigte Base direkt repariert. Es entsteht ein ungeschädigter DNA-Strang. Dieser Weg wird durch Enzyme wie z. B. die 6-4-Photoproduktlyase, die Sporenphotoproduktlyase, die DNA-Photolyase oder die O^6 -Methylguanine-DNA-Methyltransferase beschriftet.^[23-24]

Die weiteren Reparatursysteme adressieren verschiedene Klassen von DNA-Schäden oder -Veränderungen: UV-Schäden, oxidative Schäden, sperrige Addukte, cisplatin-Schäden, Apurin- bzw. Apyrimidin-Positionen (AP-Positionen), Quervernetzungen von DNA-DNA oder DNA-Protein, Strangbrüche oder Fehlpaarung von Basen.

3.1.3.1 Basenexzisionsreparatur

Kleinere DNA-Schäden werden durch das Basenexzisionsreparatursystem (BER) entfernt. Nach der direkten DNA-Reparatur ist auch die BER ein schadensspezifischer Reparaturweg. Die Reparatur geschieht in mehreren Stufen (Abbildung 9): Zunächst schneidet eine schadensspezifische DNA-Glykosylase (Schritt 1) die glykosidische Bindung zwischen geschädigter Base und dem Zucker. Nachfolgend wird das Phosphatrückgrat in 5'-Position des basenfreien Zuckers (AP) durch eine AP-Lyase eingeschnitten (Schritt 2). Nun kann die Schadstelle entweder durch ein langes DNA-Stück ausgetauscht werden (Pfad 3a – 5a) oder die AP-Stelle wird direkt ersetzt (Pfad 3b, 4b). In der ersten Variante verdrängt eine DNA-Polymerase den geschädigten Strang (Schritt 3a). Der überstehende DNA-Strang wird dann von einer Endonuklease entfernt (Schritt 4a) und die Lücke wird durch eine DNA-Ligase

geschlossen (Schritt 5a). Im zweiten Pfad wird die AP-Stelle mittels einer 5'dRP-Lyase ausgeschnitten (Schritt 3b). Im Folgenden wird von einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase der Strang wieder geschlossen (Schritt 5b).^[2]

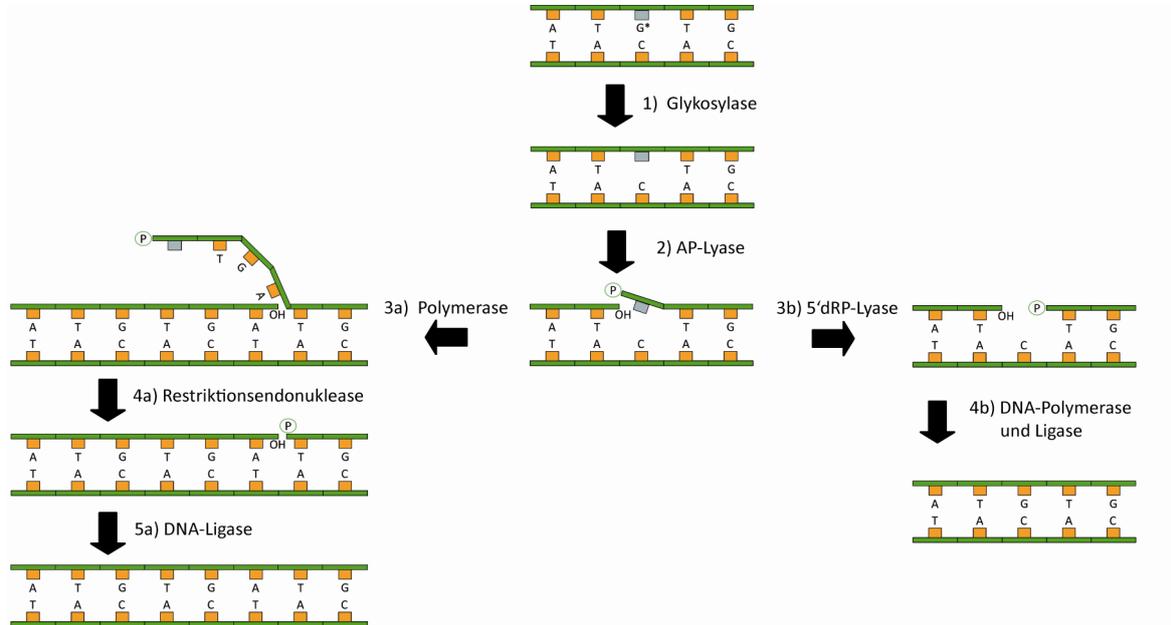


Abbildung 9: Ablauf der BER durch Ausschneiden eines langen DNA-Stückes (linker Pfad) oder einer Einzelbase (rechter Pfad).

3.1.3.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt den Schaden durch einen Einschnitt in das Phosphodiesterückgrat. Dieser erfolgt etwa 20 – 25 DNA-Basen vor und 3 – 8 DNA-Basen hinter dem Schaden. NER läuft in mehreren Stufen ab (Abbildung 10). Nach dem Entstehen eines DNA-Schadens (Schritt 1) übernehmen am Beginn der Reparatur entweder ein Komplex aus XPC-hHR23B (*Xeroderma pigmentosum* Faktor C – humanes Homolog RAD23B) und/oder DDB1-XPE (*UV light-damaged DNA-binding protein* (UV-DDB) - *Xeroderma pigmentosum* Faktor E) die erste Schadenserkenkung (Schritt 2).^[25] XPC-hHR23B vermittelt anschließend die Rekrutierung von TFIIH (Transkriptionsfaktor II H) (Schritt 3). Dies ermöglicht in Kombination mit XPA (*Xeroderma pigmentosum* Faktor A) und RPA (Replikationsprotein A) die ATP-abhängige Öffnung der DNA. So wird eine Reparaturblase erzeugt (Schritt 4). Eine zusätzliche Erweiterung dieser Blase erlaubt die Rekrutierung des Restriktionskomplexes bestehend aus XPF-ERCC1 (*Xeroderma pigmentosum* Faktor F - *Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) und XPG (*Xeroderma pigmentosum* Faktor G) (Schritt

5). Nun erfolgt das Schneiden der DNA wie oben beschrieben. Die so entstandene Lücke wird durch DNA-Polymerase ϵ zusammen mit den Co-Faktoren RFC (Replikationsfaktor C) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) aufgefüllt (Schritt 6). Abschließend repariert DNA-Ligase I das Phosphatrückgrat (Schritt 7).^[5, 26] Eine gute Zusammenfassung zu diesem Thema gibt der Übersichtsartikel von Compe und Egly.^[27]

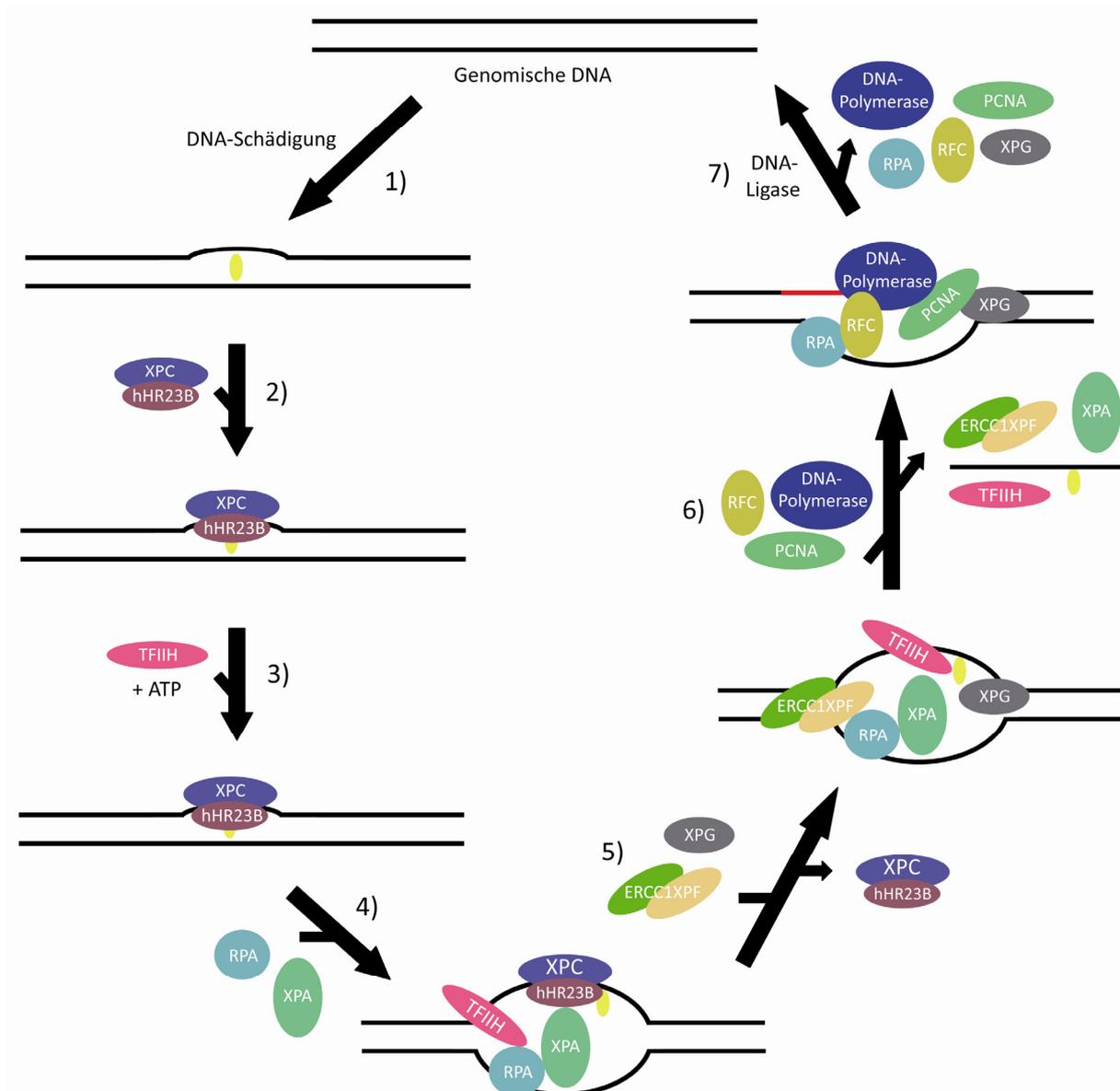


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Nucleotidexzisionsreparatur.

3.1.4 Schadens-Toleranz-Systeme

In Situationen extremer DNA-Schädigung können die klassischen Reparatursysteme nicht alle DNA-Veränderungen vor dem Start der Replikation beseitigen.^[28] Daher kann es passieren, dass die DNA-Polymerasen ϵ und δ entweder fehlerhafte Basen inkorporieren oder, dass sie blockiert werden. In Fällen einer Blockade werden TLS-Polymerasen rekrutiert.

Die Regulation von TLS ist in mehrere Ebenen gegliedert und ein Gebiet andauernder Diskussion. Diese erste Möglichkeit hierfür ist die Transkription. In *E.coli* ist bekannt, dass dies ein entscheidender Regulationspunkt der TLS ist.^[29] In Eukaryoten wird dieser Stufe keine zentrale Bedeutung zugemessen.^[30] Eine Ausnahme in *S. cerevisiae* bildet Rev1 in Hefe, welches in der G2-Phase etwa 50-fach stärker exprimiert wird.^[31] Rev1 wird eine Rolle als Vermittler in der Interaktion von Proteinnetzwerken (besonders Phosphoproteine) über die BRCT-Domäne zugesprochen, im Speziellen in der Regulation des Zellzyklus' und der Reaktion auf DNA-Schädigung.^[30, 32] Zusätzlich wurde gezeigt, dass bei Polymerase η eine Anreicherung an bestimmten Stellen im Zellkern (*subnuclear focus formation*) stattfindet, wofür deren C-terminale Motive essentiell sind.^[33] Die Verweildauer von Polymerase η und anderen TLS-Polymerasen an diesen - auch Replikationsfabrik genannten - foci ist im Besonderen durch Ubiquitinierung reguliert. Allerdings konnte nicht bewiesen werden, dass die Lokalisation von Polymerase η essentiell für deren Aktivität in der TLS ist.^[34] Dies würde im Menschen - im Gegensatz zum transkriptionsregulierten Ansatz von *E.coli*. - eine erste Stufe der Regulation darstellen, welche die Polymerasen in räumliche Nähe der blockierten Replikationsblasen bringt.

Es ist akzeptiert, dass die Monoubiquitinierung von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) einen zentralen Faktor in der Bindung zwischen PCNA und der TLS-Polymerase darstellt.^[35] Die Modifikationsstelle K164 der PCNA ist Ziel verschiedener Modifikationen (besonders Monoubiquitinierung), was als ein Regulationssignal für verschiedene Funktionen gesehen wird.^[36] Es wird vermutet, dass Rad18 (E3 Ubiquitin-Ligase) und Rad6 (E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym) in Kombination mit anderen Proteinen hierfür verantwortlich sind.^[37-38] Wenn ein Replikationsblock auftritt wird einzelsträngige DNA (ssDNA) freigelegt. Studien haben ergeben, dass ssDNA in Kombination mit RPA die Aktivität von Rad18 stimulieren.^[39] Dies erhöht die Möglichkeit des Überlesens eines DNA-Schadens durch eine TLS-Polymerase, da diese auf Grund von Ubiquitin-Bindungsmotiven und/oder Ubiquitin-Zinkfingern eine erhöhte Affinität für monoubiquitiniertes PCNA besitzen.^[40-42] Der Mechanismus hierfür ist noch unklar, es wird allerdings vermutet, dass dieser Teil der TLS durch einfache Enzymkinetik bestimmt wird. Das heißt, die Polymerase,

die den Schaden am besten im aktiven Zentrum aufnehmen und überlesen kann, wird mit höchster Wahrscheinlichkeit die Insertion durchführen.^[30] Dies muss in Kombination mit der Verweildauer der Polymerasen an Replikationsfabriken, welche von der Affinität zu Monoubiquitinierungsmotiven abhängt, betrachtet werden.

Ein weiterer kontroverser Punkt ist der Zeitpunkt der TLS-Aktivität. Es wurde angenommen, dass TLS nur an blockierten Replikationsblasen stattfindet, was der S-Phase entsprechen würde.^[30] Allerdings belegen Studien, dass Replikationslücken auftreten, nachdem der Großteil der DNA bereits repliziert wurde und, dass TLS-involvierte Proteine auch in der G2 aktiv sind.^[43-45] Dies deutet darauf hin, dass auch nach dem Replizieren der genomischen DNA-Schadensinseln verzögert durch TLS abgehandelt werden.^[4]

Zusätzlich ist noch die posttranslationelle Modifikation von TLS-Polymerasen interessant. Es wird darüber spekuliert, welchen Einfluss sowohl Ubiquitinierung, Phosphorylierung oder Sumoylierung auf den Prozess haben.^[40, 46-49] Es konnte gezeigt werden, dass eine Ubiquitinierung von Polymerase η die Affinität zu PCNA reduziert.^[48, 50] Weiterhin wird in Fällen von DNA-Schädigung der Ubiquitinierungsgrad von Polymerase η reduziert.^[47, 51] Somit ist die Regulation von TLS-Polymerasen ein Gegenstand aktueller Forschung, der besonders auch die posttranslationale Modifikation der Polymerasen betrifft.

Für einen detaillierten Überblick ist die Arbeit von Hoege *et al.* und Sale *et al.* zu empfehlen.^[30, 37]

Im Menschen existieren vier Polymerasen der Y-Familie (η , ι , κ , Rev1). Außerdem nimmt auch die B-Familien-Polymerase ζ an TLS-Aktionen teil. Der Ablauf von TLS lässt sich unterteilen in der Rekrutierung der Polymerase zur Baseninsertion gegenüber der geschädigten Base und der Strangverlängerung, welche nach einem Wechsel der Polymerase von einem anderen Enzym katalysiert wird. Dieser Zwei-Polymerasen-Mechanismus ist typisch für die TLS-Reaktion.^[52-53]

Strukturell unterscheiden sich DNA-Polymerasen der Y-Familie von replikativen Polymerasen besonders in der deutlich offeneren Struktur des aktiven Zentrums und im Fehlen einer 3'-5'-Exonuklease-Domäne. Insgesamt besitzen die TLS-Polymerasen im Vergleich zu replikativen Polymerasen eine deutlich schlechtere Genauigkeit ($10^{-1} - 10^{-4}$ bzw. $10^{-5} - 10^{-6}$).

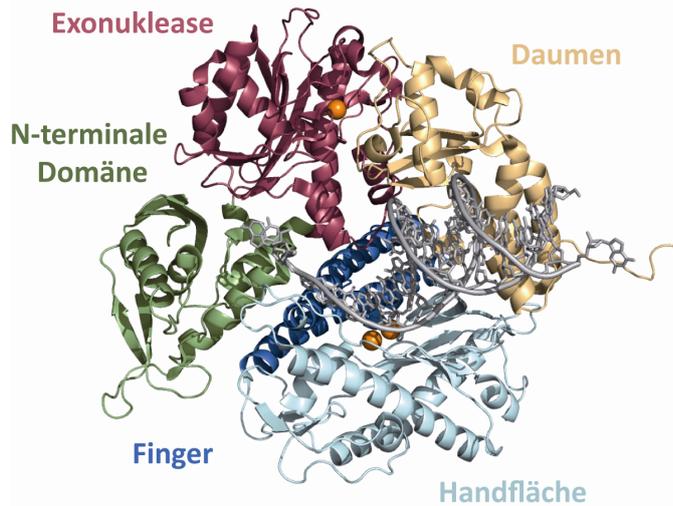


Abbildung 11: Replikationspolymerase der α -Familie im Komplex mit ungeschädigter DNA (1IG9).

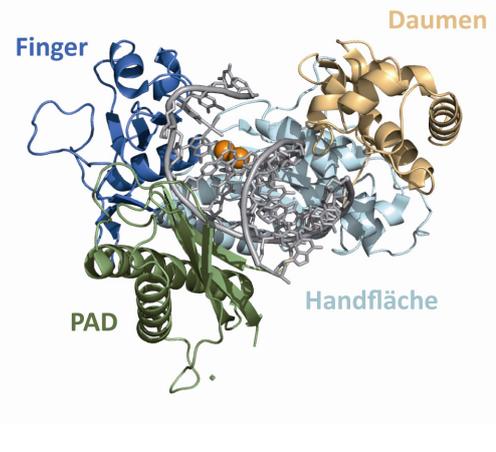


Abbildung 12: TLS-Polymerase η (1 – 513) im Komplex mit 1,2-GpG-Cisplatin (2WTF).

Zusätzlich besitzen sie eine PAD (Polymerase assoziierte Domäne) - auch kleine-Finger-Domäne genannt - welche zusätzliche Interaktionen mit dem stromaufwärts liegenden DNA-Duplex eingeht.^[54-55] Ebenso arbeiten die Y-Familie-DNA-Polymerasen nicht nach dem *induced-fit-fidelity* Mechanismus, was auch eine höhere Toleranz für das Aufnehmen von DNA-Schäden in das aktive Zentrum ermöglicht. Dabei unterliegt die Basenunterscheidung einzig der korrekten Wasserstoffbrückenpaarung. Dies wurde durch thermodynamische und kinetische Studien bewiesen, die gezeigt haben, dass der Unterschied in der freien Energie der Bindung der korrekten bzw. fehlpaarenden Base nur in der Größenordnung einer Basenpaarung liegt.^[56-57]

3.1.4.1 TLS-Polymerasen

Die TLS-Polymerasen lassen sich in die Gruppen der Baseninsertion (Polymerase η , ι) und Strangverlängerung (Polymerase ζ) unterteilen. Zusätzlich nehmen die Polymerasen κ und Rev1 Sonderrollen ein: Polymerase κ , da sie situationsabhängig entweder in der Insertion oder in der Strangverlängerung agieren kann. Rev1 kann auch in der Insertion partizipieren, hierbei wird immer dCTP eingebaut. Allerdings zeichnet sich Rev1 besonders durch die Rolle des Vermittlers zwischen Baseninsertion und -verlängerung aus.^[58]

Diese Aufgabe wird auch in den Strukturmotiven der TLS-Polymerasen sichtbar, die in Abbildung 13 gezeigt ist. Es ist zu erkennen, dass Polymerase η , ι und κ über ein

Bindungsmotiv mit Rev1 interagieren können. Zusätzlich zeigt Rev1 die BRCT-Domäne (*breast cancer susceptibility protein1 C-terminal domain*), welche als Interaktionspartner von Rev7 (Untereinheit der Polymerase ζ) und PCNA dient.

Als gemeinsames Motiv verfügen alle Mitglieder dieser Familie über eine ähnliche katalytische Domäne (Polymerasedomäne). Als Besonderheit besitzt Polymerase κ eine zusätzliche Klammer-Domäne am N-Terminus, diese soll später im Detail gezeigt werden. Für die Interaktion mit PCNA sind jeweils Struktur motive vorhanden. Diese befinden sich bei Rev1 integriert in der BRCT-Domäne. Zusätzlich besitzen Rev1 und Polymerase ι zusätzliche Ubiquitin-Bindungsmotive, wogegen Polymerase η und κ ubiquitin-bindende Zinkfinger besitzen, wodurch diese ebenso eine erhöhte Affinität zu einem ubiquitinierten PCNA erhalten.

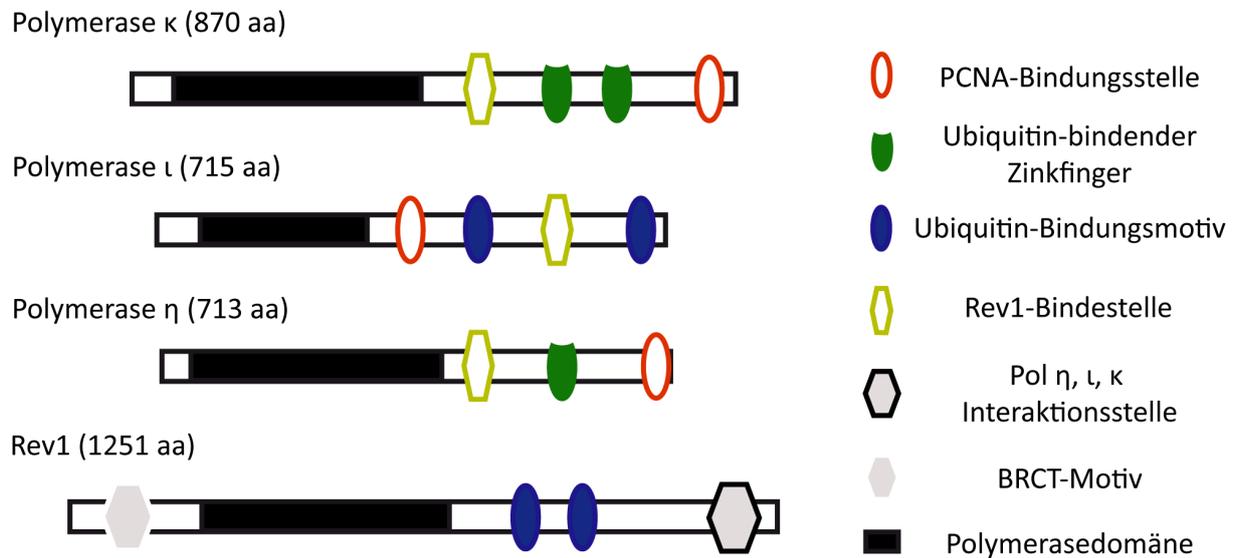


Abbildung 13: Schemazeichnung der Sequenzmotive von TLS-DNA-Polymerasen, nach Walker.^[59]

Die einzelnen TLS-Polymerasen adressieren ein Spektrum an Schäden und haben spezifische Aufgaben. Eine Teilübersicht ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Synthesefähigkeiten von humanen DNA-Polymerasen

	Polymerase η	Polymerase κ	Polymerase ι
cis-Pt 5'-G	dC, dA ^[53]	dC, dA ^[53]	?
cis-Pt 3'-G	dC ^[53]	dC ^[53]	?
cis-Pt 3'-Verlängerung	nein (Pol ζ) ^[53]	ja ^[53]	?
CPD 5'-T	dA ^[53, 60]	dT, dA ^[52, 61-62]	dG, dT ^[63-64]
CPD 3'-T	dA ^[53, 60]	Block ^[52, 61]	dA, dG ^[63-64]
CPD 3'-Verlängerung	ja ^[53]	ja ^[61]	ja ^[64]
8-oxoG	dC ^[65]	dA, dC ^[66]	dC ^[65]
5'-Thyminglykol	dA ^[67]	dA, dG ^[68]	dT, dG ^[69]
3'-Thyminglykol	dA ^[67]	dA, dG ^[68]	dT, dG ^[69]
8-AAF-G	dC ^[70]	dC, dA, dG ^[70-71]	?
8-AF-G	dC ^[70]	dC, dA ^[70]	?
dG-Benzpyren	dC, dA ^[69, 72]	dC, dA ^[69, 73]	dG, dA ^[69]

3.1.4.2 DNA-Polymerase η

Polymerase η ist spezialisiert auf Photoschäden (CPD, T6-4T oder T6-4C) und kann diese fehlerfrei replizieren. Dies ist zum Beispiel am *knock-out* des *Rad30*-Gens (Expressionsprodukt: Polymerase η) in Hefe zu ersehen, der zu einer deutlich erhöhten Mutagenität von CPD-Schäden führt.^[53] Defekte von Polymerase η zeigen sich im Menschen durch Ausbildung einer *Xeroderma pigmentosum*-Variante (XP-V), die sich durch eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht auszeichnet.^[33]

Zusätzlich ist Polymerase η in der Lage, sperrige Addukte zu überlesen. Dies ist mit einer besonders offenen Struktur des aktiven Zentrums zu erklären, welches auch die Aufnahme von größeren Störungen in der DNA-Struktur ermöglicht.^[13] Auf Grund dieser Eigenschaften steht Polymerase η auch im Zusammenhang mit der Resistenzbildung gegen Cisplatin.^[74] In der Carell-Gruppe konnte gezeigt werden, dass nur das 1,3-Addukt ein eindeutiges Blockieren der Polymerasen ermöglicht, während das 1,2 GpG-Cisplatin überlesen werden kann.^[75]

Wie oben erwähnt, zeigt Pol η zwei Kopien des ubiquitin-bindenden Zinkfingers. Dieser wurde zum ersten Mal in Polymerase η gefunden und dient der erhöhten Affinität zu monoubiquitiniertem PCNA und der Rekrutierung anderer Replikationsfaktoren. Im Gegensatz dazu führt eine Ubiquitinierung der Polymerase selbst zum Verlust der

Bindeaffinität zu ubiquitiniertem PCNA. Es wird vermutet, dass dies einen Regulationsmechanismus darstellt, allerdings gibt es noch keine eindeutigen Ergebnisse.^[76]

3.1.4.3 DNA-Polymerase ι

Polymerase ι ist die ungenaueste der Y-Familie-DNA-Polymerasen; dies ist besonders im Falle eines Pyrimidins als Templatbase zu erkennen. Gegenüber einem Adenin inkorporiert Polt sehr exakt ein T ($10^{-4} - 10^{-5}$), beim dCTP-Einbau gegenüber Guanin ist dieser Wert bereits deutlich schlechter (etwa 10^{-2}). Vergleichbare Werte werden im Falle einer dC-Base als Templat erreicht. Der Einbau gegenüber einer Thymin-Base ist sehr ungewöhnlich. Es wird hier im Gegensatz zu der korrekten Paarung mit Adenin die zehnfache Menge an Guanin eingebaut, was zu einer dT-dG-Fehlpaarung führt. Zusätzlich wird die Polymerisation meist durch ein Thymidin in der Templat-Position terminiert.^[77]

Dies wurde zunächst durch eine kleine aktive Tasche erklärt, in der das Templat-Thymidin gegenüber der ankommenden Base in *syn*-Konformation steht.^[78-79] Trotz Zweifeln an den ersten Studien ist die Hoogsteen-Basenpaarung im aktiven Zentrum akzeptiert.^[30, 80] In späteren Studien wurde gezeigt, dass der Fehleinbau von Guanosin gegenüber Tymidin durch eine Benachteiligung der *syn*-Konformation des ankommenden Adenosins zu erklären ist, während das Guanosin in *anti*-Konformation verbleibt und so durch Basenstapelung stabilisiert wird. Ein Hauptgrund ist die räumliche Einschränkung in der Tasche durch die Reste Gln59 und Lys60 in der Finger-Domäne (Abbildung 15).^[81] Diese Reste sind sowohl für ein exaktes Replizieren mit dA als Templat als auch für die sehr schlechte Genauigkeit bei einem dT-Templat verantwortlich. In der gleichen Arbeit wurde ebenso analysiert, warum ein Thymidin-Templat zur Terminierung der Replikation durch Polt führt. Hier kommt es zu einer Stabilisierung einer U-Schleife im Templatstrang, welcher durch Polt und das Thymidin koordiniert wird und die Replikation stoppt.

Polymerase ι ist in der TLS besonders für oxidative Schäden und für sperrige Addukte zuständig. Hierbei wird die Hoogsteen-Basenpaarung als Mechanismus ausgenutzt. Purine in Templat-Position nehmen *syn*-Position ein, wodurch der Schaden (besonders an der N²-Position des Guanins oder der N³-Position des Adenins) aus dem aktiven Zentrum gedreht wird, und so das Überlesen auf Grund verringerter sterischer Einschränkung möglich werden könnte.^[77] Ebenso wird dieser Mechanismus zum Überlesen von 8-oxoG verwendet. Das enge aktive Zentrum zwingt sowohl die Schadbasis als auch das Purin-Nukleotid in eine *syn*-

Konformation, was zu einer Hoogsteen-Fehlpaarung G-A führen kann (Abbildung 15), allerdings die Insertion von dCTP gegenüber 8-oxoG favorisiert.^[82]

Ein zusätzlicher Punkt, der die Einschätzung von Polymerase ι erschwert, ist in Arbeiten der Gruppen um Gening und Woodgate dargelegt. Sie formulieren, dass Polt Mn^{2+} anstatt des üblichen Mg^{2+} als katalytisches Ion verwenden kann. Dies führt zu einem massiv veränderten Inkorporationsverhalten.^[83-84]

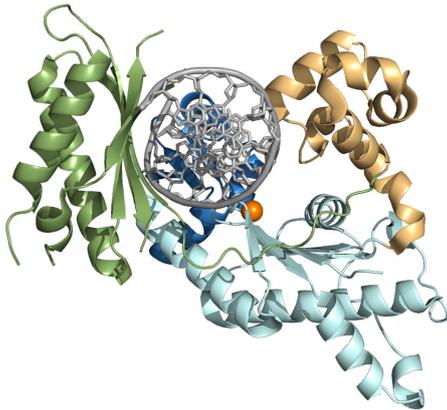


Abbildung 14: Komplex von Polymerase ι mit 8-oxoG geschädigter DNA (PDB-Code 3Q8Q).

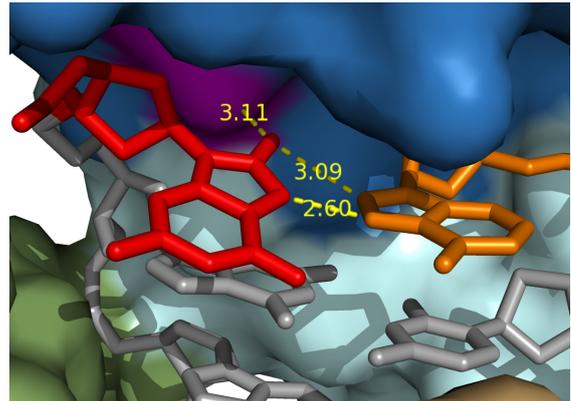


Abbildung 15: Ausschnitt des aktiven Zentrums aus Abbildung 14 (8-oxoG (rot), dA (orange), Gln59 (lila)).

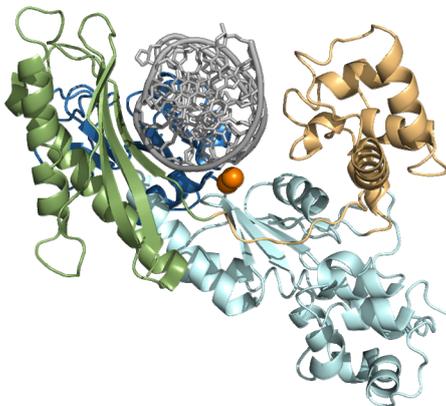


Abbildung 16: Komplex von Polymerase η mit 1,2-GpG-cisplatin geschädigter DNA (PDB-Code: 2WTF).

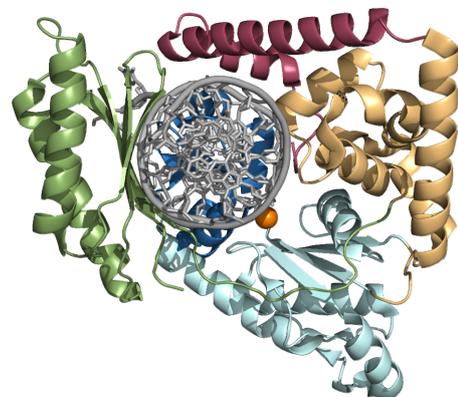


Abbildung 17: Komplex von DNA-Polymerase κ mit ungeschädigter DNA (PDB-Code: 2OH2).

3.1.4.4 DNA-Polymerase κ

Polymerase κ besitzt eine höhere Prozessivität als andere Mitglieder der Y-Familie und erreicht auch die höchste Genauigkeit der Y-Familie-Polymerasen ($10^{-4} - 10^{-5}$).^[85] Strukturell weist Polymerase κ ein Alleinstellungsmerkmal auf - die N-terminale Klammer-Domäne, welche in Abbildung 17 zu sehen ist und die DNA eng einschließt. Im Vergleich dazu bildet

Polymerase η einen deutlich lockereren Komplex aus.^[86] Bei der Bindung von DNA kommt es zu einer massiven Domänenverschiebung, wobei sich die PAD Domäne 50 Å in Richtung der großen Furche bewegt.^[86] Das Enzym kann die Bildung eines -1 *frameshift* katalysieren, was sequenzabhängig durch ein Verrutschen des Templat-Stranges ausgelöst wird, allerdings in geringerem Umfang als bei seinen prokaryotischen Orthologen.^[85, 87]

In Bezug auf TLS-Aktivität zeigt Pol κ ein anderes Verhalten als Polymerase η : Sie kann kein CPD überlesen, dagegen aber große Reste wie z. B. Benzpyren-Addukte am N²-Guanosin.^[88]

Die Frage, weshalb CPD einen Block von Pol κ hervorruft, ist darin begründet, dass sie sowohl die Insertion gegenüber des 5'-desoxy-Thymidins, als auch die Strangverlängerung nach dem 3'-Thymidin übernehmen kann, aber nicht beide Schritte in direkter Folge. Der Block tritt in der Translokation des Stranges zur Insertion des zweiten dATPs auf. Dabei kommt es zu einer Kollision zwischen dem 3'-dT und dem Rest Met135, der in Pol κ weiter in das aktive Zentrum ragt als bei anderen TLS-Polymerasen (PDB-Code: 3PZP).^[61]

Zusätzlich ist auch das AAF - ein typisches sperriges Addukt – von großem Interesse. Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl Polymerase κ als auch ihre prokaryotischen Orthologen diesen Schaden überlesen können.^[89] Auch die humane Variante lieferte interessante Ergebnisse bei sperrigen Addukten.^[14] Außerdem wurde für Dpo4, das Gegenstück zur humanen Polymerase κ aus *Sulphobus solfataricus*, eine Strukturmodellierung dieses Vorgangs berechnet. Dafür wurde die Struktur von Dpo4 im Komplex mit Benzpyren-DNA (PDB-Code 1S0M) als Vorlage herangezogen.^[12, 90]

Allerdings ist der katalytische Mechanismus der humanen Polymerase κ auf Grund ihrer engen Struktur und der zusätzlichen N-terminalen Klammer weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Im Besonderen interessiert wie das Überlesen von sperrigen Addukten bewerkstelligt wird.

In Bezug auf andere Schadensklassen führt eine AP-Stelle zur Inkorporation von dATP, ebenso wie 8-oxo-G, wobei dATP durch Hoogsteen-Basenpaarung fehlkodiert wird (*syn*-Position von 8-oxo-G). Außerdem wurde Polymerase κ als zusätzlicher Strangverlängerer (neben Pol ζ) nach der Insertion durch eine andere TLS-Polymerase erkannt.^[91]

3.1.4.5 DNA-Polymerase ζ

Polymerase ζ ist ein Mitglied der B-DNA-Polymerase-Familie, ist aber auch eng mit den Polymerasen der Y-Familie verknüpft. Die humane Form der Polymerase setzt sich aus einer großen (Rev3 3130 aa) und einer kleineren Untereinheit (Rev7 211aa) zusammen. Rev3 enthält die katalytische Polymerase-Domäne und weitere Zink-Finger. Untypisch für B-

Familie-Polymerasen besitzt Polymerase ζ keine Korrekturleseaktivität und nur geringe Prozessivität (2 – 3 nt). Die bekannteste Aufgabe ist die Rolle des generellen Strangverlängerers in TLS. Hierfür besitzt Pol ζ die Fähigkeit, fehlpaarende Primer sehr gut zu verlängern. Es wurde gezeigt, dass PCNA die Aktivität von Pol ζ stimulieren kann.^[92]

3.1.4.6 Rev1

Rev1 ist als Cytidylat-Transferase klassifiziert, da es gegenüber A und G bevorzugt dCTP einbaut. Ebenso kann Rev1 O⁶-Methylguanosine, AP-Stellen und 8-oxo-G effizient mit dCTP dekodieren. Die Fehlerrate für die Inkorporation von dCTP gegenüber G liegt bei 10^{-3} – 10^{-4} . Rev1 kann auch gegenüber dA, dC und dT dCTP insertieren, allerdings ist dieser Prozess 130 – 500-fach langsamer als der Einbau von dCTP gegenüber dG.^[93]

Rev1 ist eng mit der Aktivität von Polymerase ζ verknüpft. Rev1 wechselwirkt dabei mit Pol ι , Pol κ und Pol η . Es konnte gezeigt werden, dass Pol κ mit Pol ζ um die Bindung von Rev1 konkurrieren. Es zeigt sich aber *in vitro* kein Aktivitätsunterschied für Rev1 und Pol κ in An- oder Abwesenheit physischer Interaktion.^[94] Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, fehlt Rev1 das bei Y-Familie DNA-Polymerasen konservierte PCNA-Bindungsmotiv, allerdings wird vermutet, dass die PCNA-Bindung über ein Motiv in der BRCT-Domäne erfolgt.^[95-96]

3.2 **Proteinmodifikation**

Um die in der TLS vorkommenden komplexen Netzwerke analysieren zu können, wie z. B. die Regulation von PCNA und Polymerase durch Monoubiquitylierung, sind Methoden exakter Proteinmodifikation von großer Hilfe. Diese Techniken ermöglichen es zudem die Mechanismen von DNA-Polymerasen im Detail zu untersuchen. Hierzu ist es notwendig, funktionelle Gruppen (oder Reportergruppen) orthogonal in Proteine einzuführen, damit posttranslationelle Modifikationen oder Markersubstanzen sequenzspezifisch erzeugt werden können.

3.2.1 **Modifikation von Lysinen und Cysteinen**

Die in der Industrie heute noch gängige Standardmethode für die Modifikation von Proteinen (z. B. von Antikörpern) ist die chemische Umsetzung von Lysin-Seitenketten (z. B. mit N-Hydroxysuccinimidester oder Imminothiolan).^[97] Diese Methoden modifizieren aktiv alle

Lysin-Seitenketten. Daher wirken sie unspezifisch was heterogene Produkte erzeugt. Um die Menge an modifizierten Resten zu kontrollieren, müssen die Reaktionsbedingungen sehr exakt gewählt werden.

Eine spezifischere Methode stellt der Angriff von Maleimid-gekuppelten Substanzen durch reduzierte Cys-Reste dar.^[98] Cystein ist speziell an Proteinoberflächen eine selten vertretene Aminosäure, daher kann in vielen Fällen durch eine Austauschmutation an einer lösungsmittlexponierten Stelle eine orthogonale Modifikation ermöglicht werden. Allerdings kann das hierzu zusätzlich eingefügte Cystein auch zu unerwünschten Nebeneffekten führen z. B. Disulfid-Brücken bilden, welche eine unnatürliche Faltung des Proteins zur Folge haben können.

Im Folgenden sollen nun ausnahmslos Methoden vorgestellt werden, die eine positionsspezifische Modifikation erlauben und homogene Produkte erzeugen.

3.2.2 Positionsspezifische Proteinmodifikationsmethoden

Besonders für die Nachahmung von posttranslationalen Modifikationen von Proteinen (z. B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Glykosylierung,...), aber auch für die Veränderung der Eigenschaften von Biopharmaka wie z. B. Löslichkeit, Lokalisation im Körper oder Halbwertszeit ist es von essentieller Bedeutung, exakt definierte homogene Proteinkonjugate zu erzeugen.^[99-101]

3.2.2.1 Tag-basierte-Methoden

Diese Art der Modifikation basiert auf speziellen Sequenzmotiven, die direkt adressiert werden können. Typische Beispiele sind orthogonale Bindungspartner wie Biotin, Polyhistidin, Tetracystein, FLAG- bzw. CLIP-Tag und viele andere. Für einen Überblick ist der Artikel von K. Johnsson zu empfehlen.^[102]

Solche Methoden haben meist den Nachteil, große Modifikationen oder Proteindomänen als Reaktionspartner zu benötigen und meist nicht-kovalente Bindungen einzugehen. Somit können Veränderungen der Bindungseigenschaften oder der Aktivität hervorgerufen werden.

3.2.2.2 Methoden der chemischen Biologie (semi-synthetische-Proteine)

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Techniken haben chemische Modifikationen den Vorteil, in den Endprodukten nur geringe Linker-Regionen zu hinterlassen oder wie die Native-Chemische-Ligation (NCL) rückstandsfrei abzulaufen.^[103]

Eine Erweiterung Letzterer ist die Exprimierte Chemische-Ligation (ECL). Während die NCL zwei synthetische Peptide aus der Festphasenpeptidsynthese verknüpft, hat ein Partner der ECL einen biosynthetischen Ursprung.^[104] Dieses Verfahren basiert auf der Verknüpfung eines Proteins, welches einen C-terminalen Thioesterrest trägt, mit einem N-terminalen Cystein des Partners. Der Thioester kann über das *Splicen* mittels eines integrierten Inteins erfolgen, während der zweite Partner meist durch Peptid-Festphasensynthese (PFPS) erzeugt wird.^[105]

Diese etablierte Methode hat den Vorteil, dass ein Protein und ein synthetisches Peptid verlässlich verknüpft werden können. Die Nachteile dieser Technik liegen im Größenlimit der PFPS und in der Limitierung der Modifikation auf terminale Bereiche des Proteins.

3.2.3 Einbau unnatürlicher Aminosäuren

3.2.3.1 Grundzüge der Translation

In ersten Studien zur Codierung von Proteinsequenzen durch DNA bzw. mRNA wurde festgestellt, dass 64 Codons für die 20 kanonischen Aminosäuren kodierte.^[106] Die ersten Sequenzinformationen wurden durch den Einsatz eines polyU Templates in *E.coli* erhalten, was zur Produktion von Poly-Phe-Peptiden führte.^[107] Durch diese erste und viele Folgestudien konnte 1965 der genetische Code zugeordnet werden.^[108-109] Die nächsten Meilensteine waren Formulierung und Beweis der *wobble*-Hypothese, die eine Variabilität der dritten Codonbase bei der Translation in Proteine vorschlägt. In diesem Zusammenhang haben auch nicht kanonische Basen in der tRNA Einfluss auf die Adressierung des Codons. Hierbei ist die Position 37 der tRNA - die erste Base nach dem Anticodon - die am stärksten modifizierte.^[110-111] Auf Basis der damaligen Ergebnisse formulierte Crick eine weitere Hypothese: den „*frozen accident*“. Beim genetischen Code handele es sich demzufolge um eine nicht mehr veränderbare Codonzuordnung, die nicht mehr evolvierbar sei, da jede Abweichung stark negativer Selektion unterworfen wäre.^[112-113]

3.2.3.2 Natürliche Erweiterungen des genetischen Codes

Heute sind viele Beispiele bekannt, in denen die Codonzuordnung von dem ersten entdeckten Translationsschema abweicht.^[114] Es wurden mehrere Theorien entwickelt, wie sich neue Codon-, tRNA-, aa-RS- und Aminosäure-Kombinationen bilden konnten.^[115-118] Die Entdeckung der 21. Aminosäure Selenocystein (**15**), die durch UGA-Codons kodiert wird und der 22. Aminosäure Pyrrolysin (**16**), welche über das Amber-Stopp-Codon (UAG) inkorporiert wird, geben starke Hinweise darauf, dass eine Erweiterung des genetischen Codes über die evolutionäre Neubelegung eines Codons ablaufen kann.^[119] Selenocystein wird in *E.coli* über eine Modifikation einer mit Serin beladenen Suppressor-tRNA erreicht. Die Unterscheidung zwischen einem UGA-Stopp-Codon und einem Suppressionscodon wird durch Ab- oder Anwesenheit einer *selenocysteine insertion sequence* (SECIS) direkt stromabwärts des UGA-Codons getroffen. In Archaea und Eukaryoten wird Selenocystein ebenfalls nach ähnlichen Mechanismen inkorporiert.^[120] Pyrrolysin dagegen wird direkt durch eine eigene Pyl-aaRS auf eine Suppressor-tRNA übertragen.^[121] Diese steht in direktem Wettstreit mit dem für UAG-codierenden *release factor* (RF). Das Pyrrolysin ist im Vergleich zu Selenocystein weniger weit verbreitet.^[122]

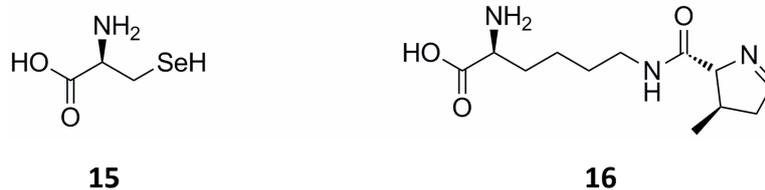


Abbildung 18: Selenocystein (links) und Pyrrolysin (rechts) als Beispiele für die natürliche Erweiterung des genetischen Codes.

3.2.3.3 Künstliche Erweiterung des genetischen Codes

Die ersten Versuche, den Einbau unnatürlicher Aminosäuren künstlich herbeizuführen, wurden allerdings durch den Einsatz von Aminosäureanaloga erreicht oder es wurde eine direkte chemische Modifikation angewandt.

Der erste Ansatz, nicht-kanonische Aminosäuren in Proteine zu integrieren, erfolgte in Pflanzen, welche Aminosäuren einbauen können, die natürlichen Aminosäuren ähnlich sind. Dies konnte durch die Verwendung von auxotrophen Stämmen verbessert werden.^[123]

In-vitro wurde zunächst die chemische Modifikation bereits aminacylierter transfer RNAs (aa-tRNAs) verwandt. Hier wurde Lys-tRNA^{Lys} mit N-Acetoxysuccinimid behandelt. Unter Einsatz eines zellfreien Kaninchen-Retikulozyten-Systems wurden Proteine erhalten, die

anstatt von Lysin ϵ -Acetyl-Lysin enthielten.^[124] Für einen Detailüberblick über die ersten Schritte der Inkorporation von unnatürlichen Aminosäuren ist die Zusammenfassung von Schimmel *et al.* zu empfehlen.^[125]

Eine aktuell vielversprechende *in vitro*-Methode stellen auch die von Suga entwickelten Ribozyme zur „Fehlbeladung“ von tRNAs dar (*flexible in vitro translation system*, FIT).^[126-127]

3.2.3.4 Suppression von Terminationscodons

Die heute am meisten verbreitete *in vivo*-Methode ist der Einsatz orthogonaler tRNA/ aa-RS-Paare. Zentrale Grundlagen zu diesem Thema wurden durch Analysen der Unterschiede in der Erkennung von verwandten tRNAs unter verschiedenen Spezies gelegt. Hierbei wurde deutlich, dass tRNA/ aa-RS-Paare in verschiedenen Spezies auch unterschiedliche Erkennungsmotive besitzen. Daraus entstand die Idee, dass spezies-fremde-tRNAs/ aa-RS-Paare in einen Organismus eingebracht werden können ohne die vorhandene Expression kanonischer Aminosäuren zu beeinflussen. Somit können diese in anderen Organismen verwendet werden, indem nur das Anticodon (z. B. das Amber-Codon) abgewandelt wird, um so eine orthogonale Erkennung zu ermöglichen. Dies ist ein zentrales Konzept für die orthogonale Inkorporation von nicht-kanonischen Aminosäuren durch Suppression.^[128]

Allerdings gibt es einige Faktoren, die für die nicht-kanonische Aminoacylierung einer tRNA beachtet werden müssen. Zunächst darf das Codon nicht für eine natürliche Aminosäure codieren, um heterogene Proteinmischungen zu vermeiden. Das aaRS/tRNA-Paar selbst darf nicht durch eine natürliche Aminosäure adressierbar sein, das heißt, es muss unabhängig vom Rest der kanonischen Aminoacylierung funktionieren. In Detail darf die aaRS keine Reaktion von Aminosäuren mit tRNA katalysieren, außer der der Suppressor-tRNA mit der unnatürlichen Aminosäure. Zusätzlich sollte die zelluläre Aufnahme der zugeführten Aminosäure effizient ablaufen.^[129]

3.2.3.5 Tyrosin-basiertes-System

Die wohl bekannteste verwandte Methode ist das TyrRS/tRNA^{Tyr}_{CAU}-System, welches für *E.coli* von Schulz *et al.* entwickelt wurde.^[130] Die Komponenten wurden aus *Methanococcus jannaschii* isoliert. Durch vorhergehende Studien wurde gezeigt, dass das Anticodon der tRNA^{Tyr} nur eine geringe Rolle in der Erkennung der tRNA spielt.^[131] Daher konnte die Erkennungssequenz der tRNA mit nur geringem Affinitätsverlust für die aaRS in CUA

geändert werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass die veränderte tRNA in geringem Umfang auch durch *E.coli* Tyr-aaRS beladen wird.^[132] Durch ein neu entwickeltes Selektionsverfahren aus abwechselnd positiver und negativer Selektion konnte ein hochspezifisches tRNA-aaRS-Paar geschaffen werden.^[133] Das System ist heute eines der meistgenutzten und dient zum Einbau von verschiedensten unnatürlichen Aminosäuren.^[134]

3.2.3.6 Pyrrolysin-System

Das zweite wichtige System ist direkt an das Pyrrolysin angelehnt. Die ersten Hinweise auf eine 22. Aminosäure zeigten sich durch die Entdeckung, dass die Monomethylamin-Transferase (MtmB) aus dem Archaeobakterium *Methanosarcina barkeri* in seiner kodierenden Sequenz Amber-Codons (TAG) enthielt, welches *in vivo* als Lysin oder Lysinderivat translatiert wird.^[135] Dies wurde durch kristallographische und chemische Studien bewiesen.^[136-137] In weiteren Studien wurden in Nachbarschaft von MtmB eine Suppressor-tRNA (pylT) gefunden, so wie drei Versionen von Lysin-tRNA Synthetasen (LysRS). Die erste gehörte der Klasse I der aaRS, die zweite der Klasse II an. Das dritte Gen wurde als pylS annotiert, dessen Translationsprodukt die pylRS darstellt.^[137] MtmB exprimiert in drei verschiedenen Varianten: MtmB1, MtmB2 und MtmB3. Diese können unter verschiedenen Bedingungen durch Suppression der im Leseraster enthaltenen Amber-Codons in voller Länge exprimiert werden.^[138-139] Der Einbau des Pyrrolysin erfolgt durch die Unterdrückung des Stopp-Codons (Suppression) mit der beladenen Pyl-tRNA^{CUA}.^[140] Der genaue Mechanismus dieser Beladung ist Thema kontroverser Diskussionen. Es wurde gezeigt, dass eine tRNA^{Pyl} von LysRS1 und LysRS2 mit Lys beladen und im Anschluss modifiziert werden kann.^[141] Der alternative Pfad ist, dass es der PylRS möglich ist, die tRNA^{Pyl} direkt mit Pyrrolysin zu aminoacylieren.^[137] Für die Verwendung von Pyrrolysin zur Inkorporation unnatürlicher Aminosäuren ist allerdings nur der letztere Pfad von Interesse. Dies ist in nicht zu Archaeobakterien verwandten Organismen, wie zum Beispiel in *E.coli* möglich. Dazu muss PylRS und tRNA^{Pyl} durch ein Plasmid eingebracht werden, sowie die Aminosäure entweder extern zugänglich gemacht, oder über eine Integration des Pyrrolysin-Biosyntheseclusters direkt hergestellt werden.^[142-144] Ein Meilenstein war die Erkenntnis, dass PylRS aus *M. barkeri* auch Pyrrolysin-Derivate erkennen und übertragen kann.^[136-137] Damit war die Idee zur Verwendung dieses Systems für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren geboren. Allerdings stellte sich das System aus *Methanosarcina mazei* als das insgesamt Beste in Bezug auf Stabilität, Substratspezifität, Suppressionseffizienz und die

Anpassungsfähigkeit in der Evolutionsmutagenese heraus.^[145] Durch intensive Studien ergab sich ein typisches Muster, welches von den Pyrrolysin-Derivaten erfüllt werden musste, um von PylRS als Substrat akzeptiert zu werden (In Struktur **16** dick markierter Bereich). Es wurde gezeigt, dass PyP (N- ϵ -D-prolyl-L-lysin, **17**) und Cyc (N- ϵ -cyklopentylloxycarbonyl-L-lysin, **18**) durch den Wildtyp der PylRS effizient übertragen werden können.^[146] Der Einsatz von ZLys (N- ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysin, **19**) zeigte allerdings nur sehr geringe Einbauraten. Durch erste Mutationsstudien wurde, gestützt von der Kristallstruktur der Wildtyp-PylRS, eine Y384F/ Y306A Variante erzeugt, die auch die Inkorporation von sterisch anspruchsvolleren Pyrrolysin-Derivaten erlaubt.^[121, 147-149]

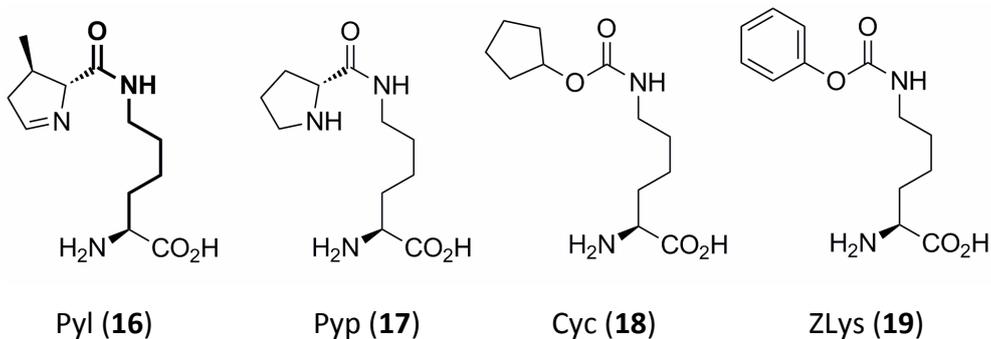


Abbildung 19: Pyrrolysin-Analoga verwandt in der Amber-Suppression.

Dies öffnete die Tür zu einem System, welches durch Evolution oder „*educated guess*“ (auf Fachkenntnis gestützte Vermutung) die Inkorporation von verschiedensten Pyrrolysin-Derivaten erlaubt.

Es wurde auch bewiesen, dass verschiedene unnatürliche Aminosäuren gleichzeitig in einen Organismus inkorporiert werden können, wie im Falle der Kombination von Tyrosyl- und Pyrrolysyl-System gezeigt wurde.^[150-151]

Allerdings ist die Suppressionsrate das zentrale Problem dieser Methodik. Es gibt verschiedene Ansätze die Rate zu steigern oder die Konkurrenz um das Stopp-Codon ganz zu entfernen.

3.2.3.7 Methoden der Suppressionsoptimierung

Bekanntere Ansätze sind z. B. die Evolvierung von Ribosomen, um die Erkennung von Quadruplet-Codons zu ermöglichen.^[152] Alternativ hat die Gruppe um Sakamoto in ihrem System den Konkurrenzkampf zwischen *release factor* 1 (RF1) und der Suppressor-tRNA

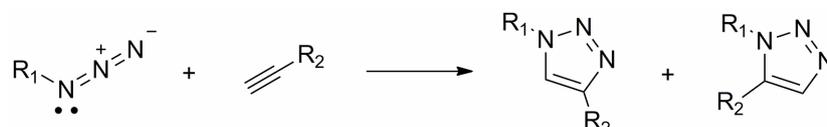
durch eine *Knockout*-Mutation beendet.^[153] Sieben essentielle Proteine, die in *E. coli* mittels RF1 (UAG/UAA) terminiert werden, werden dabei auf einem Plasmid mit anderen Stopp Codons exprimiert.^[154] Da der *release factor 2* (RF2, UAA/UGA) das Amber-Codon nicht erkennt, ist eine Suppression hinfällig. Für Details zur Codonerkennung von RF1 und RF2 sind die Artikel von Noller und Nakamura zu empfehlen.^[155-156]

Diese optimierten Suppressionssysteme bilden eine optimale Grundlage für die Einführung von orthogonal modifizierbaren Gruppen. Besonders geeignet sind hierfür Reaktionen der Click-Chemie.

3.2.4 Click-Chemie

3.2.4.1 Grundlagen der Click-Chemie

Der Begriff der Click-Chemie steht für Reaktionen, die einfach und substanzselektiv zu einem Produkt umgesetzt werden. Eine der bekanntesten Click-Reaktionen beschrieb Prof. Rolf Huisgen in den 60er Jahren mit der Beschreibung der 1,3-dipolaren Cycloaddition eines Dipolarophils (z. B. Alkin oder Alken) mit einer 1,3-dipolaren Verbindung (z. B. Nitriloxid, Azid oder Diazoalkan)^[157]



Schema 1: 1,3-dipolare Cycloaddition nach Huisgen

Etabliert wurde der Begriff "Click-Chemie" selbst von Sharpless im Zuge der Weiterentwicklung dieser Reaktion durch Cu(I)-Katalyse, welche zeitgleich von Meldal veröffentlicht wurde. Diese ermöglicht die homogene Synthese zu 1,4-substituierten Triazolen ohne die Nebenreaktion zu 1,5-substituierten Triazolen.^[158-159]

Die Kupfer-Click-Chemie fand in der organischen Synthese vielfältig Verwendung. Ebenso wurde diese für Peptide und DNA erfolgreich angewandt.^[160] Das Anwendungsportfolio umfasst Metallisierung von DNA, postsynthetische Funktionalisierung und Oberflächenmodifikation.^[161-165]

Besonders für *in-vivo*-Anwendungen und Modifikation von größeren Proteinen erwies sich Cu(I) jedoch als problematisch. Cu(I) wirkt hier sowohl als Zellgift in Bezug auf Zellteilung und Metabolismus als auch als Komplexbildner.^[166-168]

3.2.4.2 Kupferfreie-Click-Reaktionen

Um die oben beschriebenen Probleme zu vermeiden, wurden kupferfreie Varianten der Click-Reaktionen entwickelt. Die ersten Arbeiten zeigten, dass durch die Einführung von Ringspannung die Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit von Kupfer substanziell erhöht werden kann.^[169] Die Kinetik ist im Vergleich zur kupfer-katalysierten Reaktion immer noch stark verlangsamt, konnte aber von Bertozzi zur Glykosylierung von Proteinen *in vivo* erfolgreich eingesetzt werden.^[170-171]

Eine weitere Methode kupferfreier Click-Reaktionen ist der Einsatz von *in situ* generierten Nitrilimininen als Reaktionspartnern.

Bekannt ist hierfür die photoaktivierte 1,3-dipolare Cycloaddition. Die UV-Aktivierung eines Diaryltetrazols generiert unter Stickstoffverlust ein 1,3-dipolares Nitrilimin, welches spontan mit einem dipolarophilen Alken zum Pyrazolin reagiert.^[172] Diese Reaktion wurde optimiert, sodass die Aktivierung mit moderater UV-Bestrahlung in sehr hohen Ausbeuten abläuft.^[173] Interessant sind hierbei auch die Fluoreszenzeigenschaften des Pyrazolin-Rings, welche schon zur *in-vivo*-Detektion Alken-modifizierter *E.coli*-Proteine verwendet wurden.^[174]

Weitere Möglichkeiten der Reaktionen mit Nitrilimininen werden im Ergebnisteil genauer beschrieben.

3.2.4.3 Click-Reaktion an unnatürlichen Aminosäuren

Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Aminosäuren, die eine orthogonale chemische Modifikation des Proteins zulassen. Click-Chemie eignete sich hierfür hervorragend. Das erste Derivat für die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkyne Cycloaddition **20** war noch sehr stark an Pyrrolysin orientiert.^[175] Weitere Analoga wurden zur besseren Suppression optimiert (**21**, **22**).^[176-177] Für einen Detailüberblick sind Artikel von Chin und Chan zu empfehlen.^[145, 178-179]

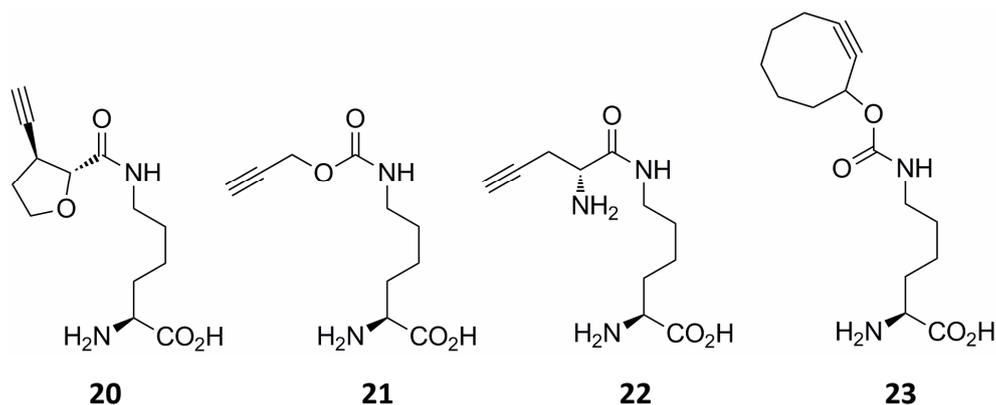
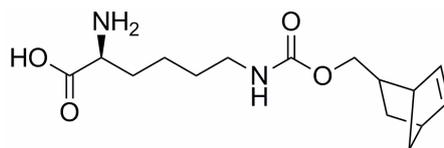


Abbildung 20: Click-fähige Pyrrolysin-Analoga.

Die Problematik dieses Systems liegt in der Toxizität des Cu(I).^[166] Um dieses Problem zu lösen, wurden Komponenten für kupferfreie Click-Varianten entwickelt, die sich mittels Suppression in Proteine inkorporieren lassen. Die erste *in vivo* anwendbare Methode wurde durch einen gespannten Cyklooctinring ermöglicht, der in Abwesenheit von Cu(I) mit azidmarkierten Substanzen reagierte.^[170] Dieses System wurde von Plass *et al.* durch ein Pyrrolysinderivat **23** realisiert.^[180] Da die ersten Cyklooctine langsame Reaktionsraten aufwiesen, wurden sie durch Ringsubstitution verbessert.^[181] Etwa zeitgleich wurde ein Norbornen von der Gruppe Carell für kupferfreien Click durch das Pyrrolysin eingebaut.^[182] Ebenso wurde diese Methode von den Gruppen um Chin und Lemke eingesetzt.^[183-184] Dieses bietet ein breites Spektrum für Modifikationen. Es wurde hierfür 1,3-dipolare Cycloaddition mit einem Nitrilimin verwendet. Diese können - wie oben beschrieben - durch Photoaktivierung von einem Tetrazol oder durch Basen-unterstützte HCl-Eliminierung aus den korrespondierenden Chloroformaten generiert werden. Als Alternative wurde auch eine Diels-Alder-Reaktion verwendet. Details zu diesen Reaktionen sind im Ergebnisteil und im folgenden Kapitel der Einleitung gegeben.

Eine Variante unter Verwendung eines Tetrazins und eines Cyklooctins als Edukte wurde von Fox und Mitarbeitern eingesetzt. Unter Bildung eines Dihydropyrazins konnte Thioredoxin modifiziert werden.^[185]

Die Gruppe um Hildebrandt konnte Norbornen-funktionalisierte Antikörper sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einem Tetrazin-Derivat bioorthogonal durch eine inverse hetero-Diels-Alder-Reaktion modifizieren.^[186]



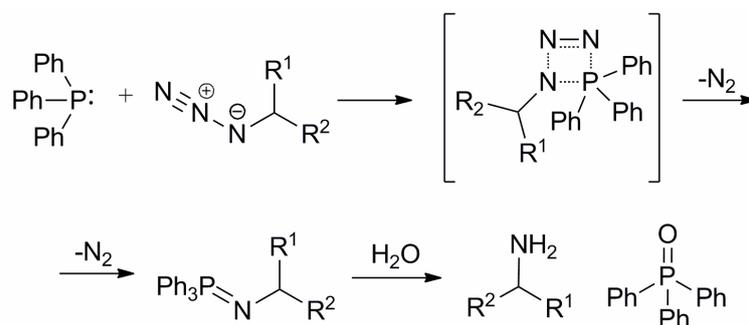
Norbornen-Pyrrolysin-Analog (**24**)

Abbildung 21: Norbornen-Derivat des Pyrrolylins.

3.2.4.4 Alternative bioorthogonale Reaktionen

Staudinger Reaktion

Eine weitere biokompatible Reaktion stellt die unter milden Bedingungen ablaufende Staudinger Ligation dar. Hierbei reagiert ein Phosphin mit einem Azid zu einem Amin. Im Detail greift das Phosphoratom den endständigen Stickstoff des Azids an und bildet so ein Phosphoazid. In wässriger Lösung wird zunächst unter Stickstoffabspaltung ein Azaylid generiert. Abschließend kann dieses mit verschiedenen elektrophilen Gruppen reagieren. Im hier gezeigten Beispiel (Schema 2) erfolgt die Hydrolyse zum primären Amin.^[187]



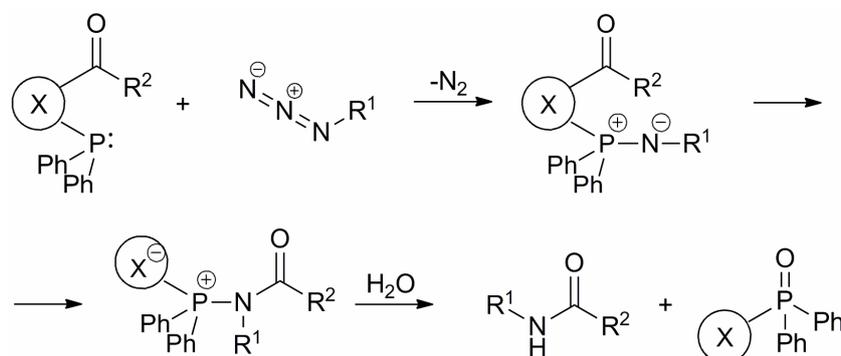
Schema 2: Beispiel für eine Staudinger-Reaktion.

Staudinger-Ligation

Die Staudinger-Reaktion wurde von Saxon *et al.* abgewandelt und zur Ligation zweier Komponenten verwendet. Die beiden Reaktionspartner sind hierbei ein Azid und ein Phosphinderivat mit benachbarter Carbonylgruppe. Somit wird die Ylid-Zwischenstufe stabilisiert und kann so durch Hydrolyse zum stabilen Amid reagieren.^[188]

Die Staudinger-Ligation konnte erfolgreich zur Funktionalisierung von Zelloberflächen mit Biotin eingesetzt werden und ist ein etabliertes Standardverfahren um orthogonale Modifikationen zu erzeugen.^[189-192]

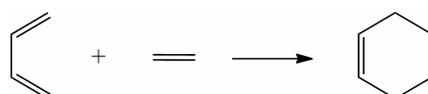
Eine Optimierung wurde durch die rückstandsfreie Staudinger-Reaktion möglich, die eine Peptidbindung im Endprodukt erzeugt (Schema 3).



Schema 3: Die spurlose Staudinger-Reaktion (X markiert eine spaltbare Bindung, die typischerweise aus einem Ester bzw. Thioester besteht).

Diels-Alder-Reaktion

Diese zuerst von Diels und Alder im Jahre 1928 beschriebene Reaktion wurde 1950 mit dem Nobelpreis der Chemie bedacht. Es kommt hierbei zu einer perizyklischen Reaktion zwischen einem Dien und einem Dienophil. Auf Grund des energetisch günstigeren Übergangszustandes verläuft die Reaktion spontan und deren Kinetik kann durch Druck kontrolliert werden.^[193] Diese chemische Standardmethode wurde auch für die Ligation von Biomolekülen eingesetzt.



Schema 4: Diels-Alder-Reaktion

3.3 Massenspektrometrie

Die Analytik ist bei sequenzspezifischen Modifikationen entscheidend, da sichergestellt werden muss, dass ein homogenes Produkt generiert werden kann. Besonders bei Proteinen ist es eine Herausforderung, auf Grund der großen Zahl an Funktionalitäten, Nebenreaktionen auszuschließen und die Qualität der Produkte sicher zu stellen. Dafür hat sich die Massenspektrometrie als Standardmethode etabliert.

Massenspektrometrie ist eine mikroanalytische Methode, die es ermöglicht, das nominale Gewicht oder sogar das Molekulargewicht eines Analyten zu bestimmen. Ebenso lässt es Rückschlüsse auf die elementare Zusammensetzung und zum Teil auf die Struktur des Moleküls zu. Die Massenspektrometrie ist die analytische Methode, die am meisten strukturelle Information pro Menge Analyt generieren kann.

Die zentralen Stufen dieser Technik sind Ionisation der Moleküle, Massenanalyse der Ionen und Detektion des erzeugten Signals.^[194]

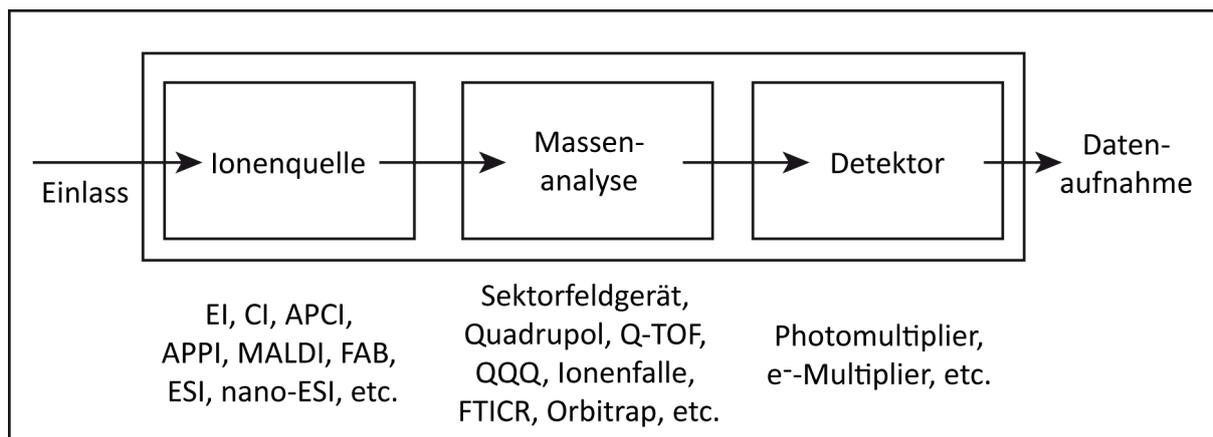


Abbildung 22: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

3.3.1 Ionisationstechniken

Die ersten Techniken zur Ionisation in der Massenspektrometrie vor 1970 umfassten Elektronenionisation und chemische Ionisation. Durch diese Techniken waren nur stabile Substanzen, die einen brauchbaren Dampfdruck aufweisen, zugänglich.

3.3.1.1 Elektrische Ionisation - EI

EI basiert auf den Entdeckungen J. J. Thompsons der 1906 den Nobelpreis der Physik für die Untersuchung von „elektrischen Entladungen in Gasen, die zur Bildung ionisierter Spezies führen“ erhielt. Die Ionenquelle arbeitet im Falle von EI unter Vakuumbedingungen (10^{-3} Pa d.h. 10^{-5} Torr), um die Ionisation von Umgebungspartikeln oder Kollisionen zu vermeiden.

In dieser Technik wird der neutrale Analyt in der Gasphase durch einen Elektronenstrahl geleitet, der durch Magneten abgelenkt wird, um ein möglichst großes Volumen in der Quelle abzudecken. Dieser Strahl enthält Elektronen mit einem Potential von etwa 70 eV. Dadurch wird Energie auf den Analyten übertragen, der die Energie selbst in Form eines Elektrons abgibt und in eine einfach positiv geladene Form M^{+} übergeht, die auch als ungerad-elektronisches Radikalion (OE) bekannt ist.^[194]

Da organische Verbindungen typischerweise eine Ionisierungsenergie von 6 – 10 eV benötigen, führt EI meist zu Fragmentierung und wird daher als „harte“ Variante einer Ionisierung bezeichnet. Folglich verliert das Mutterions massiv an Intensität. Die typische Form der Analyse für EI sind der einzelne Quadrupol-Massenfilter und das Sektorfeldgerät.

3.3.1.2 Chemische Ionisation - CI

Die Ionisation des Analyten erfolgt durch ein bereits aktiviertes ionisiertes Gas. Daher besteht in der Quelle auch nur ein schwaches Vakuum (0,1 – 2 Torr). CI ist eine „weiche“ Methode (<5 eV). Dies bedeutet, dass man durch CI eine höhere Wahrscheinlichkeit der Massenbestimmung erhält, wohingegen EI auch strukturelle Informationen durch Fragmentierung liefern kann.

Im Detail wird zunächst das Gas durch einen Elektronenstrahl ionisiert (Plasma-Region), was meist protonierte Moleküle ergibt. Diese können dann ein Proton auf den Analyten übertragen ($[M + H]^+$). So werden gerad-elektronische Ionen (EE) erzeugt, die deutlich stabiler sind als OEs. Der Ionisationsschritt kann durch die Wahl des Gases beeinflusst werden. Die wichtigste Eigenschaft ist hierbei die Protonenaffinität (PA) des Gases und das Verhältnis der PA des Gases zum Analyten. Ist $PA_{\text{Analyt}} \gg PA_{\text{Gas}}$ kommt es zu Fragmentierung des Analyten, wenn $PA_{\text{Analyt}} \geq PA_{\text{Gas}}$, ist die Ionisationseffizienz gering ($PA_{\text{NH}_3} > PA_{\text{i-Butan}} > PA_{\text{H}_2\text{O}} > PA_{\text{Methan}}$).^[194]

CI kann allerdings auch als negativer Ionenmodus durchgeführt werden. Dabei wird ein reaktives Ion generiert, welches eine sehr hohe PA aufweist (F^- , Cl^- , OH^-) und so den Analyten in einer negativ geladenen Form erzeugt. Interessant ist, dass der negative CI-Modus im Gegensatz zum Positiven (fast nur EE) sowohl EE- als auch OE-Ionen erzeugt.

Die Kombination von Daten aus CI und EI kann gute Informationen über den Analyten geben.

3.3.1.3 Atmospheric pressure chemical ionisation - APCI

Im Gegensatz zu EI und CI ist APCI mit Flüssigchromatographiesystemen (wie z. B. HPLC) kombinierbar. Die Probe wird unter Normaldruck in die Quelle eingegeben und durch eine β -Strahlenquelle ionisiert. Hierbei baut eine Corona-Nadel eine hohe negative Spannung und eine starke Elektronendichte auf. Die Elektronen werden auf Wasser oder Sauerstoffspezies in der Umgebung überspringen und gasartige Ionen (H_2O^- , O_2^-) erzeugen, die ionen-molekulare Reaktionen mit dem Analyten eingehen. Durch den Atmosphärendruck würden oft Addukte aus Reaktionen des Analyten mit der Umgebungsluft entstehen, die in einem hohen Hintergrundsignal resultieren würden. Um dies zu umgehen wird Stickstoff als Hüllgas um den Flüssigkeitsstrom eingesetzt. Außerdem wird N_2 als Zerstäubergas eingesetzt. Somit hilft es bei der Verdampfung des Lösungsmittels.^[194]

3.3.1.4 Elektrospray Ionisation - ESI

ESI ermöglicht eine flüssige Phase in einer ionisierten Form zu verdampfen und so eine Massenanalyse zu erlauben. Der Einsatz von ESI-MS wurde zuerst von Whitehouse und Fenn 1985 bzw. 1993 beschrieben, die auf den Arbeiten von Dole (1968) aufbauten. Dieser zeigte, dass gasförmige Ionen durch eine unter Spannung stehende Stahlkapillare erzeugt werden können.^[195-197]

ESI und APCI haben deutliche Gemeinsamkeiten, allerdings unterscheiden sie sich im Aufbau des Sprays vor dem Eintritt in das Massenspektrometer. Es wird ein großer Spannungsgradient zwischen Nadel und Eingangskapillare des MS' erzeugt (5000 V, 100 V). Dadurch wird an der Nadel im Meniskus der Flüssigkeit eine massive Überschussladung generiert. Der Meniskus wird instabil, was zur Ausbildung des charakteristischen Taylor-Konus führt. An dessen Ende sondern sich Tröpfchen (etwa 1,5 μm) ab, die ebenfalls einen Ladungsüberschuss tragen. Mit dem Verdampfen des Lösungsmittels kommt es zu einer weiteren Verdichtung der Oberflächenladung, bis die Abstoßungskräfte überkritisch werden (Rayleigh Limit) und sich Tochtertröpfchen bilden. Diese besitzen im Normalfall etwa 2 % der Masse des Ursprungstropfens und 15 % der Ladung. Es scheiden sich weiter Tröpfchen ab, bis jeder Tropfen nur ein Molekül enthält, welches an basischen Funktionalitäten geladen ist (positiver Ionenmodus). Dieser Vorgang wird als *charged residue* Modell bezeichnet und

ist besonders in Analytik von Biomakromolekülen wie Proteinen entscheidend. Ein weiterer Faktor ist die Ionenevaporation. Hierbei kommt es, falls die Ladungsabstoßung in einem Tröpfchen groß genug ist, dazu, dass bei der Verdunstung Analytenmoleküle zusammen mit Oberflächenladung den Tropfen verlassen können. Dieser Vorgang geschieht bei Tröpfchen die kleiner als 10 nm sind und ist entscheidend bei der Analyse kleiner Moleküle.^[198]

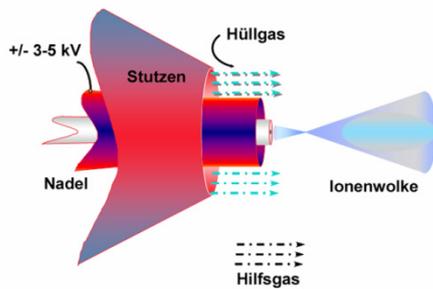


Abbildung 23: Schnittzeichnung der Nadelspitze eines ESI-Systems (mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific).

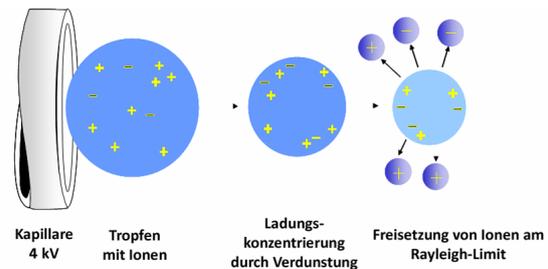


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Evaporation der Ionentröpfchen nach der Freisetzung aus dem Taylor-Konus (mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific).

ESI ist ein vielschichtiges Konzept, das z. B. für die Aufklärung von Strukturen, Fragmentierungsstudien und die Analysen von nicht-kovalenten Komplexen eingesetzt wird.^[199-202] ESI produziert intakte Gasphasenionen mit vernachlässigbaren Anteilen an Fragmentierung. Dies ist auch verschiedenen Vorgängen zu verdanken, die auftreten, während die Ionen von einem kondensierten in einen gasförmigen Zustand übergehen. Zunächst kann der Analyt Vibrationsenergie auf das verdunstende Lösungsmittel abgeben. Weiter führt die adiabatische Expansion der Ionenwolke beim Einschleusen in das Vorvakuum zur Abkühlung. Außerdem erfährt die Probe durch Verdunstung und durch niedrig-energetische Stöße mit umgebenden Luftmolekülen weitere Abkühlung.^[198]

3.3.1.5 Nano-ESI

Ein großer Vorteil von ESI-Systemen ist die Möglichkeit der direkten Kopplung mit HPLC-Komponenten. Für Standard-Applikationen werden Flussraten im μl -Bereich (10 – 500 $\mu\text{l}/\text{min}$) verwendet. Für die Analytik von Biomolekülen stehen jedoch oftmals nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung, die keiner hohen Verdünnung unterworfen werden sollten. Nano-ESI-Quellen arbeiten in einem Bereich von 10 – 1000 nL/min. Dies basiert auf einer effizienteren Spray-Technik, die von Wilm und Mann entwickelt wurde und Flussraten

von 25 nl/min verwendet.^[203-204] Die Tröpfchen dieser Quelle sind mit etwa 100 – 200 nm ungefähr 100 – 1000 mal kleiner als die von konventionellen ESI-Quellen. Die Nano-Quelle ermöglicht es auf Grund der geringen Flussrate kleine Probenmengen über einen großen Zeitbereich aufzutrennen und zu analysieren. Außerdem benötigen Nano-ESI-Quellen niedrigere Spannungen (etwa 2 kV) um den Taylor-Konus zu erzeugen als ESI-Quellen (etwa 3,5 – 5 kV), was Spannungsüberschlägen vorbeugt, die das Spray unterbrechen.^[203] Eine wichtige Rolle nehmen auch die Nadeln ein, die durch eine Verkleinerung der Spitze immer definiertere Taylor-Koni erzeugen können.^[205-206] Zudem wird die Technik im bioanalytischen Bereich durch die Entwicklung von Nano-HPLCs bereichert, die zunächst noch Flussteiler benötigten, um die geringen Fördermengen zu erreichen. Heute werden diese von modernen Nano-HPLCs und Nano-UPLCs, die enorme Rückdrücke (>1000 bar) bewältigen können, abgelöst.^[198]

3.3.1.6 *Atmospheric pressure photo ionization APPI*

APPI ist eine moderne Methode zum Ionisieren von Biomolekülen. Sie basiert auf dem Prozess der Absorption von Strahlungsenergie, die größer ist als das erste Ionisationspotential eines Analyten, welches nötig wäre, um ein Elektron abzugeben. So wird durch einen Ein-Photonen-Mechanismus mittels Freisetzung eines Valenzschalen-Elektrons ein Ion (M^{+}) generiert. Wie bereits erwähnt, benötigen organische Substanzen meist 7 – 10 eV Aktivierungsenergie. Daher sind Lampen, die energetische Photonen über 7 eV emittieren, wie Xe-Lampen (8,4 eV), Kr-Lampen (10 – 10,6 eV) oder Ar-Lampen (11,7 eV), geeignet.^[207] Details zum Quellenaufbau sind in den Artikeln von Robb und Syage beschrieben.^[207-208] Die Photoionisation läuft meist in einen zweistufigen Ionisationsprozess ab.^[209] Im ersten Schritt wird ein radikalisches Ion (M^{+}) durch Absorption von Strahlungsenergie erzeugt. Der zweite Prozess besteht in der Abstrahierung eines Protons von einem protischen Lösungsmittelmolekül durch das Radikal. Dieses Proton wird auf den Analyten übertragen was eine MH^{+} -Form des Analyten zur Folge hat. In einem begrenzten Rahmen kann auch die Fragmentierung des M^{+} beobachtet werden, was Strukturinformationen liefern kann.^[194]

Durch die Kombination mit APPI ist es möglich, die ESI-Quelle besonders bei unpolaren Molekülen zu unterstützen.^[209]

3.3.1.7 *Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)*

MALDI ist eine Ionisationstechnik, die den Analyten aus einem kristallinen Zustand direkt in die Gasphase sublimiert und so für MS-Analysen zugänglich macht.^[210-212] Der Analyt wird hierbei mit einer stark UV-absorbierenden Substanz vermischt (z. B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-trans-zimtsäure (Sinapic) oder 3-Hydroxypicolinsäure (HPA)). Es gibt verschiedene Preparationsmethoden, z. B. die „*dried droplet*“ oder die „*thin film*“ Methode^[212-214]. Für spezielle Fragestellungen, wie z. B. für die Analyse von Lipiden wurden neue Matrices entwickelt; die ionischen Flüssigmatrices (z. B. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure/Triethylamin) und ionische Feststoffe (z. B. 4-Nitroanilin/Buttersäure).^[215-216]

Typische Probleme von MALDI sind die Inhomogenität von Proben, was zu *hot spots* führt, die starke Signale produzieren, während andere Bereiche wenig bis keine Daten liefern. Daraus ergibt sich eine stark erschwerte Quantifizierung.^[216] Allerdings generierten Ionenmatrices sowohl für dieses Problem als auch im Falle der Reproduzierbarkeit verbesserte Resultate.

Mittlerweile wurde diese Technik auch auf die Analyse von Peptiden erweitert. Die besten Ergebnisse lieferten hierbei Kombinationen aus verschiedenen ionischen Feststoffmatrices.^[217]

Eine MALDI-basierte Visualisierungsmethode ist das *MALDI imaging*. Hierbei wird typischerweise ein Dünnschnitt z. B. einer Gewebeprobe in zwei Dimensionen durch MALDI analysiert, was räumliche Informationen über die Probe erzeugt.^[218]

3.3.1.8 *Fast atom bombardment (FAB)*

FAB ist eine der MALDI verwandte Methode, die ebenso eine Matrix, allerdings nur in flüssiger Form (z. B. Glycerin oder *m*-Nitrobenzylalkohol), verwendet. In dieser Methode wird der Analyt in der Matrix aufgetragen und mit einem hochenergetischen Strahl (Ar, Xe oder Cs⁺) beschossen. Die Kollisionsenergie wird auf Analyten und Matrix übertragen, welche dadurch verdampfen. Hierbei schützt die Matrix den Analyten vor Zersetzung. Der Analyt wird entweder durch die Verdampfung oder die geladene Matrix ionisiert, dabei verliert der Analyt auch den Lösungsmittelanteil, wodurch er effizient Energie abgeben kann. FAB wird zu den weichen Ionisationsformen gezählt, die hohe Ausbeuten an Ionen liefern und dabei nur geringe Fragmentierung hervorrufen. Dies ist z. B. bei der Messung von Steroiden von Vorteil.^[219]

3.3.2 Massenanalytik

Die zentrale Komponente eines Massenspektrometers ist die Massenanalytik. Diese ermöglicht es Ionen nach ihrem Molekulargewicht-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) zu trennen.

3.3.2.1 Sektorfeldgeräte

Sektorfeld-Messungen beruhen auf dem Prinzip, dass geladene Teilchen im magnetischen Feld abgelenkt werden und dabei einen Austrittsspalt treffen. Durch die Stärke des Magnetfelds kann durch eine definierte Flugbahn auf den m/z -Wert des Teilchens geschlossen werden. Die Auflösung des Sektorfeldgerätes ist abhängig von dem Radius des Magneten und der Breite des Ein- und Auslassspaltes. Eine Verkleinerung erhöht die Auflösung, allerdings begleitet von einem deutlichen Sensitivitätsverlust. Typischerweise liegt die Auflösung bei <5000 , dies bedeutet, dass z. B. eine Massentrennung von 5001 und 5000 m/z möglich ist. Die typische Ionisationsstrategie für Sektorfeldgeräte ist EI.

3.3.2.2 Time of flight - Massenanalytik (TOF-MS)

Die Trennung der Ionen beruht hier auf der Flugzeit der Ionen nach einer Ablenkung. Die Hauptanwendung ist das MALDI-TOF.^[220-221] Die Ionisation erfolgt wie beschrieben durch einen Laser, danach bildet sich eine Ionenwolke aus, in der durch Anlegen von elektrischen Potentialen die Anfangsgeschwindigkeiten der Ionen normiert werden. Moderne MALDI-TOF-Geräte verwenden einen elektrostatischen Fokussierungsspiegel. Dieser ermöglicht es, Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis, allerdings unterschiedlicher kinetischer Energie, so zu reflektieren, dass das langsamere Ion eine minimal kürzere Strecke und das schnelle Ion eine minimal längere Strecke zurücklegen muss. So werden deutlich genauere Signale und eine höhere Auflösung erzielt. Eine weitere Komponente von MALDI-TOF-Messungen ist der *postsource decay* (PSD). Dieser beschreibt Fragmentierungsprozesse, die die Ionen nach dem Verlassen der Quelle erleiden.^[222]

3.3.2.3 TOF/TOF-MS

Eine Abwandlung des MALDI-TOF ist die Kombination von zwei TOF-Detektoren und einer zwischengeschalteten Kollisionszelle. Das erlaubt Kollisions-induzierte Dissoziationsstudien (CID) kombiniert mit einer Analyse des Mutterions. Dabei ist es von Nachteil, dass MALDI

fast immer einfach geladene Ionen erzeugt, so dass viele Fragmentierungsprodukte für die weitere Analytik verloren gehen. Der erste TOF-Detektor gibt hierbei den Gesamtscan, wobei die Kollisionszelle ein definiertes Ion fragmentiert und im zweiten TOF-Detektor analysiert.^[198]

3.3.2.4 Quadrupol

Der Quadrupol erreicht seine selektive Wirkung über vier parallel angeordnete Stäbe. Die Ionen werden durch den Quadrupol geleitet, indem sie durch eine an zwei gegenüberliegenden Stäben angelegten Radiofrequenz (RF) Spannung oszillieren. Die beiden anderen Stäbe werden mit einer DC-Spannung beschickt. Die RF-Spannung wird konstant belassen und die DC-Spannung variiert. Je höher die Spannung gewählt wird, desto instabiler sind die Ionen, das heißt umso besser wird die Auflösung und umso stärker sinkt die Sensitivität. Besitzt das Ion einen gesuchten m/z -Wert, so wird dieses Ion mit einer stabilen Amplitude durch den Quadrupol geleitet. Andere Ionen werden mit den Stäben auf Grund einer instabilen Flugbahn kollidieren. Um Verschmutzungen zu vermeiden besitzen Quadrupole in der Regel Vorfilterstäbe. Die ideale Energie eines Teilchens für den Eintritt in den Quadrupol liegt bei etwa 5 eV. Ist die Energie zu niedrig, kann das Teilchen trotz korrekter Masse (m/z) verloren gehen, ist sie zu hoch, können auch unerwünschte Ionen passieren. Die Hauptvorteile von Quadrupolen liegen in ihrer Verlässlichkeit und dem relativ niedrigen Preis.^[194, 198]

3.3.2.5 Q-TOF

Im Gegensatz zu anderen TOF-Systemen ist der Quadrupol im Q-TOF fähig zur Selektion von Ionen und dient nicht nur zur Ionenleitung. Typischerweise geschieht die Ionisation durch ein Elektrospray, es gibt aber auch Ansätze die MALDI verwenden.

Die Ionen werden kurzfristig in einer gepulsten Ionenkammer gelagert. Dann werden alle Ionen durch einen Puls mit der gleichen kinetischen Energie ausgestattet, um sie im TOF-Detektor ihrem m/z -Wert entsprechend auszumessen. Durch den voll funktionsfähigen Quadrupol, der in Reihenschaltung zum TOF steht, ist es möglich Ionisierungen bei Atmosphärendruck durchzuführen. Zusätzlich besitzen diese Systeme meist eine Kollisionszelle, die Fragmentierung induzieren kann. Die Geräte zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, hohe Molekulargewichte messen zu können. Moderne Varianten unterstützen

auch Anwendungen wie z. B. Neutralverlust-Messungen. Es werden Massengenauigkeiten deutlich unter 10 ppm erreicht.^[198]

3.3.2.6 QQQ-MS

Die Reihenschaltung von drei Quadrupolen erlaubt einige komplexe Messtechniken. Hierbei ist es möglich sehr sensitive Analysen durchzuführen. Jeweils der erste und der dritte Quadrupol werden als Massenfilter eingesetzt. Der zweite Quadrupol besitzt nur eine RF-Spannung und dient als Kollisionszelle. Hinter dem dritten Quadrupol befindet sich ein Massendetektor.

Typischerweise werden biologische Proben durch ESI in das Gerät geschleust und im ersten Quadrupol (Q1) vorselektiert. Im zweiten Quadrupol (Q2) wird die Fragmentierung durchgeführt. Und die Fragmente werden nach dem dritten Quadrupol (Q3) im zweiten Massendetektor ausgelesen. Auf diese Weise kann auch strukturelle Information gewonnen werden.

Eine weitere wichtige Anwendung ist das Prinzip des Neutralverlustes (NL). Hier wird in den Quadrupols eins und drei selektiert, wobei Q3 um eine Massendifferenz verschoben ist, die z. B. dem Neutralverlust einer Glykosylierung bzw. einer Phosphorylierung entspricht.

Ebenso kann nach einem Mutterion gesucht werden, welches ein gesuchtes Fragmentmuster enthält. Dabei werden in Q1 Mutterionen gescannt, in Q2 fragmentiert und in Q3 bestimmte Fragmente detektiert.^[198]

3.3.2.7 3D-Quadrupol-Ionenfallen-Massendetektor (3D-QIT-MS)

Diese komplexe Technik wurde von Wolfgang Paul entwickelt und 1989 mit dem Nobelpreis für Physik bedacht.^[223] Diese Methode hat zusätzlich zu den Eigenschaften des Quadrupols die Möglichkeit Ionen zu fangen, einzeln zu fragmentieren, davon Massenspektren aufzunehmen und dies für die Fragmente fortzusetzen. So werden MS^n -Analysen möglich. In der Kammer ist eine dünne Helium-Atmosphäre (1 Torr), was hilft die Ionen zu kühlen oder bei höher energetischen Stößen zu fragmentieren.

Die Falle zwingt die Ionen durch eine RF-Spannung auf eine 8-förmige Bahn. Dies geschieht durch eine RF-Spannung an der Ringelektrode. Hierbei existiert ein minimaler m/z -Wert, der bei einer bestimmten RF-Spannung stabilisiert ist. Es gibt ebenso einen maximalen m/z -Wert, der ausgestoßen werden kann. Die maximale Spannung für RF liegt bei etwa 7500 V, was

dem Ausstoß von nicht ganz $m/z = 1500$ entspricht. Diese Begrenzung wird durch eine zusätzliche AC-Spannung gelöst, die zwischen den beiden Endplatten angelegt wird (Resonanzanregung). Somit können durch Variieren der AC-Spannung die Ionen jeweils an ihrer Resonanzschwelle ausgeworfen werden. Ein großer Nachteil der 3D-QIT ist, dass jeweils die Hälfte aller Ionen beim Auswerfen verloren geht. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung der linearen Ionenfalle gelöst.^[198]

3.3.2.8 Lineare Quadrupol-Ionenfalle (LTQ-MS)

Die lineare Falle verwendet ein quadrupol-basiertes Modell. Die Geometrie ist identisch, allerdings besitzen die Stäbe getrennte Anfangs- und Endsektionen. Die radiale Bewegung wird durch die RF-Spannung auf den zentralen Einheiten der Falle erzeugt, die lineare durch eine Spannung an den Endstücken der Stäbe. Ebenso wie bei der 3D-Falle ist auch die lineare Version mit Helium gefüllt um die Ionen zu kühlen oder auch zu fragmentieren.^[224]

Die Ionen können durch drei verschiedene Methoden aus der Falle ausgeworfen werden. Die Resonanzanregung, die axial wirkt, wurde bereits bei der 3D-Falle behandelt. Dipolanregung legt eine zusätzliche Hilfsspannung, die der Bewegung des anzuregenden Teilchens entspricht, an zwei gegenüberliegende Stäbe an. Dies kann entweder zum Auswerfen oder Fragmentieren des Teilchens eingesetzt werden.^[198]

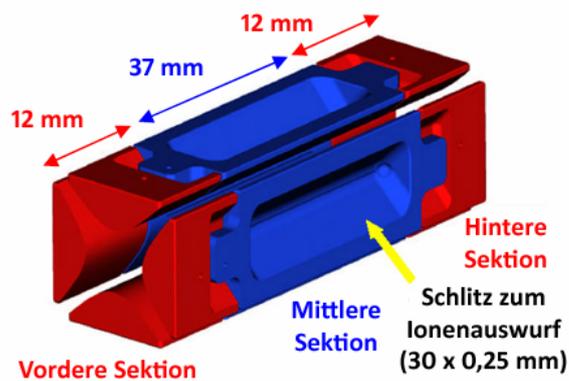


Abbildung 25: Aufbau einer LTQ-Zelle (Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific).

Eine weitere Möglichkeit ist die Quadrupol-Anregung. Diese ist der Dipol-Anregung ähnlich, allerdings wird eine Resonanzspannung an alle Elektroden angelegt. Es bleiben jeweils die Dipol- oder Quadrupol-Anregungsspannung konstant und die RF-Spannung wird variiert. Der Ausstoß der Ionen kann entweder radial oder axial erfolgen. Radial kann das Ion direkt auf

zwei Detektoren parallel analysiert werden. Axial kann es zu weiteren Analysesystemen (z. B. Orbitrap oder HCD-Zelle) transportiert werden.^[225]

3.3.2.9 Fourier-Transformation-Ionen-Zyklotron-Resonanz (FTICR)

Diese Technik zeichnet sich durch eine sehr gute Massengenauigkeit ($\ll 5$ ppm) und höchste Auflösungen von bis zu 1.000.000 aus. Die Grundlage für die Messung basiert darauf, dass Ionen, die in ein starkes Magnetfeld eindringen, kreisförmige Bewegungen eingehen, die lotrecht zu den Magnetfeldlinien verlaufen. Diese Kreisbewegung zeigt ein Resonanzverhalten, das in Relation zum m/z -Verhältnis des Teilchens steht. Dabei ist der große Unterschied zu Techniken wie Quadrupol, TOF oder Sektorfeldgeräten, dass diese Ionenausbildung, Trennung und Detektion räumlich getrennt durchführen müssen. ICR-Zellen sind in der Lage dies gleichzeitig zu erreichen, d.h. die Frequenzen der Rotation aller Ionen, die sich in der ICR-Zelle befinden, werden parallel gemessen. Dadurch erhöht sich das Signal und die Detektionsgrenze sinkt. Die Füllgrenze liegt bei etwa $10^6 - 10^7$ Ionen um räumliche Ladungswechselwirkungen zu vermeiden. Das Magnetfeld muss durch einen supraleitenden Magneten mit Stärken im Bereich von 3,5 – 20 T erzeugt werden. Die Magnetfeldstärke ist entscheidend für die maximale kinetische Energie, die Ionen in der Zelle aufnehmen können bevor es zum Zusammenstoß mit der Zellwand kommt. Dadurch können größere m/z -Werte ausgemessen werden und die Auflösung erhöht sich. Um Kollisionen zu vermeiden, muss das Vakuum in der ICR-Zelle extrem hoch sein ($10^{-9} - 10^{-10}$ Bar). Als Ionenquelle sind EI oder PI geeignet, allerdings werden typischerweise ESI oder MALDI verwendet. Die FTICR wird häufig mit einer linearen Falle gekoppelt, die Ionen sammeln und akkumulieren kann.^[198]

3.3.2.10 LTQ-FTICR-MS (LTQ FT ion cyclotron resonance-MS)

Bei Proteomanalysen werden komplexe Mischungen erzeugt, die aus mehr als 10.000 verschiedenen Peptiden bestehen können. Daher ist eine exakte Auftrennung der Probe z. B. durch Nano-LC nötig. Um diesen Informationsschwall zu verarbeiten benötigt man Geräte mit sehr schnellen Scanraten. Die lineare Ionenfalle besitzt die Fähigkeit Ionen zu akkumulieren und misst schneller als die 3D-Falle. Allerdings besitzt sie eine für Proteine nicht ausreichende Massengenauigkeit bis 20 ppm. Andere Techniken zeigen deutlich höhere Genauigkeiten, können allerdings mit den Messraten nicht Schritt halten. Die erste Ausnahme bildet die Ionenfalle-FTICR-Kombination. Sie vereint eine extreme Auflösung (1.000.000)

mit einer hohen Scanrate und sehr guter Massengenauigkeit (1 – 2 ppm) und ist dabei in der Lage MS^n -Analysen durchzuführen. Die erste Maschine dieses Typs wurde von Syka *et al.* 2004 in Virginia konstruiert und verwendete einen 3-Tesla-Magneten.^[226] Eine heute kommerziell erhältliche Variante ist das LTQ-FTICR UltraTM von Thermo Fisher Scientific, dieses besitzt einen 7T-Magneten. Es wurden ergänzende Techniken zur Fragmentierung in der ICR-Zelle zugefügt, wie z. B. *electron capture dissociation (ECD) assembly*. Dies erlaubt z. B. Peptidionen eine Rekombination von exothermalen Elektronenübergängen durch einen niederenergetischen Ionenstrom. IRMPD (*infrared multiphoton dissociation*) nutzt eine Anregung durch einen CO₂-LASER, um Dissoziationen hervorzurufen.

3.3.2.11 LTQ Orbitrap-MS

Diese neueste Detektorentechnik wurde 2000 von Makarov entwickelt: Die Orbitrap.^[227] Die Orbitrap vereint viele Anwendungsmöglichkeiten verschiedener Techniken. Die Detektion ist der FTICR-Zelle ähnlich, wobei allerdings kein supraleitender Magnet benötigt wird. Dies stellt einen erheblichen Vorteil in Bezug auf laufende Kosten dar. Die Grundlagen für diese Technik legte 1923 der Physiker Kingdon unter Einbeziehung der Ergebnisse von Hull.^[228-229] Dabei verwendete er eine Kammer mit zentraler Elektrode, die die Ionen anzieht. Allerdings erzeugt die Kammerwand einen Gegenpol, was zu einer orbitalen Bewegung der Ionen um die zentrale Achse führt. Die 2005 vorgestellte Orbitrap wies allerdings ein geschwungenes Design auf.^[230] Im Gegensatz zur FTICR wurde nun die harmonische axiale Oszillation zur Analyse durch schnelle Fourier-Transformation verwendet. Dies führte dazu, dass der Radius der Oszillation und die kinetische Energie zu Beginn der Oszillation keine entscheidende Rolle mehr spielen. Die Oszillationssignale nehmen ebenso wie beim FTICR mit der Zeit ab, was an Kollisionen zwischen Ionen liegt. Dies geschieht in der Orbitrap (Abbildung 26, 13) in geringerem Rahmen, da das Vakuum mit $2 \cdot 10^{-10}$ Torr noch höher liegt als in der FTICR.

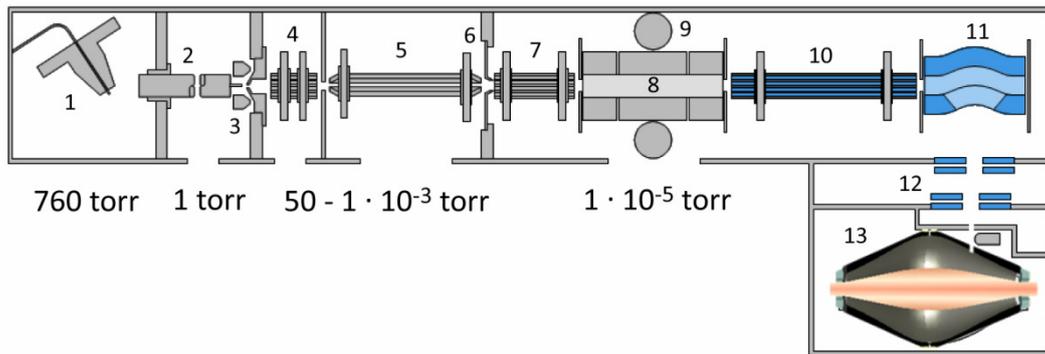


Abbildung 26: Schematischer Aufbau der LTQ Orbitrap; 1: ESI-Quelle, 2: Kapillare, 3: *skimmer* Linse, 4: quadratischer Quadrupol, 5: Quadrupol, 6: Inter-Multipol-Linse/ geteilte Torlinse, 7: Oktapol, 8: Lineare Ionenfalle (LTQ), 9: Massendetektor, 10: Oktapol, 11: CLT (*curved linear trap*), 12: Ionenspalt, 13: Orbitrap (Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific).

In der Fragmentierung besitzt sie die Fähigkeit in der LTQ durch beschleunigte Stöße mit Helium zu fragmentieren (*collision induced dissociation*, CID) oder in der HCD-Zelle (*high energy collision dissociation*) durch Stickstoff. Die HCD-Zelle ist in linearer Verlängerung der *C-Trap* (Abbildung 26, 11) verbaut. Dabei kann zwischen harter (höhere Energie über kürzere Zeit) oder weicher Fragmentierung (niedrigere Energie über längere Zeit) gewählt werden. Anschließend kühlen die Produktionen ab und können vermessen werden oder noch weitere Stufen der Fragmentierung eingehen.

Im Gegensatz dazu führt *pulsed Q-dissociation* (PQD) zu anderen Fragmentmustern. Hierbei wird ein bereits zum Isolieren bereites Ion aktiviert und, bevor erste Fragmentierung eintritt, auf einen möglichst geringen *q*-Wert gebracht. In dieser harschen Variante behalten Produkt-Ionen Energie aus der ursprünglichen Anregung zurück und können in weiteren Stufen fragmentieren. Dies wird meist bei der Analyse von Peptiden und Proteinen eingesetzt.^[224]

Es ist außerdem möglich, einen Pseudo-Neutralverlust zu messen, indem man „*source CID*“ durchführt. Hierbei werden Kollisionen zwischen Ionen und Hintergrundgas unter Einsatz eines erhöhten Spannungsgradienten in Ionenquellen, die bei Normaldruck arbeiten, ausgenutzt, um die Ionen zu aktivieren. Anschließend wird der Ladungszustand der Ionen analysiert und nach Paaren gesucht, die sich genau in der Massendifferenz der gesuchten funktionellen Gruppe unterscheiden.^[231]

Darüber hinaus lässt sich eine ETD-Zelle integrieren, die zunächst Stickstoff durch einen Elektronenstrahl anregt. In der ETD-Zelle wird nun mittels des angeregten Stickstoffs

Fluoranthren aktiviert. Dieses wird in der Ionenfalle mit den Mutterionen zur Reaktion gebracht und resultiert in anderen Peptidfragmenten. Die bekannten b- und y-Fragmente (Bruch der Peptidbindung) werden überlagert von c- und z-Fragmenten (Bruch der Bindung zwischen Amidgruppe und α -Kohlenstoffatom). Das ist besonders für die Analytik von Phosphorylierungen von Vorteil.



4 Ziel der Arbeit

Der zentrale Punkt der Arbeit sollte die Analyse von TLS-Polymerasen und den von ihnen adressierten DNA-Schäden sein. Dies sollte hauptsächlich durch Co-Kristallisation der Polymerasen mit geschädigter DNA erreicht werden. Weitere Daten sollten durch Primer-Verlängerungsstudien und durch spezifische Inhibitoren erhalten werden.

In einem zweiten Schwerpunktthema der Arbeit sollten neue Methoden der positionsspezifischen Modifikation von Proteinen durch Amber-Suppression und Click-Chemie entwickelt und etabliert werden. Durch diese Techniken sollten im nächsten Schritt TLS-Polymerasen orthogonal markiert oder verändert werden.

Dazu ist im Weiteren ein umfassendes Analytik-System notwendig. Hierzu sollte die vorhandene LTQ Orbitrap XL und die zugehörige Dionex Ultimate-3000 Nano zur Analytik von Trypsin-verdauten Proteinproben und vollständiger Proteine optimiert werden.



5 Ergebnisse

5.1 Co-Kristallisation von *Y-Familie-Polymerasen* und DNA

5.1.1 Expression und Reinigung von humaner DNA-Polymerase κ

Es wurde zunächst eine verkürzte Version von humaner Polymerase κ (Polk_s, Aminosäuren 19 – 526) durch PCR mit den Primern PolKs_SG_FW und PolKs_RV erzeugt. Diese wurde per Stargate®-Klonierung (IBA, Göttingen) in das pPSG-IBA33-Expressionsplasmid (C-terminaler His-Tag) eingebaut (Abbildung 27). Das anschließend translatierte Polypeptid wird als Polk_s 33 bezeichnet. Dieses Produkt wurde hergestellt, um eine stabile und einfach zu handhabende Version von humaner Polymerase κ zu erhalten. Da die Aminosäuren 1-18 nicht essentiell für die Aktivität des Enzyms sind, allerdings leicht degradieren, wurden diese weggelassen. Aminosäure 526 ist als typischer Endpunkt der katalytischen Domäne in der Literatur akzeptiert.^[86] Somit ergibt sich ein Endprodukt (59,0 kDa; Abbildung 27), welches neun zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus der Polymerase aufweist (GSA als Platzhalter und die Histidinsequenz).

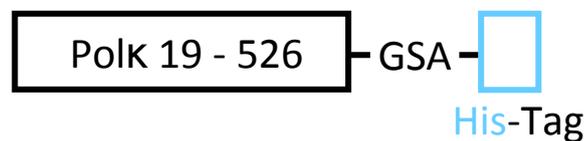


Abbildung 27: Expressionsprodukt aus pPSG-IBA 33 Polk_s (Polk_s 33).

Die Expression erfolgte per Autoinduktion bei 25 °C im Rosetta-2-(DE3)-Stamm. Die Zellyse wurde unter nativen Bedingungen per *french press* und die Reinigung mittels einer Ni-Affinitätschromatographie (Abbildung 28, Abbildung 29) durchgeführt. Die Säulenkapazität wurde so gewählt, dass sie nicht die vollständige Polymerasemenge binden kann. So wird ein zusätzlicher Reinigungseffekt erreicht, da unspezifische Bindungspartner verdrängt werden. Zusätzlich erfolgte die Bindung unter dem Einfluss von 20 mM Imidazol, was ebenso die Spezifität der Säulenmatrix für Poly-Histidin-Motive erhöht.

Die Polymerase-enthaltenden-Fraktionen wurden vereinigt und per Ultrazentrifugation auf 2 ml Gesamtvolumen konzentriert.

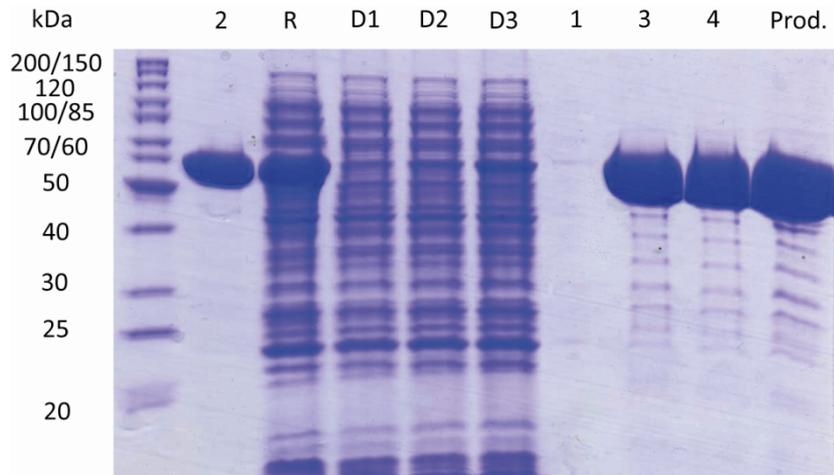


Abbildung 28: SDS-PAGE-Analyse einer Polk_s-Reinigung auf einer Ni-NTA-Säule (R: Rohextrakt (2,5 µl); D1: Durchfluss zu Beginn des Probenauftrags; D2: Durchfluss bei der Hälfte des Probenauftrags; D3: Durchfluss zum Ende des Probenauftrags (je 2,5 µl); 1 – 4: Fraktionen des Hauptmaximums (siehe Abbildung 29, je 2,5 µl); Prod.: Konzentriertes Endprodukt (1 µl).

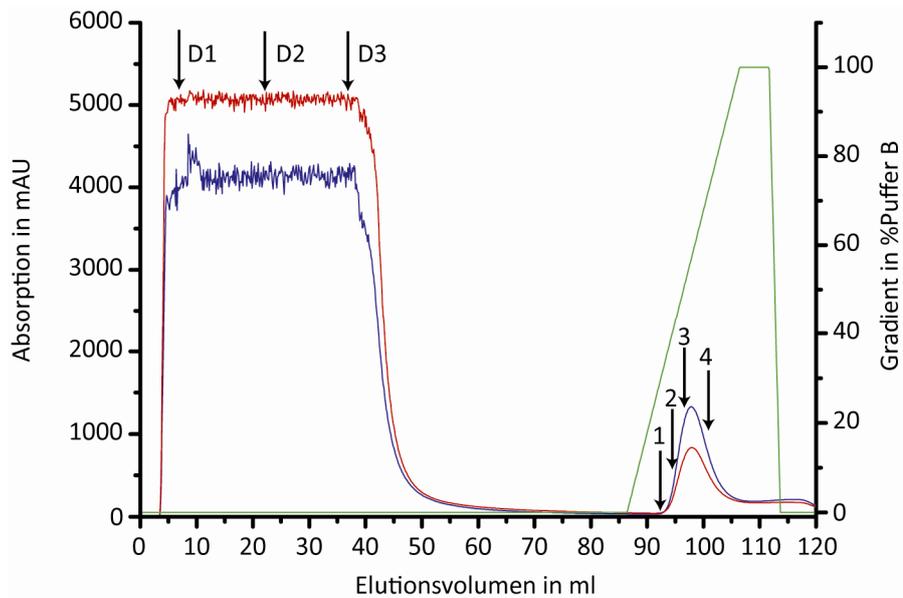


Abbildung 29: Elutionsspektrum der Reinigung von Polk_s 33 auf einer Ni-NTA-Säule; D1 - D3: Durchfluss; 1 - 4 Schnitt durch das Elutionsspektrum des Produktmaximums; Wellenlängen: 254 nm (rot); 280 nm (blau).

Die gewünschten Fraktionen wurden gesammelt (Prod., Abbildung 29) und auf eine Gelfiltration (Superdex 200) aufgetragen (Abbildung 30, Abbildung 31). Es stellte sich nicht der gewünschte Reinigungseffekt ein, allerdings konnte die Probe schonend auf die Pufferbedingungen eingestellt werden. Der fehlende Reinigungseffekt kann durch eine kontinuierliche Degradierung der Polymerase auf der Säule erklärt werden. Diese konnte auch

durch Arbeiten bei 4 °C und Stabilisierung durch Glycerin nicht vollständig verhindert werden. Erklärbar ist dies durch die stark geöffnete Form von Polymerase κ , in der die PAD abgespreizt ist, wenn keine DNA gebunden ist. Ein weiterer Grund ist die Instabilität der N-terminalen Klammer, was aber nur die Bildung kürzerer Abbruchstücke zur Folge hätte (Abbildung 30, Prod.).

Die abschließende Konzentrierung wurde per Amicon (30 kDa, 15 ml) durchgeführt. Die Ausbeute an Pol κ_s betrug etwa 40 – 60 mg pro Liter Autoinduktionsmedium. Falls eine noch größere Menge benötigt wurde, konnte die Expression in einem Minifors®-Fermenter durchgeführt werden. Durch einen stabilen pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Zusatz von Nährstoffen wurde in der exponentiellen Wachstumsphase eine höhere Menge an Zellmaterial generiert, wobei die Menge an Protein pro Zelle vergleichbar zur Schüttelkultur blieb. Es wurden Zelldichten von bis zu OD₆₀₀ = 15 in 3 l Flüssigkultur ermöglicht. Dadurch konnte eine Steigerung der Produktmenge von 1 mg/l (IPTG Induktion) auf bis zu 50 mg/l erreicht werden.

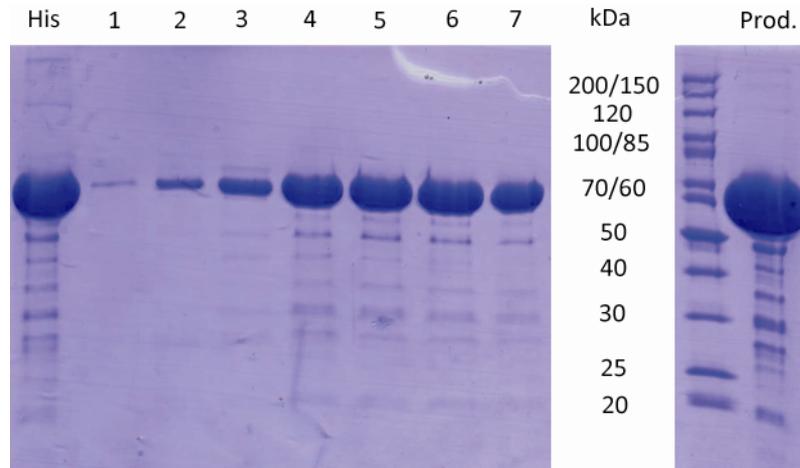


Abbildung 30: SDS-PAGE einer Pol κ_s -Reinigung auf einer Superdex® 200-Säule (Fraktionen 1 – 7 zeigen einen Schnitt durch das Hauptmaximum aus Abbildung 31); Prod.: Konzentrierte vereinigte Fraktionen 3 – 7.

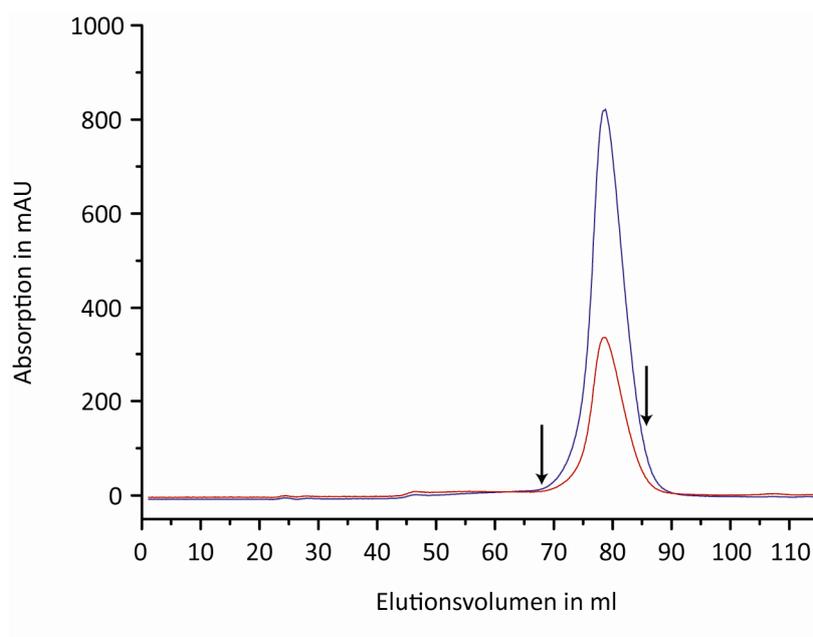


Abbildung 31: Elutionsspektrum der Reinigung von Polymerase κ_s durch eine Superdex S 200-Säule; Fraktionen 1 – 7 sind gleichmäßig zwischen den Pfeilen verteilt; Wellenlängen: 254 nm (rot); 280 nm (blau).

5.1.2 Kristallisation von humaner Pol κ_s

Die Polymerase wurde wie oben beschrieben gereinigt und in Proteinpuffer überführt. Das Produkt wurde in einem Vorkristallisationstest (Hampton Research PCT HR2-140) eingesetzt, wobei sich eine maximal lösliche Konzentration mit leichtem Präzipitat von 30 mg/ml (0,5 mM) ergab.

DNA-Schäden, die von humaner Polymerase κ auch *in vivo* adressiert werden, sind das AAF (Acetylaminofluoren) und in geringerem Anteil auch das 1,2-GG-Cisplatin-Addukt. Ebenso ist das CPD von Interesse, da es in *knock-out*-Studien von Polymerase η deren Aufgabe übernimmt, was in erhöhter Mutagenizität dieses DNA-Schadens resultiert. Zunächst sollten in ersten Kristallisationstests vor allem CPD und AAF geschädigte DNA-Stränge verwendet werden.

Für erste Tests orientierten sich die Ansätze an der Arbeit von Lone *et al.*^[86]

Tabelle 2: Protein-DNA-Lösung zur Kristallisation von Pol κ_s mit ungeschädigter DNA

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
Pol κ_s	60 mg/ml (1 mM)	13 μ l	30 mg/ml (0,5 mM)
DNA	0,72 mM	11,7 μ l	0,65 mM
dNTP	100 mM	1,3 μ l	10 mM

Da sich hierbei keine Kristalle ergaben, wurde ein Kristallisationsscreening (Bedingungen AJ1/AJ2) an der *Protein Crystallization Core Facility* des MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Dabei wurden je 500 Bedingungen zur Co-Kristallisation von Polk_s mit AAF- und CPD-DNA-Strängen getestet. Auf Grund des auch hier negativen Ergebnisses wurde versucht, eine näher an den Wildtyp angepasste Form der Polymerase zu generieren.

5.1.2.1 Konstruktion der neuen Polymerase-Expressionsplasmide

Es wurden zwei Ziele mit den neuen Vektoren forciert: Zum einen sollte eine genauere Abbildung der katalytischen Domäne von Polk_s erzeugt werden, zum anderen sollte versucht werden, ein noch reineres Proteinprodukt zu erhalten.

Dabei sollte besonders der N-Terminus der Polymerase nicht verändert werden, da dieser besonders wichtig für die katalytische Aktivität ist. Hierfür wurde die Polymerase mit zwei unterschiedlichen Affinitätsmotiven am C-Terminus versehen, die durch eine TEV-Protease abspaltbar waren. Das Molekulargewicht des ungeschnittenen Produkts beträgt 61,5 kDa. Somit besteht das Endprodukt (58,8 kDa) nach der Restriktion aus Polymerase κ 19 – 526 und den sechs überzähligen Resten der Schnittsequenz der TEV-Protease (Abbildung 32, pPSG-Polk_s-IBA33X).



Abbildung 32: Proteinkonstrukt für die Expression von Polymerase κ_s 33X.

Allerdings könnte der N-Terminus durch eine Zusatzsequenz vor Degradierung geschützt werden und vor der Kristallisation durch eine Protease wieder freigesetzt werden.

Dabei wurden beide Termini der Polymerase mit Motiven versehen. Es wurde kein Platzhalter zwischen TEV- und Polymerase-Sequenz eingesetzt, um den N-Terminus relativ unverändert zu belassen. Somit sollte der Erhalt der vollständigen Polymerasesequenz (Molekulargewicht: 61,8 kDa (ungeschnitten), 59,6 kDa (geschnitten)) ermöglicht werden (Abbildung 33, pPSG-Polk_s-IBA43).

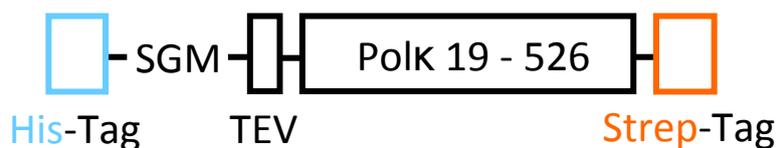


Abbildung 33: Polymerase κ exprimiert aus pPSG-Pol κ_s -IBA43 mit einer Tripeptid-Brücke zwischen His-Tag und TEV-Sequenz.

Das für den pPSG-Pol κ_s -IBA33X verwendete Genkonstrukt wurde durch eine doppelte PCR-Amplifikation erreicht. Zunächst wurde ein aus humaner cDNA gewonnenes Polymerase- κ -Gen mit den Primern PolK κ_s _SG_FW und PolK κ_s _TEV_RV_SG amplifiziert, gefolgt von einer PCR mit PolK κ_s _SG_FW und PolK κ_s _CTEV_Strepadd_SG. Das erhaltene PCR-Produkt wurde per Elektrophorese gereinigt und durch eine Stargate®-Klonierung in einen pPSG-IBA33 Vektor eingebracht.

Alternativ wurde ein beidseitig modifiziertes Konstrukt erstellt. Die PCR wurde mit den Primern PolK κ_s _TEV_FW_SG und PolK κ_s _SG_RV durchgeführt. Das gereinigte Produkt wurde in einen pPSG-IBA43-Expressionsvektor überführt. Transformation und Expression erfolgten analog zum pPSG-IBA33.

5.1.2.2 Reinigung von Pol κ_s aus IBA33X

Die Zellyse wurde durch Aufschluss per *french press* gewährleistet. Die erste Reinigungsstufe wurde ebenso wie zuvor beschrieben durch eine Ni-NTA-Säule durchgeführt. Das erhaltene Produkt wurde durch eine Streptavidin-Säule gereinigt und durch einen TEV-Protease-Verdau in eine wildtyp-nahe Form gebracht. Dafür wurde der in Tabelle 3 gezeigte Ansatz verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines TEV-Verdaus von Polymerase κ_s 33X

Bezeichnung der Lösung	Verhältnis der Lösung
Polymerase κ (5 mg/ml) in StrepB	3 ml (60 %, v/v)
TEV-Protease (1,3 mg/ml) in TEV-Lagerpuffer	0,5 ml (10 %, v/v)
NaCl (220 mM)	1,5 ml (30 %, v/v)

Der Ansatz wurde gewählt, da Polymerase κ in niedrigen Salzlösungen (< 150 mM) instabil wird. TEV-Protease dagegen zeigt höchste Aktivität in sehr niedrigen Salzkonzentrationen und bei 500 mM NaCl sinkt die Aktivität unter 50 %. Daher sollte der oben gezeigte Ansatz ermöglichen, dass durch die Einstellung auf etwa 160 mM NaCl sowohl die Integrität von Polk als auch TEV-Protease gewährleistet wird. Außerdem sollte der Glycerin-Gehalt bei einem optimalen Verhältnis von Polk zu TEV-Protease (20:1; n/n) gering gehalten werden (5 %). Zusätzlich hatten die gewählten Bedingungen den Vorteil, dass der Gesamtansatz in einem einzigen Schritt durch eine Ni-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte. In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass die TEV-Protease vollständig von der Polymerasefraktion abgetrennt werden kann. Da nur geringe Mengen Polymerase an die Säule binden, ist von einer sehr hohen Effizienz des Verdaus auszugehen.

Die erhaltenen Fraktionen wurden abschließend per Gelfiltration gereinigt und umgepuffert. Die gezeigten Fraktionen (Abbildung 34, Gelfiltration G-75) wurden gesammelt und für spätere Weiterverwendung durch Ultrafiltration konzentriert. Um eine bessere Abtrennung kleinerer Kontaminanten zu ermöglichen, wurde in diesem Fall eine Gelchromatographie mit einem Trennbereich bei niedrigerem Molekulargewicht verwendet (10 – 80 kDa), da das doppelte Affinitätsprinzip höhermolekulare Verunreinigungen bereits effizient abtrennt.

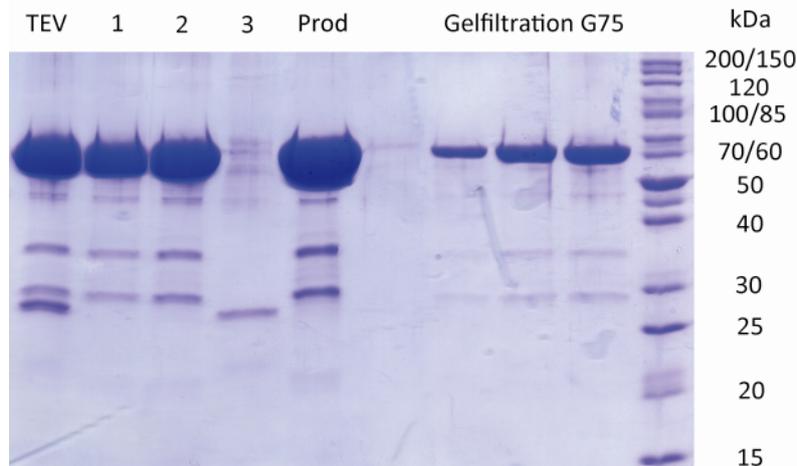


Abbildung 34: SDS-PAGE der Fraktionen des Elutionsspektrums eines TEV-Verdaus auf einer Ni-NTA-Säule und der nachfolgenden Gelfiltration; TEV: Reaktionsmischung des TEV-Protease-Verdaus; 1 und 2: Durchfluss der Ni-NTA-Säule; 3: Elutionsmaximum der Ni-NTA-Säule (siehe Abbildung 35); Gelfiltration G75: Elutionsmaximum der folgenden Gelfiltration (Spektrum nicht gezeigt).

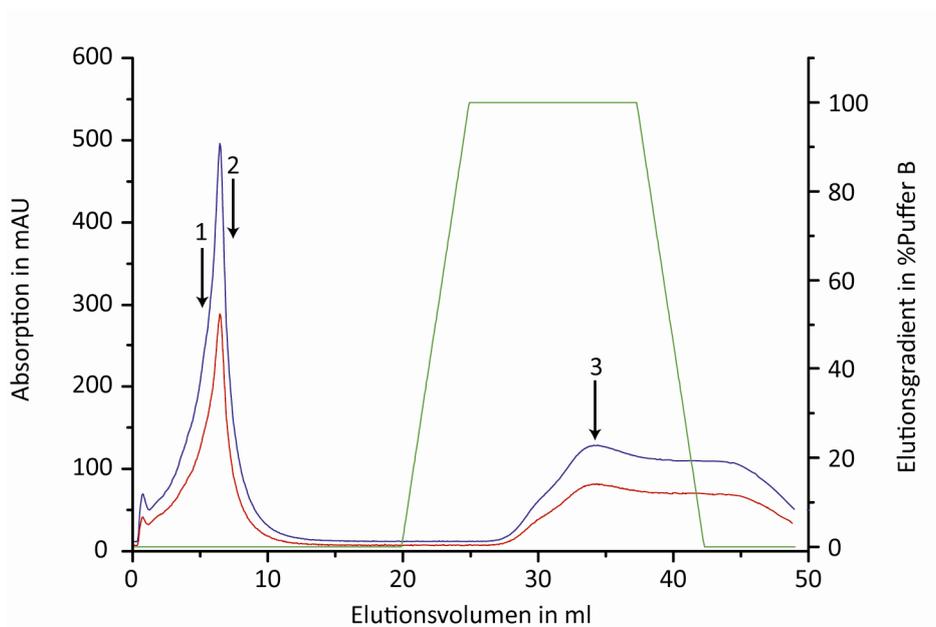


Abbildung 35: Elutionsspektrum eines TEV-Verdau von Polymerase κ_s 33X getrennt auf einer Ni-NTA-Säule; 1, 2: Durchfluss der Ni-NTA-Säule; 3: Elutionsmaximum der Ni-NTA-Säule; Wellenlängen: 254 nm (rot); 280 nm (blau).

5.1.2.3 Kristallisation des Polk_s-33X-Proteins

Um den Verbrauch an synthese- oder reinigungsintensiven geschädigten DNA-Strängen wie AAF oder cisplatin-Addukten gering zu halten, wurde zunächst ein ungeschädigter DNA-Strang zu weiteren Kristallisationstests verwendet (Polk-cry_13nt_ddC; AAF_template_noles, Abbildung 36), der bereits in der Literatur eingesetzt wurde.^[86] Außerdem wurde ein höheres DNA-Protein-Verhältnis von 3 : 1 statt zuvor 1,3 : 1 benutzt.

```
GGG GGA AGG ACT ddC
CCC CCT TCC TGA GGA TCC
```

Abbildung 36: Sequenzen der ungeschädigten DNA-Stränge zur Kristallisation mit Polymerase κ .

Tabelle 4: Protein-DNA-dNTP-Stammlösung zur Kristallisation von Polymerase κ

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
Polk _s	60 mg/ml (1 mM)	13 μ l	30 mg/ml (0,5 mM)
DNA	1,67 mM	11,7 μ l	1,5 mM
dNTP	100 mM	1,3 μ l	10 mM

Die Reservoirbedingungen wurden auf Basis von bereits erfolgreichen Bedingungen ausgewählt.^[86] Erste Tests zeigten, dass NH₄OAc bessere Ergebnisse als KOAc versprach. So wurde nur NH₄OAc eingesetzt und ein feinerer Präzipitangradient gewählt.

Tabelle 5: Detail-Kristallisationsstudie von Polκ_s 33X im Komplex mit DNA

	1	2	3	4	5	6
A	13 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	13,4 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	13,8 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	14,2 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	14,6 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	15 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc
B	15,4 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	15,8 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	16,2 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	16,6 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	17 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc	17,4 % PEG 5000 MME 0,1 M NaCl 0,2 M NH ₄ OAc

Es bildeten sich Kristalle, die sehr groß (bis zu 1 mm) wurden. Allerdings waren die Kristalle auch sehr dünn und stark sternförmig verwachsen. Die Kristalle wurden in Kryolösungen eingefroren, die Mutterlösung mit entweder 10 – 30% Polyethylenglykol oder 10 – 30 % PEG 1500 MME enthielt.

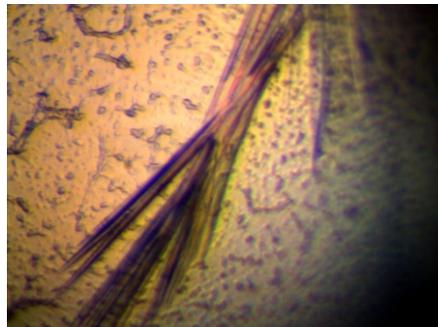


Abbildung 37: Kristalle von Polymerase κ_s 33X im Komplex mit ungeschädigter DNA.

Die Kristalle wurden an der Strahlenquelle PXIII am Synchrotron in Villigen (*Swiss light source*, SLS, Paul-Scherrer-Institut, Villigen, SUI) von Dr. Sabine Schneider gemessen. Die erhaltenen Beugungsmuster ergaben eine unzureichende Auflösung zwischen 5 und 6 Å. Aufgrund dieser Befunde wurde das zweite Konstrukt, pPSG-Polκ_s 43, näher untersucht.

5.1.2.4 Reinigung von Polk_s aus IBA43

Die Expression von Polk_s aus dem IBA-43-basierten-Plasmid erfolgte analog zu der oben beschriebenen Expression mittels Autoinduktion von Polk_s 33.

Das resuspendierte Pellet wurde mittels *french press* aufgeschlossen. Die erste Reinigungsstufe wurde als gekoppelte Säule aus Ni-NTA- und Streptactin-Säule entwickelt (s. Kapitel 7.2.4.3), wodurch sehr reines Protein gewonnen werden konnte (Abbildung 38).

Hierbei wurde das Protein aus dem Rohextrakt an die Ni-NTA-Säule gebunden, direkt auf die Streptavidinsäule ausgewaschen (Abbildung 38, 120 Minuten) und von dieser als reines Produkt (Abbildung 38, 145 Minuten) isoliert. Nun wurde der TEV-Verdau wie zuvor beschrieben durchgeführt. Durch eine Gelfiltration (Superdex G75) wurden Abbruchfragmente abgetrennt und die Pufferbedingungen für die Kristallisation eingestellt (Polk-Kristallisationspuffer).

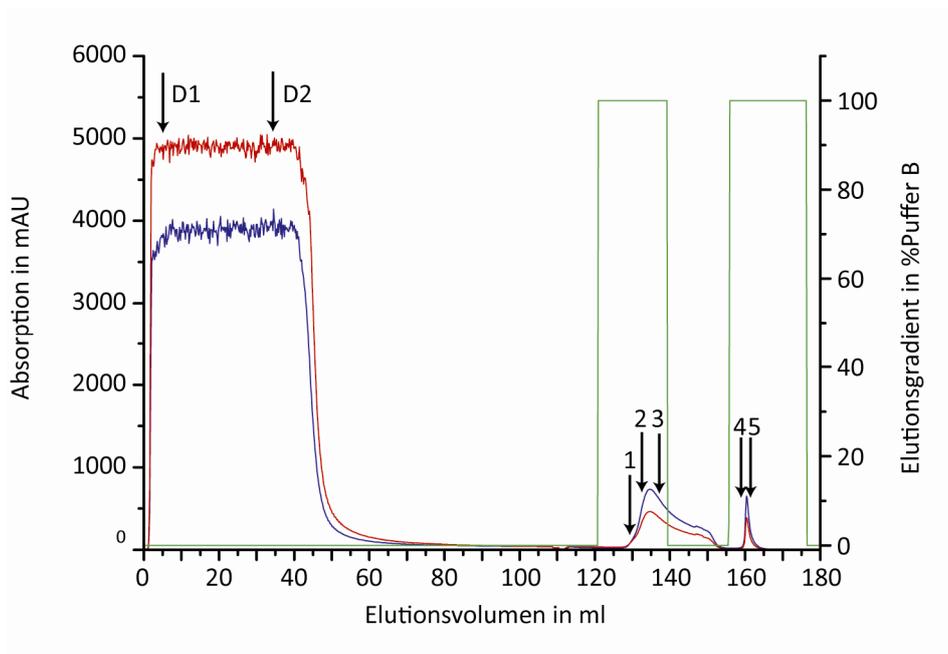


Abbildung 38: Elutionsspektrum von Polymerase κ_3 von einer gekoppelten Ni-NTA-Streptavidin-Säulenreinigung; D1, D2: Durchfluss; 1 – 3 Durchfluss der Streptavidin-Säule; 4, 5: Elutionsmaximum der Streptavidin-Säule; Wellenlängen: 254 nm (rot); 280 nm (blau).

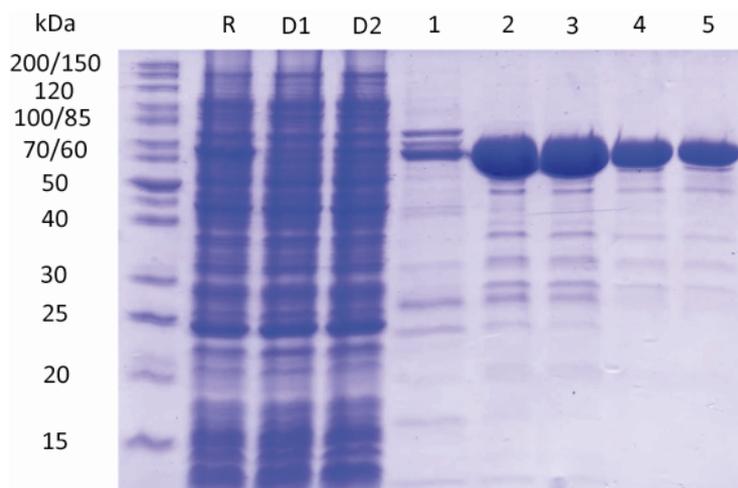


Abbildung 39: SDS-PAGE der Fraktionen der Reinigung von Polymerase κ_s auf einer gekoppelten Ni-NTA-Streptavidin-Säule; R: Rohextrakt; D1: Durchfluss zu Beginn des Probenauftrags; D2: Durchfluss zum Ende des Probenauftrags; 1 – 3: Durchfluss des Eluats der Ni-NTA, welches die Streptavidin-Säule nicht binden konnte; 4, 5: Elutionsmaximum der Streptavidin-Säule.

5.1.2.5 Kristallisation von Pol κ_s 43 mit ungeschädigter DNA

Die Protein-Kristallisationsansätze wurden so vorbereitet wie in Tabelle 6 beschrieben. Die Reservoir-Lösungen orientierten sich an Lone et al.^[86] Die Zeilen A und B enthielten eine halb-konzentrierte Protein-DNA-Lösung (0,25 mM Pol κ_s , 0,75 mM DNA), während in C und D die volle Konzentration (0,5 mM Pol κ_s , 1,5 mM DNA) vorlag.

Tabelle 6: Bestandteile der Protein-Kristallisationsansätze

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
Pol κ_s	60 mg/ml (1 mM)	6,5/ 13 μ l	15/ 30 mg/ml (0,25/ 0,5 mM)
DNA	1,67 mM	5,4/ 11,7 μ l	0,75/ 1,5 mM
dNTP	100 mM	1,3 μ l	10 mM
Puffer	1,1 x	11,8 / 0 μ l	1,0 x

Tabelle 7: Zusammenstellung der Kristallisationsbedingungen für Pol κ mit ungeschädigter DNA

	1	2	3	4	5	6
A/C	11 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M NaCl	12 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M NaCl	13 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M NaCl	14 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M NaCl	15 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M NaCl	16 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M NaCl
B/D	11 % PEG 5000 MME 0,2 M NH ₄ OAc 0,1 M NaCl	12 % PEG 5000 MME 0,2 M NH ₄ OAc 0,1 M NaCl	13 % PEG 5000 MME 0,2 M NH ₄ OAc 0,1 M NaCl	14 % PEG 5000 MME 0,2 M NH ₄ OAc 0,1 M NaCl	15 % PEG 5000 MME 0,2 M NH ₄ OAc 0,1 M NaCl	16 % PEG 5000 MME 0,2 M NH ₄ OAc 0,1 M NaCl

Es bildeten sich in einigen Reservoiren Kristalle, besonders in A2, A3, C2 und C3 (KOAc-Bedingungen) und B5, B6, D5 und D6 (NH₄OAc-Bedingungen). Es ergaben sich bei beiden eingesetzten Protein-Konzentrationen Kristalle (Abbildung 40). Allerdings zeigte sich, dass die Kristalle, die sich bei 30 mg/ml ausbildeten, schneller wuchsen und größer wurden. Die Kristalle wurden, wie vorher bereits beschrieben, eingefroren und ebenfalls an der *swiss light source* von Dr. Sabine Schneider durch Röntgenbeugung analysiert. Es ergab sich eine deutlich bessere Auflösung. Wenn die Kristalle in der Breitseite beschossen wurden, streuten diese bis zu einer Auflösung von etwa 3,7 Å. Allerdings verloren sie mit fortlaufender Drehung in Richtung der planaren Oberfläche an Beugekapazität, so dass eine Auswertung der gesammelten Daten nicht möglich war (Abbildung 42, Abbildung 43).



Abbildung 40: Kristalle von Polymerase κ_s 43 mit ungeschädigter DNA.

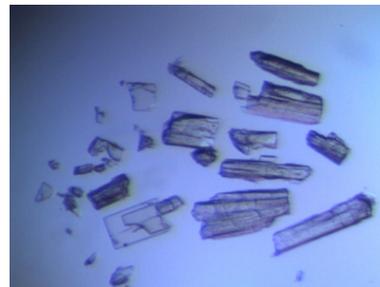


Abbildung 41: Microseeding von Kristallen aus Abbildung 40.

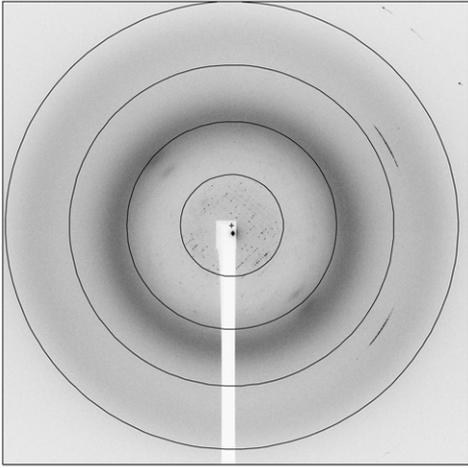


Abbildung 42: Diffraktionsbild von Polk_s 43 Kristallen (Ringe von innen: 7,5 Å, 3,7 Å, 2,3 Å, 1,9 Å).

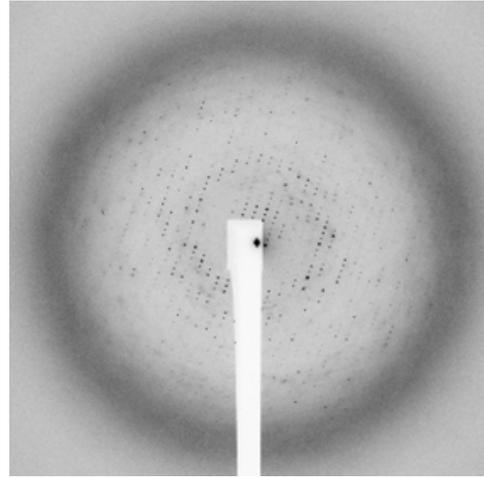


Abbildung 43: Diffraktionsbild von Polk_s 43 Kristallen (Ring etwa 3,7 Å).

Zusätzlich zeigte sich noch das Problem der Verwachsenheit der Kristalle, da oft mehrere Beugungsmuster in einem Datensatz zu sehen waren. Außerdem war partiell eine Überlagerung von mehreren Kristallgittern (Mosaizität) zu erkennen. Als Konsequenz wurde versucht die Bedingungen zu reproduzieren, was aber in allen Fällen ähnliche Ergebnisse generierte.

Es wurde daraufhin die Form des *microseedings* angewendet (Abbildung 41), um besser strukturierte Kristalle zu züchten. Hierzu wurden kleine Bruchstücke von zuvor erhaltenen Kristallen in einen frischen Proteintropfen überführt und bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die sich ergebenden Kristalle sind in Abbildung 41 gezeigt. Allerdings ergaben erste Messungen keine Verbesserung der Auflösung.

Zusammenfassend waren die Kristalle, die sich aus pPSG-IBA33X-PolK_s ergaben, zu fein, um saubere Streubilder zu erzeugen. Daher sind die Bedingungen von PolK_s, die aus dem Expressionsplasmid pPSG-IBA43-NTEV erhalten wurden, der bessere Ausgangspunkt für weitere Kristallisationsstudien mit DNA-Schäden. Der Ansatz könnte durch Einbringen einer zusätzlichen Restriktionsstelle am C-Terminus verbessert werden. Hierbei könnte das Protein vor Degradierung geschützt werden und gleichzeitig zu einer dem Wildtyp noch ähnlicheren Polymerasesequenz optimiert werden. Insgesamt sind diese Parameter von DNA-Polymerase κ in Kombination mit höchster Reinheit entscheidend, um erfolgreich Kristalle zu erhalten. Nach langen Optimierungen wurde als Standardreinigung die letzt gezeigte (Abbildung 38 und Abbildung 39) ausgewählt. Es erwies sich, dass dabei andere Proteine, aber auch

Fragmente von Polymerase κ co-eluierten, welche auch unter verschiedensten Säulen und Bedingungen nicht abtrennbar waren. Dies wies auf eine Instabilität des Proteins hin.

Der vielversprechendste Ansatz, um dies zu vermeiden, ist ein flach gefahrener Imidazol-Gradient mit einer Ni-NTA-Säule. Bei Wahl kleinerer Fraktionsvolumina konnten zu Beginn des Hauptpeaks ein bis zwei Fraktionen gewonnen werden, die extrem hohe Reinheit zeigten (Abbildung 28, Bahn 2). Allerdings war die Proteinmenge aus diesen Fraktionen nicht ausreichend für großangelegte Kristallisationsstudien. Die weiteren Standard-Protein-Fraktionen von Polymerase κ , die in diesen Läufen (Abbildung 28) erhalten wurden, wiesen ebenso eine sehr hohe Reinheit auf, ergaben aber keine Kristalle mit verbesserter Auflösung. Die am besten für Kristallisationsversuche geeignete Methode bleibt die Reinigung des Polymerase- κ -43-Konstruktes. Diese liefert hohe Mengen an reiner Polymerase κ gepaart mit den bisher am besten aufgelösten Kristallen.

Ein Literaturvergleich in Bezug auf die Reinheit von Polymerase κ war schwierig, da die meisten Arbeiten keine Auskunft darüber geben. In einer SDS-PAGE-Analyse (Irimia *et al.*, Abbildung S2) wurde allerdings eine vergleichbare Reinheit mit den in dieser Arbeit gezeigten Polymerase- κ -Fraktionen offenbar.^[232] Daher kann hier nur über den Einfluss der Kontaminationsbanden und Abbruchfragmente spekuliert werden, aber es wäre von entscheidendem Vorteil, die oben erwähnten extrem reinen Fraktionen zu fokussieren. Eine exaktere Aussage könnte die Bestimmung des Verhältnisses an DNA-Protein-Komplex und ungebundenen Komponenten, z. B. mittels Lichtstreuung bzw. Oberflächenplasmonresonanz geben.

Die oben eingesetzten DNA-Stränge orientierten sich an literaturbekannten Ansätzen, da immer DNA-Stränge der Länge 13nt/18nt mit der geschädigten DNA-Base im aktiven Zentrum von Polymerase κ an Position 14 des Templat-Stranges verwendet wurden. Allerdings konnten bisher nur Strukturen gelöst werden, die entweder keinen DNA-Schaden enthielten oder solche, die die normale Struktur der B-DNA nicht entscheidend verändern (z. B. 8-oxo-G). Eine Ausnahme bildet die kürzlich veröffentlichte Struktur von Polymerase κ im Komplex mit CPD. Diese wird anschließend genauer beleuchtet.

Die Kristallisationsbedingungen sind noch optimierbar, da das Protein im verwendeten Puffer (25 mM HEPES 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP) bis zu sehr hohen Konzentrationen (etwa 60 – 80 mg/ml) stabil ist. Zu den Reservoirbedingungen wurden breite Tests angesetzt. Diese wurden zum Großteil im Nanotropfen-Maßstab (100 nl) an der *protein crystallization facility* (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Allerdings war es soweit nicht möglich,

bessere als die zur Kristallisation von ungeschädigter DNA verwendeten Bedingungen zu finden.

Die Bedingungen zur Kristallisation geschädigter DNA wurden von Lone *et al.* adaptiert. Hierbei ergaben sich nach ungefähr 1,5 Jahren Kristalle in einem Ansatz, der CPD geschädigte DNA (*Polk_cryagg_13nt_dC, CPD-Templat*) enthielt. In diesen Strängen ist das Thymidin-Dimer nicht natürlich verknüpft (Phosphodiesterbindung), sondern besitzt eine Formacetalbrücke zwischen den Phosphaten.^[9] Diese Kristalle zeigten ein proteintypisches Streubild, waren allerdings zu klein und ungeordnet um lösbare Strukturdaten zu liefern.

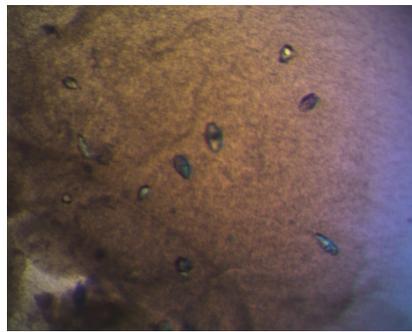


Abbildung 44: Kristalle bestehend aus Polymerase κ_s und CPD-enthaltender DNA.

Das verwendete Protein war Pol κ_s mit C-terminalen 6x-Histidin-Tag (pPSG-IBA33, Abbildung 27) und die Bedingungen für die Kristallisationslösung sind in Tabelle 2 gezeigt. Die Reservoirlösungen wurden an Vasquez-Del Carpio *et al.* angelehnt.^[233] Kristalle bildeten sich besonders in den Tropfen C1 und C2 und in deren angrenzenden Kammern. Diese Ergebnisse geben starke Hinweise, dass ein *microseeding*-Ansatz in Zukunft erfolgreich sein kann, wenn Kristallisationskerne ein schnelleres und strukturiertes Wachstum ermöglichen würden.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Kristallisationsbedingungen für Pol κ mit geschädigter DNA

	1	2	3	4	5	6
A	11 % PEG 5000 MME 0,1 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	12,5 % PEG 5000 MME 0,1 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	14 % PEG 5000 MME 0,1 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	15,5 % PEG 5000 MME 0,1 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	17 % PEG 5000 MME 0,1 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	18,5 % PEG 5000 MME 0,1 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)
B	11 % PEG 5000 MME 0,15 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	12,5 % PEG 5000 MME 0,15 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	14 % PEG 5000 MME 0,15 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	15,5 % PEG 5000 MME 0,15 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	17 % PEG 5000 MME 0,15 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	18,5 % PEG 5000 MME 0,15 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)
C	11 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	12,5 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	14 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	15,5 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	17 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	18,5 % PEG 5000 MME 0,2 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)
D	11 % PEG 5000 MME 0,25 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	12,5 % PEG 5000 MME 0,25 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	14 % PEG 5000 MME 0,25 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	15,5 % PEG 5000 MME 0,25 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	17 % PEG 5000 MME 0,25 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)	18,5 % PEG 5000 MME 0,25 M KOAc 0,1 M Caco (pH = 6,5)

Die Bedingungen sind ein vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Studien. Allerdings war es den Gruppen um Aggarwal und Prakash möglich, mit ähnlichen Bedingungen und einer veränderten DNA-Sequenz die Protein-DNA-Struktur für den CPD-Schaden zu lösen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Stopp der Polymerase nach Replikation der ersten Thymidin-Base des CPD-Schadens durch einen sterischen Konflikt der zweiten Base mit dem Met135 des DNA-Kanals erfolgt. Dieser verhindert die Translokation des DNA-Schadens zum Einbau eines Nukleotids gegenüber des 3'-Thymidins. Somit gibt es eine schlüssige Erklärung, warum humane Polymerase κ Polymerase η in XP-Patienten nicht vollwertig ersetzen kann.^[61]

Weiterhin wurde durch quantenmechanische bzw. molekular-dynamische Rechnungen ein Mechanismus für die Strangverlängerung mittels Polymerase κ postuliert. Dieser stützt sich auf Strukturdaten der oben beschriebenen CPD-Struktur. Hierbei sollen zwei Wassermoleküle die Abstraktion des Protons an der 2'-OH-Gruppe vermitteln, welche dann das α -Phosphat des Triphosphates angreift, den pentavalenten Übergangszustand erzeugt und mit der Abspaltung des Pyrophosphats abschließt.^[234]

5.1.3 Klonierung und Expression von humaner Polymerase ι

Über Polymerase ι ist bisher deutlich weniger bekannt als über Polymerase η und κ . Besonders ihre ungewöhnliche Basenpaarung und die daraus resultierende Schadenstoleranz machen dieses Protein zu einem lohnenden Forschungsobjekt in Bezug auf sperrige und oxidative Schäden.

Eine verkürzte Form humaner Polymerase ι (Pol ι_s) wurde durch die Primer Pol ι_s _SG_FW und Pol ι_s _SG_RV amplifiziert und mittels Stargate®-Klonierung in pPSG-IBA33 integriert. Das Ziel dieses ersten Konstrukts war, basierend auf den Erfahrungen mit Polymerase κ , ein einfaches Expressionssystem zu erzeugen, welches das Protein in großen Mengen produziert. Das Endprodukt (49,3 kDa) enthält die Sequenz von Polymerase ι (1 – 420), einen GSA Platzhalter und eine 6x-Histidin-Sequenz.

Die Expression des Zielproteins erfolgte durch das Autoinduktionsverfahren bei 25 °C in Schüttelkultur. Die Zellyse wurde mittels *french press* durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Reinigung durch eine Ni-NTA-Säule (Abbildung 45, Abbildung 47). Das eluierte Proteingemisch wurde durch eine Ultrafiltration in Sepharose SP-Puffer A überführt und mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt.

Der Durchfluss enthielt große Mengen an Polymerase ι und die Fraktionen 1 und 2 waren von hoher Reinheit (Abbildung 46, Abbildung 48). Das erhaltene Protein (etwa 20 mg/l Schüttelkultur) wurde entweder direkt für Kristallisationsstudien verwendet oder mit 50 % Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

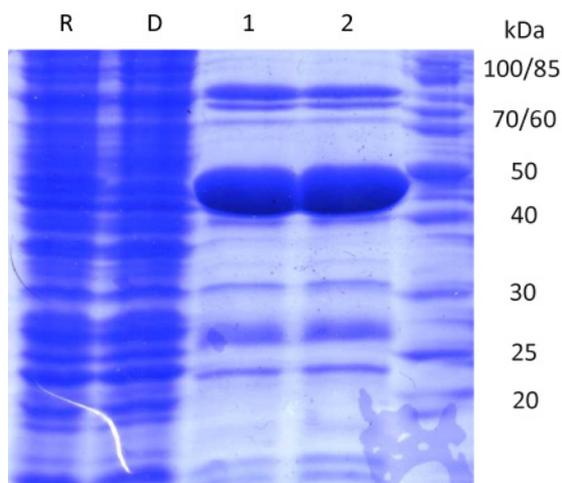


Abbildung 45: SDS-PAGE einer Reinigung von Polymerase ι auf einer Ni-NTA-Säule; R: Rohextrakt; D: Durchfluss; 1, 2: Elutionsmaximum (siehe Abbildung 47).

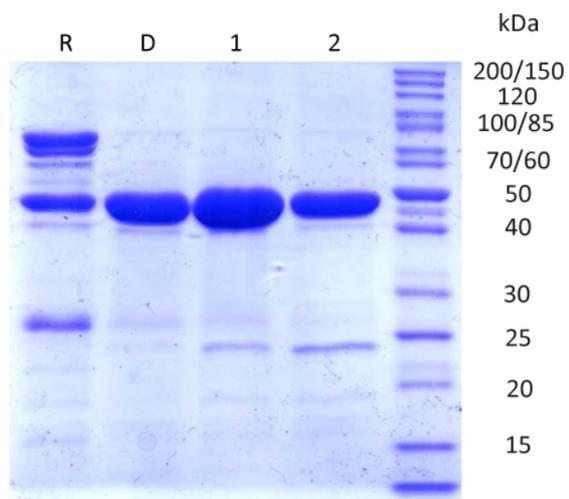


Abbildung 46: SDS-PAGE einer Reinigung von Polymerase ι auf einer Sepharose SP-Säule; R: Produkt der Reinigung mittels Ni-NTA-Säule (1, 2 Abbildung 45); D: Durchfluss; 1, 2: Elutionsmaximum (siehe Abbildung 48).

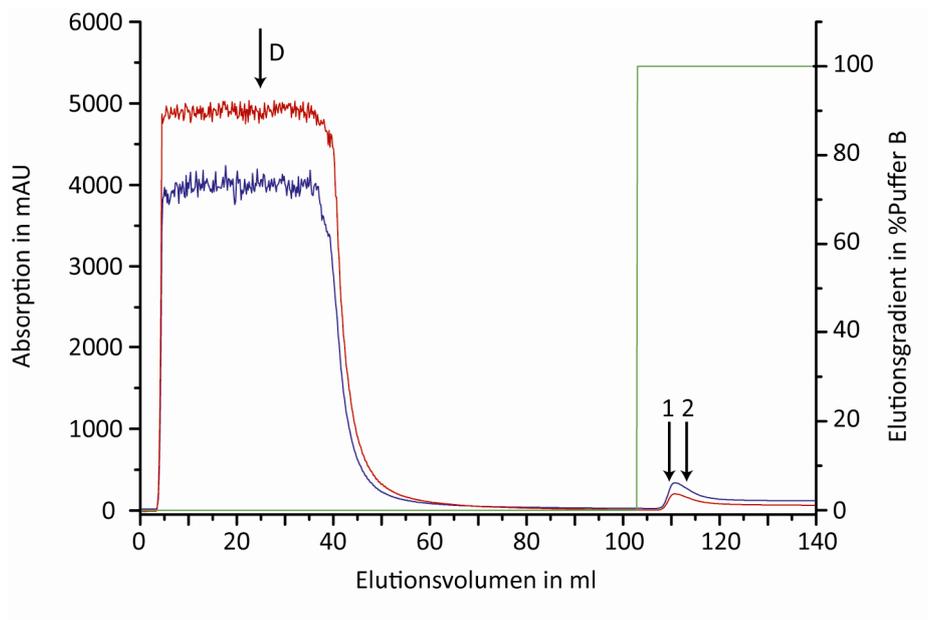


Abbildung 47: Elutionsspektrum von Polymerase ι (1 – 420) auf einer Ni-NTA-Säule; D: Durchfluss; 1, 2: Elutionsmaximum der Ni-NTA-Säule; Wellenlängen: 254 nm (rot); 280 nm (blau).

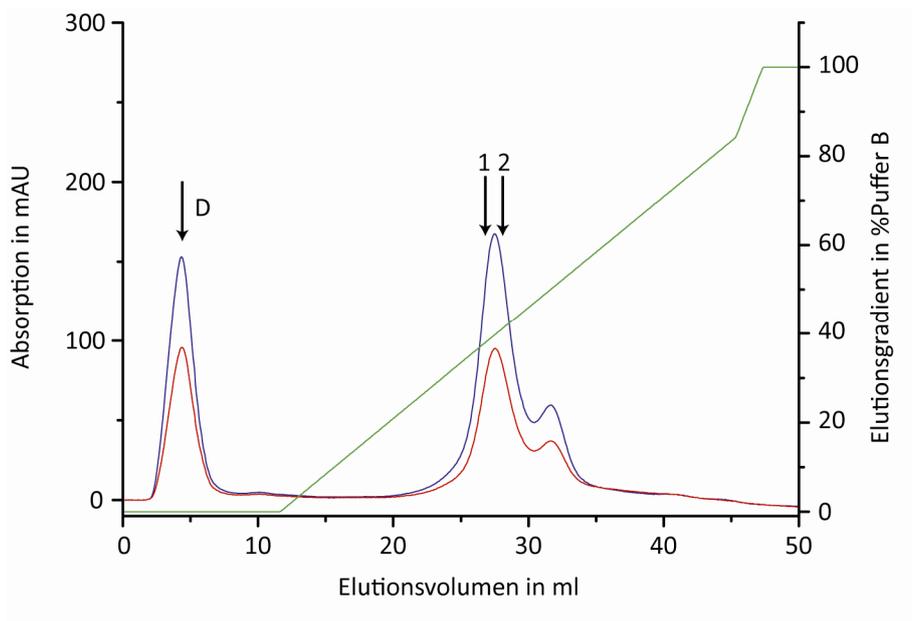


Abbildung 48: Elutionsspektrum von Polymerase ι (1 – 420) auf einer Heparin-Säule; D: Durchfluss; 1,2 Elutionsmaximum (siehe Abbildung 46); Wellenlängen: 254 nm (rot); 280 nm (blau).

5.1.4 Kristallisation von Pol κ _s mit ungeschädigter DNA

Ebenso wie bei Pol κ _s, wurden zunächst Voranalysen mit einem Präkristallisationstest durchgeführt, was eine maximal-lösliche Konzentration von 10 mg/ml anzeigte. Außerdem wurde zu Anfang nur ungeschädigte DNA eingesetzt um erste Anhaltspunkte für Kristallisationsbedingungen zu erhalten.

Der Puffer wurde durch eine Ultrafiltration (Amicon® 30 kDa, 4 ml) eingestellt. Der Puffer und das DNA-Proteinverhältnis wurden exakt wie bei den Versuchen mit Pol κ _s gewählt (Tabelle 2). Die verwendete DNA bestand aus den Strängen *Poli_Primer_ddC* und *Poli_template nolesion* (Abbildung 49).

```
AGG ACC ddC
TCC TGG GGA CT
```

Abbildung 49: DNA-Stränge zur Kristallisation mit Polymerase ι .

Für erste Tests wurden Bedingungen gewählt, die zur Strukturlösung von Polymerase ι im Komplex mit einer Uridin-enthaltenden Doppelhelix (PDB-Code: 3H4D) verwendet wurden.^[235] Dabei zeigte sich, dass die Proteinkonzentration unter diesen Pufferbedingungen etwas zu hoch (10 mg/ml) angesetzt wurde, da sich hauptsächlich schweres Präzipitat bildete. Für weitere Versuche wäre eine Endkonzentration von 5 – 7,5 mg/ml Pol κ _s optimaler.

Somit wurde eine Expressionsmethode für Pol κ _s etabliert, die reines Protein liefert. Außerdem wurden erste Kristallisationstests durchgeführt, die für weitere Versuche mit geschädigter DNA als Ausgangspunkt dienen könnten.

5.2 Analyse der Prozessivität von TLS-Polymerasen

Ein weiterer Punkt, der zur Strukturstabilisierung der Proteinkristalle und somit zu einer verbesserten Auflösung beitragen könnte, ist der Einsatz spezifischer Inhibitoren für Y-Polymerasen. Ebenso könnten diese Inhibitoren Detailinformationen zur Wirkungsweise verschiedener DNA-Schäden auf Polymerasen der Y-Familie liefern. Zusätzlich sind Inhibitoren gegen diese Familie von DNA-Polymerasen für die Krebstherapie interessant, da sie mitverantwortlich für Resistenzbildungen sein können.^[236] Ein typisches Beispiel ist das Überlesen von Cisplatin-schäden durch DNA-Polymerase η .^[74]

Zunächst sollten bereits in der Literatur beschriebene Inhibitoren auf Y-Polymerasen in unseren Versuchsansätzen per Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert werden. Hierzu mussten zunächst geeignete Versuchsparameter ermittelt werden.

5.2.1.1 Voranalysen der Aktivität von Y-Familie-DNA-Polymerasen

Polymerase ι und κ wurden in verkürzten Versionen, wie oben beschrieben, hergestellt. Polymerase η (1 – 513) wurde von Sandra Koch zur Verfügung gestellt. Als zusätzliche Analyse wurde Polt_s in der mutierten Variante Q59A hergestellt. Diese ermöglicht ein Überlesen von T im Templat-Strang, wozu der Wildtyp nicht fähig ist.^[82] Somit kann analysiert werden, wie diese Einschränkung entsteht bzw. welchen Einfluss diese auf das Insertionsverhalten von Polymerase ι hat.

Es wurde eine direkte Basenaustauschmutagenese des pPSG-IBA33-Polt_s-Plasmides mit den Primern Polt_Q59A_FW und Polt_Q59A_RV durchgeführt. Die Expression und Reinigung erfolgte exakt wie für den Wildtyp beschrieben. Die Ausbeute lag bei etwa 5 – 10 mg/l.

Für eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte zunächst eine optimale Konzentration der Polymerasen für Primer-Verlängerungsstudien ermittelt werden. Für die Detektion der Produkte wurden fluoreszenzmarkierte DNA-Primer verwendet, die nach der Reaktion mittels eines Polyacrylamidgels getrennt und auf einem Fluoreszenztisch mit Fluorescein-Filter detektiert wurden.

Rahmenbedingungen wie Konzentrationen an DNA (Primer 2,5 μM , Templat 3,75 μM), Puffer (NEB Puffer 2), dNTPs (4 x 125 μM) und die Reaktionszeit (30 min bei 37 °C) wurden konstant gehalten. Nun sollte die geringste Konzentration an Polymerase ermittelt werden, die eine vollständige Strangverlängerung (DNA Primerkonzentration 2,5 μM) erlaubt. Für Polymerase κ war dies 100 nM und für Polymerase η 125 nM. Dies entspricht jeweils einer Aktivität von etwa 1 U pro Ansatz. Für Polymerase ι konnte dieser Wert nicht exakt bestimmt werden, da diese nur schwach prozessiv ist und keine radioaktiv-markierten Proben verwendet werden konnten. Die geringe Prozessivität von Polymerase ι sollte im Detail untersucht werden, da sie auch sequenzspezifisches Verhalten zeigt.

wirken, mit denen sie interagieren. Somit können sie einen stabilisierenden Einfluss auf das Kristallgitter ausüben und in Röntgenstrukturanalysen die Auflösung beeinflussen.

Es wurden drei literaturbekannte Inhibitoren ausgewählt: 3-*O*-Methylfunicon (**25**) bzw. dessen Derivate (**26**, **27**), β -Sitosteryl-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid (SLG, **28**) bzw. dessen Derivate (**29**, **30**) und Penta-*O*-galloyl- β -D-glukose (PGG, **31**).^[237-239] Rapicon (**26**) wurde als Derivat des Funicons eingesetzt, da untersucht werden sollte, ob der Allylrest und die Methoxygruppe in 3'-Position am Wirkmechanismus beteiligt sind. Ebenso wurde β -Cholesterol-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid (CLG, **29**) anstatt von β -Sitosteroyl-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid eingesetzt. Der Unterschied der beiden Substanzen liegt in einer Ethylgruppe, die in CLG fehlt (**28**, **29**, R²). Es sollte getestet werden, ob diese Gruppe inhibitorisch wirksam ist, da diese Veränderung die Materialkosten massiv verringern könnte.

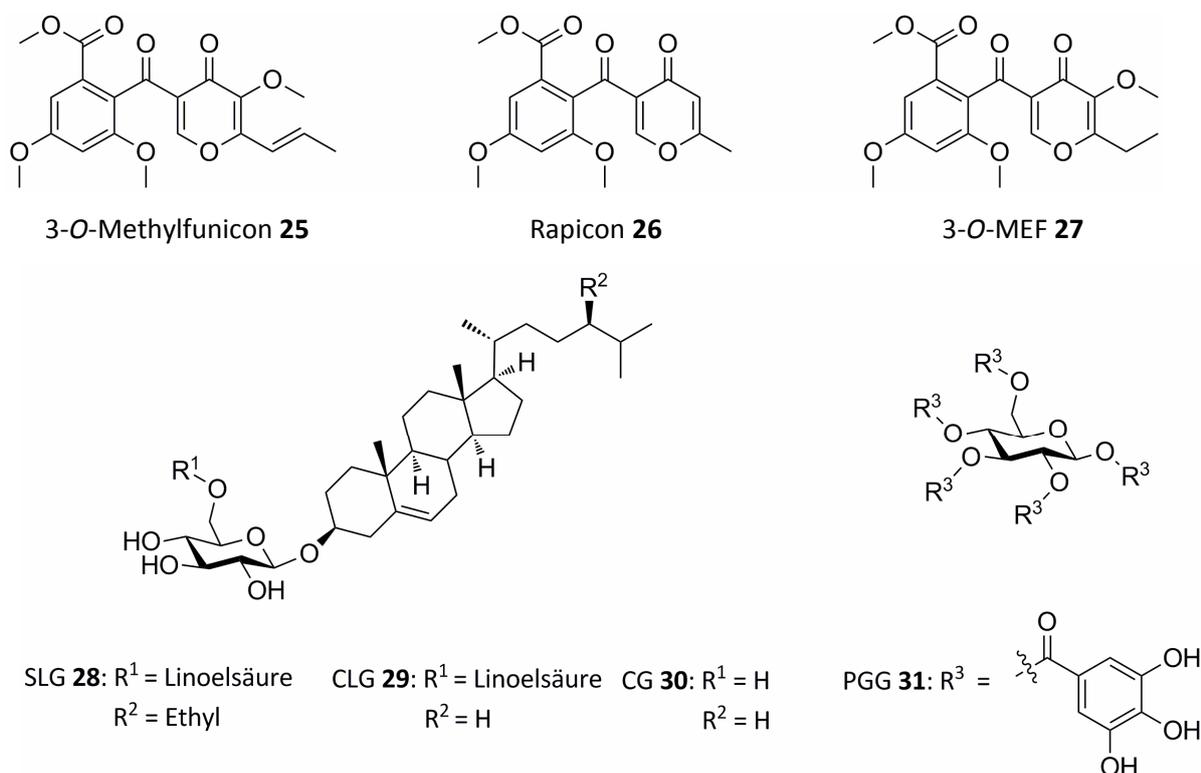


Abbildung 51: Übersicht von Inhibitoren für Polymerasen der Y-Familie (SLG: β -Sitosteryl-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid, CLG: β -Cholesteryl-(6'-*O*-lineoyl)-glukosid, CG: β -Cholesteryl-glukose, PGG: penta-*O*-galloyl- β -D-glukose).

Die Inhibitoren sind Naturstoffe und wurden in den Originalstudien per Extraktionen aus ihren natürlichen Quellen gewonnen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren und deren Derivate wurden von Michael Ehrlich synthetisiert.

In den ersten Tests sollte das Funicon-Derivat **26** und PGG (**31**) untersucht werden. Die Primer-Verlängerungsstudien wurden nach Standardbedingungen durchgeführt.

5' -GCC GGA TGA TCG TGG CGC CAT CGC GAG GTC
 G GTA GCG CTC CAG-Fluo-5'

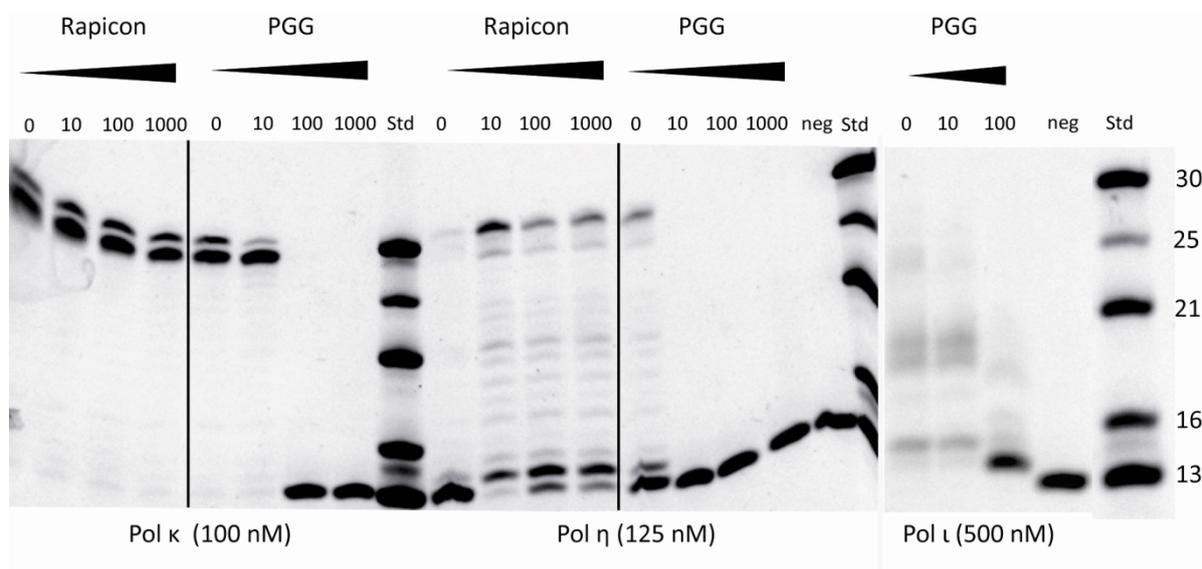


Abbildung 52: Analyse der Polymerasen κ , η und ι durch Primer-Verlängerungsstudien in Gegenwart von Rapicon oder PGG (Konzentraion jeweils 0 – 1000 μM).

Es zeigte sich, dass das Rapicon-Derivat deutlich verminderte Aktivität aufwies. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass der beim Rapicon fehlende Propenyl- und Methoxyrest entscheidend für die Aktivität ist. Ein grober IC_{50} -Wert kann hier mit $>1 \text{ mM}$ des Rapicons für Polymerase κ und η angegeben werden. Für das PGG liegt der Wert etwa bei 5 – 50 μM für Polymerase κ , bei $<10 \mu\text{M}$ für Polymerase η und bei 50 – 100 μM für Polymerase ι . In einer Spur (Pol η , Rapicon, 0 μM) wurde versehentlich eine deutlich zu geringe Polymerasekonzentration eingesetzt.

Die gleichen Analysen sollten nun mit den anderen Inhibitoren durchgeführt werden, um die Aktivität zu bestätigen und um die für die Wirkung essentiellen Gruppen zu erkennen.

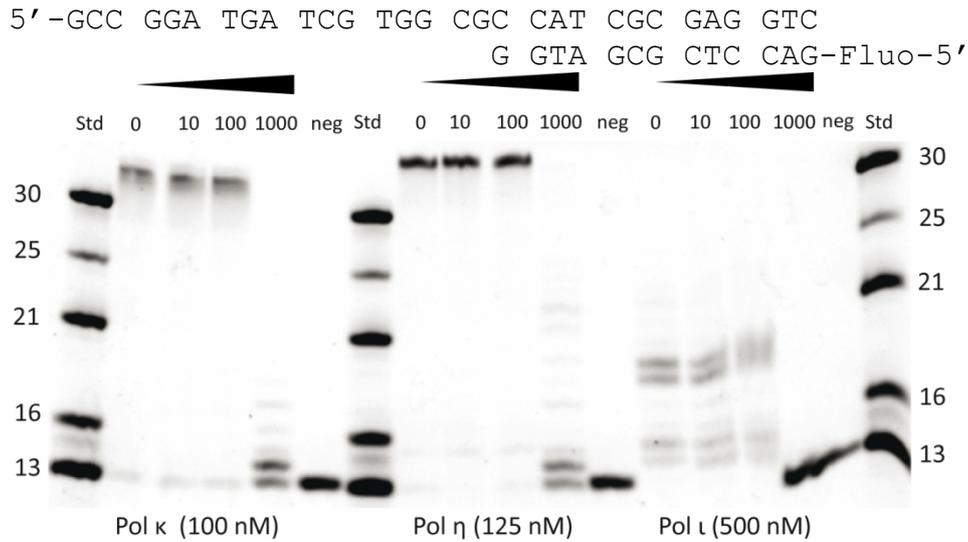


Abbildung 53: Analyse der Polymerasen κ , η und ι durch Primer-Verlängerungsstudien in Gegenwart von CLG; neg: Negativkontrolle ohne aktive Polymerase.

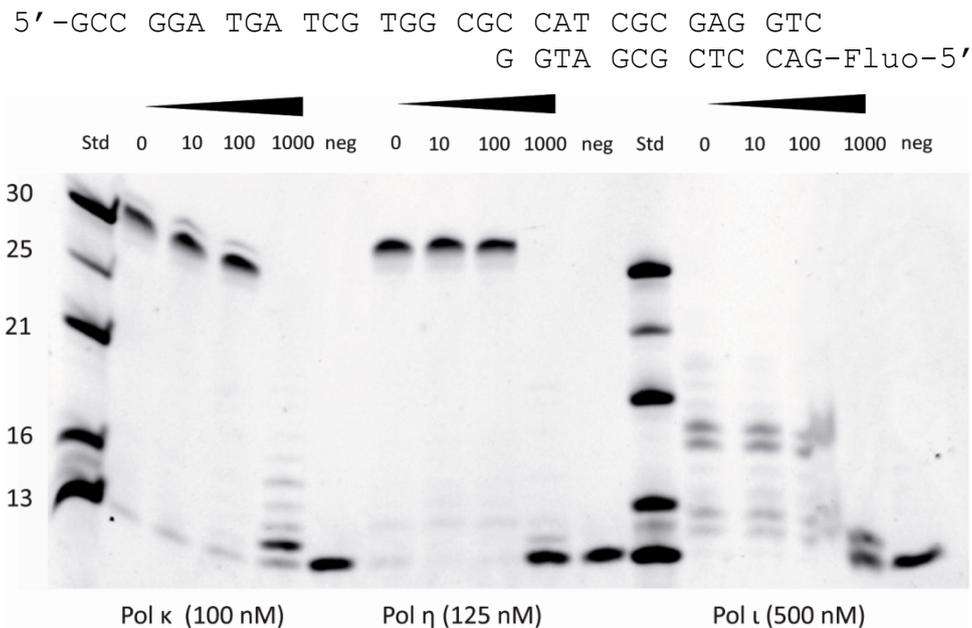


Abbildung 54: Analyse der Polymerasen κ , η und ι durch Primer-Verlängerungsstudien in Gegenwart CG (Konzentration 0 – 1000 μM).

Wie in Abbildung 53 und Abbildung 54 zu sehen, werden alle Polymerasen bei einer Konzentration von 100 – 1000 μM halbmaximal inhibiert. Da sich CLG und dessen Derivat CG nur im fehlenden Lipidrest unterscheiden, zeigt dies, dass die Seitenkette geringe Auswirkungen auf die Aktivität hat, während das Grundgerüst aus Zucker und Steroid die aktive Grundstruktur bildet.

5' -GCC GGA TGA TCG TGG CGC CAT CGC GAG GTC
G GTA GCG CTC CAG-Fluo -5'

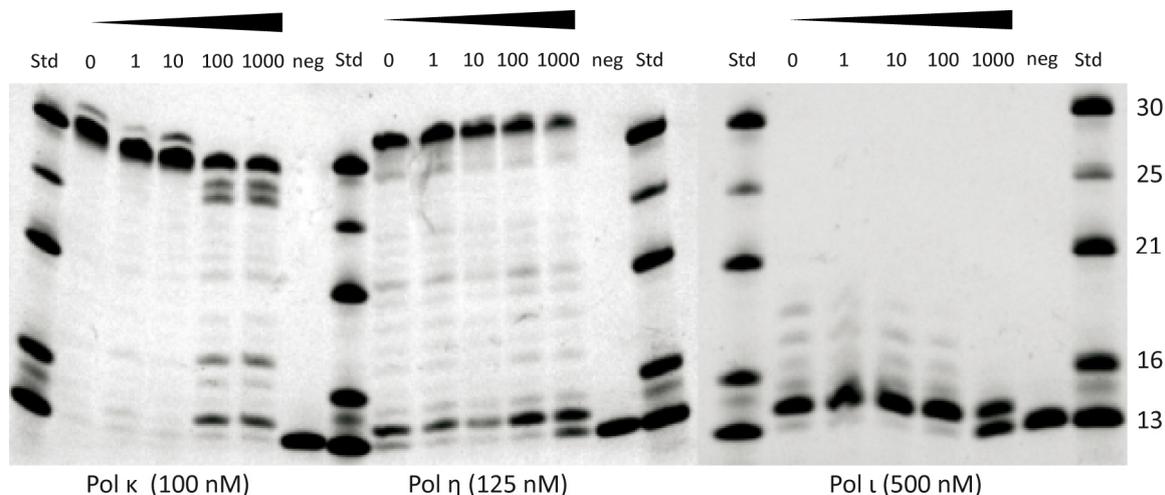


Abbildung 55: Analyse der Polymerasen κ , η und ι durch Primer-Verlängerungsstudien in Gegenwart eines Derivates von 3-*O*-MEF (Konzentraion 0 – 1000 μM).

3-*O*-MEF zeigt eine fast ebenso geringe Aktivität wie Rapicon. Allerdings kann man eine leichte inhibitorische Wirkung gegen Polymerase κ und ι zwischen 100 und 1000 μM erkennen. Somit muss dem Allylrest des 3-*O*-Methylfunicons eine kritische Rolle im Wirkmechanismus zukommen, da sich das 3-*O*-MEF nur minimal von dem literaturbekannten Inhibitor unterscheidet.

Es wurden bereits verschiedene Parameter der Inhibitoren publiziert. Alle Angaben in Tabelle 9 beziehen sich auf humane Polymerase κ .

Tabelle 9: Übersicht der Literaturdaten der verwendeten Inhibitoren

	K_M (Pol κ / dNTP)	IC_{50}	Polymerase κ activity [U]	K_i (nicht kompetitiv für: DNA/Primer; dNTPs)
PGG ^[238]	1,65 μM	30 nM	0,05	15,1 nM 9,3 nM
Methylfunicon ^[237]	2 μM	12,5 μM	0,05	4,4 μM 1,3 μM
SLG ^[239]	2 μM	10,2 μM	0,05	4,2 μM 3,0 μM
Linoelsäure ^[239]	2 μM	28,1 μM	0,05	12,5 μM 6,3 μM

Die starken Unterschiede zu den Literaturwerten der Inhibition sind durch die deutlich höheren hier verwendeten Polymerase- bzw. DNA-Konzentrationen zu erklären. Diese sind auf Grund der unterschiedlichen Technik der Fluoreszenzdetektion im Vergleich zum radioaktiven Zerfall nötig. Wenn man die verwendeten Aktivitäten der DNA-Polymerasen betrachtet, ergibt sich etwa ein Unterschied von Faktor 20 zwischen den in der Literaturansätzen (0,05 U, Tabelle 9) und den hier gezeigten Experimenten (1 U). Um denselben Grad an Inhibition zu erreichen, sollten somit auch die 20-fachen Stoffmengen an Inhibitoren benötigt werden. Wird dies berücksichtigt, liegen die Literatur-IC₅₀-Werte in einer vergleichbaren Relation zu den oben gezeigten Inhibitorstudien.

Ein interessanter Aspekt ist, dass Horie *et al.* den inhibitorischen Effekt von SLG der Kombination aus Fettsäure und Steroid zuschreiben. Es zeigte sich allerdings, dass, wie in Abbildung 54 zu sehen ist, CG vergleichbare Aktivität wie der Gesamtinhibitor CLG aufweist und somit die wirkaktive Gruppe bildete.

PGG die erste Wahl für zukünftige Kristallisationsversuche, da es die stärkste Aktivität der getesteten Inhibitoren aufweist. Eine hohe Menge an ungebundenem Inhibitor könnte das Gitter destabilisieren, falls der benötigte stöchiometrische Überschuss zu groß wäre. Vom Standpunkt der Löslichkeit ist ebenso PGG zu bevorzugen.

In weiteren Primer-Verlängerungsstudien mit verschiedenen Polymerasen und DNA-Schäden könnten nun exakte Daten ermittelt werden, ob eine Enzym- oder Schadensspezifität für die verwendeten Inhibitoren besteht.

Dies kann mit Versuchen durch Gelanalysen (wie oben gezeigt) erfolgen.

Allerdings ist in Zukunft eine deutlich sensitivere Methode nötig, um Aufschluss über Eigenschaften und Wirkmechanismen der Inhibitoren und der DNA-Polymerasen zu geben.

Es soll hierfür, wie bereits von Dr. Martin Münzel durchgeführt, eine adaptierte Form der auf Biolumineszenz basierenden Pyrosequenzierung verwendet werden.^[240]

Prädestiniert für diese Analysen sind verschiedene DNA-Polymerasen (η , κ , ι), die in der Lage sind, DNA-Schäden, welche die DNA-Struktur verändern zu überlesen. Besonders interessant wären hierbei cisplatin, 2-AAF, 8-AAF, Acridin. Außerdem sind oxidative Schäden wie 8-oxo-G, 8-oxo-A, FapyA und FapyG interessant. Ein Teil dieser Analysen ist bereits publiziert und in der Doktorarbeit von Dr. Tim Gehrke verfügbar.^[241]

Eine Auslesemethode, die die Fähigkeit der Polymerase eine Schadstelle zu lesen, direkt in ein Fluoreszenzsignal übersetzt, wurde von Yamanaka *et al.* beschrieben.^[242]

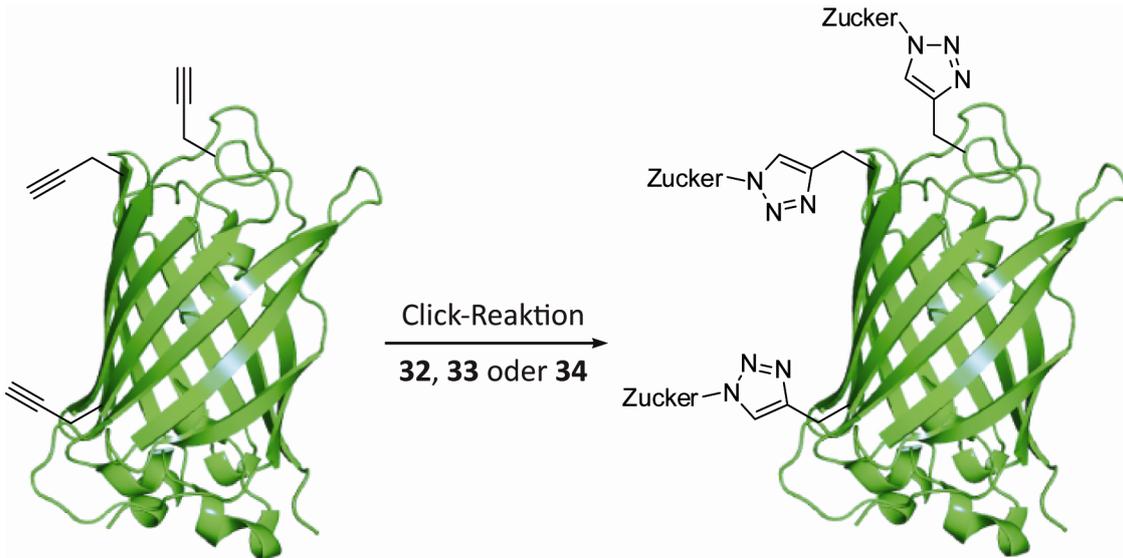


Abbildung 57: Glykosylierung von YFP durch Cu-Click-Chemie.

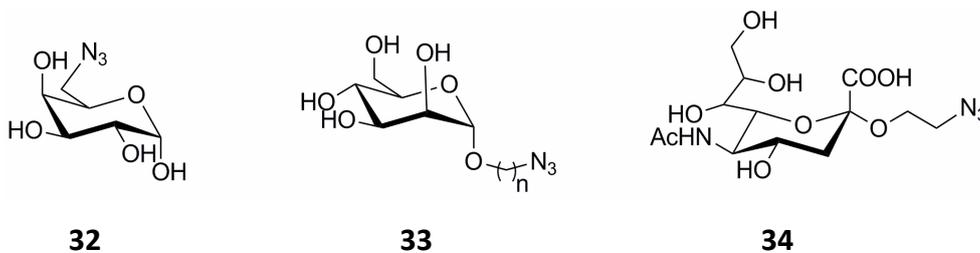


Abbildung 58: Azid-modifizierte Zucker zum Einsatz im Cu-Click.

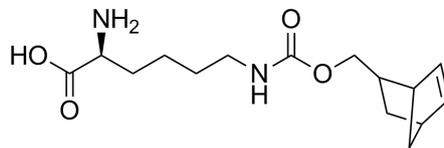
Mit dem gezeigten System war es möglich, stabile Proteine, wie das durch seine Fass-Tertiärstruktur stabilisierte YFP, in einer Cycloaddition zu modifizieren. Hier wurde dies mit drei interessanten Zuckerliganden durchgeführt (eYFP-K27Stopp-K114Stopp-K132Stopp). Die dreifache Suppression war erfolgreich und konnte durch einen Trypsinverdau des Produktes und MS/MS-Analyse der Peptide nachgewiesen werden.^[243]

Allerdings ist es schwierig, dieses System für größere Proteine mit einer labileren Domänenstruktur einzusetzen, da Cu(I) denaturierend wirkt und auch als Zellgift bekannt ist. Daher wurde nach einer neuen Click-Reaktion gesucht, die eine native Form des Clicks in einer kupferfreien Umgebung ermöglicht.

5.3.2 Entwicklung von kupferfreien Click-Varianten an Norbornen

Mit dieser Prämisse wurde in der Arbeitsgruppe Carell eine neue Form des kupferfreien Clicks für Proteine entwickelt, die bereits zuvor erfolgreich für die Modifikation von DNA

eingesetzt werden konnte.^[182, 244] Die Methode basierte auf dem auch von Huisgen verwendeten Norbornen (Huisgens Faktor X), die für ein breites Spektrum an Reaktionen zugänglich sind.^[245]



Norbornen-Pyrrolysine-Analog (**24**)

Abbildung 59: Das Norbornen-Pyrrolysine-Derivat.

Durch Optimierung der Reaktion durch Dr. Milan Vrabel konnten Bedingungen gefunden werden, die einen nativen Click ermöglichten. Auch in Gegenwart von Protein zeigte sich keine Kreuzreaktion.

Die Inkorporation dieser Aminosäure gestaltete sich jedoch problematisch, da der Wildtyp der pylRS keine Aminosäuren toleriert, die größere Reste besitzen als Pyrrolysine selbst. Um die Aminosäure (**24**) effizient in Proteine zu inkorporieren, musste eine neue aa-tRNA-Synthetase evolviert werden.

5.3.2.1 Evolution von pylRS durch iterative Sättigungsmutagenese

Das Ziel war pylRS zu modifizieren und so Klone zu erzeugen, die auch Aminosäuren inkorporieren können, die sterisch anspruchsvoller sind als einfache Pyrrolysinderivate. Hierfür konnte bereits die Variante (Y384F) Anwendung finden, die von Yokoyama beschrieben wurde.^[149] Allerdings war die Fähigkeit dieser Mutante, die Aminoacylierung von pylT mit Norbornenaminosäure **24** zu katalysieren, begrenzt.

Die Effizienz wurde durch eine direkte Quantifizierung der YFP-Fluoreszenz in Zellkultur an einem Tecan-Reader mit dem Niveau des Einbaus der Alkyne-Aminosäure durch *wt*PylRS verglichen. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass diese Mutante keine für die geplanten Experimente nötige Menge an mit Norbornen modifiziertem Enzym produzieren konnte (Abbildung 60).

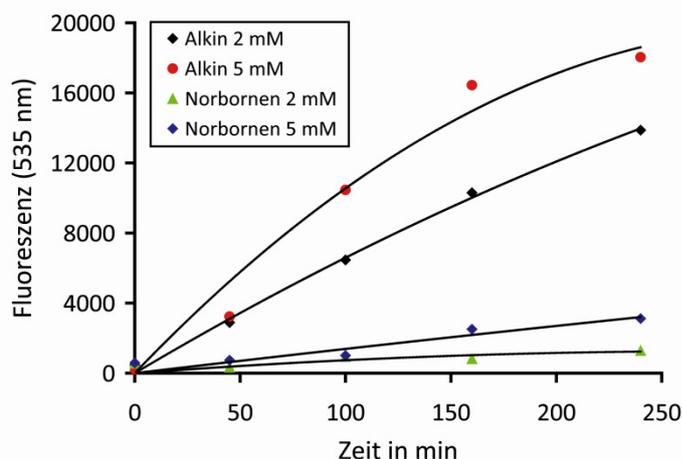


Abbildung 60: Fluoreszenzdetektion der Menge an exprimierten YFP K114Pyl durch einen Tecan-Reader.

Daher sollten im Folgenden mehrere Mutanten, die bessere Eigenschaften in Bezug auf die Inkorporation der zu testenden Pyrrolsinderivate aufweisen, evolviert werden.

Als Methode wurde eine iterative Sättigungsmutagenese eingesetzt, wobei die YFP-Kassette des T7eCo-mutYFP-Plasmids mit einem UAG-Codon versehen wurde.^[246] Alle Arbeiten hierzu wurden von Emine Kaya in der Arbeitsgruppe von Prof. Reetz (MPI Mülheim) durchgeführt.

Es wurden drei Selektionsrunden iterativer Sättigungs-Mutagenese (ISM) durchgeführt und schließlich eine Variante von PylRS generiert, die von besonderem Interesse war (Tabelle 10). Für eine Detailübersicht über alle Arbeiten ist die Doktorarbeit von Emine Kaya zu empfehlen.^[247]

Tabelle 10: Neue Mutanten von pylS zur Inkorporation von neuen Pyl-Derivaten

Klon	Mutationen	spezialisiert für
N VIII D8	Y384F, Y306G, I401R	Norbornen

Die Mutante, die für den Einbau der Norbornen-Aminosäure gefunden wurde, erreichte eine vergleichbare Aktivität wie die der wtPylRS beim Einbau des Alkin-Derivats, was etwa einer Verbesserung um einen Faktor von 10 in der Proteinausbeute (im Vergleich zur Mutante Y384F) entspricht.

5.3.2.2 Optimierung der Menge an tRNA^{Pyl} und PylRS

Das nächste Ziel dieses Projekts war es, in Zusammenarbeit mit Emine Kaya ein System zu entwickeln, welches die Inkorporation von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine in größeren Mengen ermöglicht.

Es wurden mehrere Ideen entwickelt, die Expressionskapazität dieses Systems zu steigern.

Zunächst sollte versucht werden, die *in vivo* präsente Menge an Pyrrolysin-tRNA (pylT) und Pyrrolysin-Aminoacyl-tRNA-Synthetase (PylRS) zu erhöhen.

Hierzu wurde das ursprüngliche Plasmid (CoExpr MmpylST), das für alle bisherigen Versuche eingesetzt wurde, durch eine dreifache anstatt einer einzigen Kopie von pylT, ergänzt. Das Produkt dieser Klonierung war T7eCo. Beide Plasmide basieren auf dem stark replizierten Plasmid pET-Duet-1 (Novagen, Darmstadt).

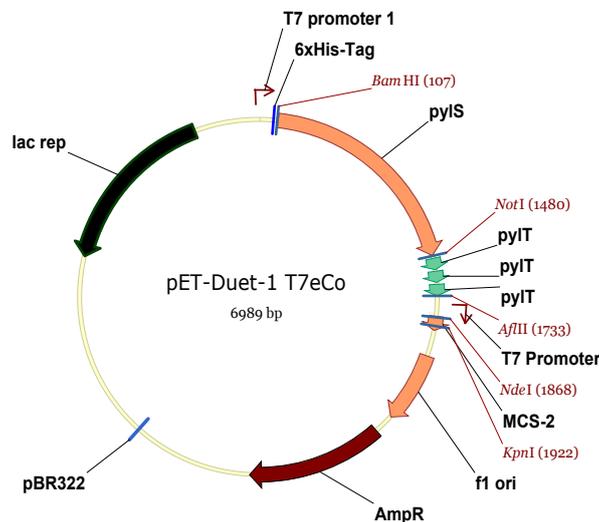


Abbildung 61: Vektorkarte des Co-Expressionsplasmids für die Suppression des Amber-Codons durch Pyl-Derivate (T7eCo).

Für die Analyse der Effizienz dieser Maßnahme zur Suppressionsverbesserung wurde der Vektor pET-Duet-1 T7eCo mit YFPmut K114Pyl ergänzt (in MCS-2 zwischen NdeI und KpnI).

Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen deutlich YFP exprimieren. Im Detail wurde eine LB-Schüttelkultur (inkl. 2 mM unnatürlicher Aminosäure) bei einer OD = 0,6 mit 1 mM IPTG induziert (Abbildung 62).

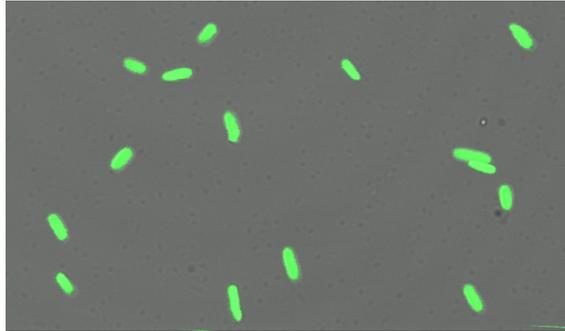


Abbildung 62: Analyse der Fluoreszenz von YFP K114Pyl mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Signalverstärkung 800).

Als erster quantitativer Test wurde versucht Norbornen-modifiziertes YFP herzustellen. Es wurde das T7muteComutYFP-Plasmid (pylS Y384F, Y306G, I401R) verwendet.

Die Expression erfolgte IPTG-induziert mit 2 mM Norbornenaminosäure (24). Die Zellen wurden mittels *french press* aufgeschlossen und das Protein wurde durch eine Reinigung mittels Streptavidin-Affinitäts- und anschließender Anionenaustauschchromatographie erhalten. Das Protein wurde in YFP-Lagerpuffer bei -20 °C aufgehoben. Es ergaben sich etwa 100 µg/l mutYFP, was den Erfahrungen mit der Alkin-Variante (einer 2 – 3-fachen Steigerung gegenüber dem Wildtyp) entspricht.

Die zweite Komponente, die optimiert werden sollte, war die Menge an pylS-mRNA und damit die Menge an Pyrrolysin-Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Hierfür wurde ein Ansatz verwendet, der die Synthetase inkl. tRNA mittels eines konstitutiven Promoters bereits vor dem Induktionszeitpunkt zur Verfügung stellen sollte.

Ein viel versprechende Sequenz wurde von der Gruppe um Söll 1982 beschrieben.^[248] In einer Folgearbeit wurde zusätzlich gezeigt, wie eine Basenaustauschmutation die Effizienz des pGlnRS-Promoters weiter erhöhen kann.^[249] Diese Mutante wurde als Grundlage für die neue Promoter-Region verwendet. Der Promoter wurde von Geneart® (Regensburg) in den Schnittstellen ClaI und NcoI hergestellt und zunächst in den T7eCo-mutYFP eingebracht. Hier zeigte sich, dass dieses System keine Verbesserung aufwies. Daher wurde ein Zwei-Plasmidsystem erdacht.

5.3.2.3 Co-Expressions-System für die Inkorporation des Norbornen-Analogons

Die Suppressionskomponenten (pyIS und pyIT) wurden auf das pACYC-Plasmid (niedrig repliziertes Plasmid, Abbildung 63) übertragen, während das gewünschte Zielgen auf einem stark replizierenden Plasmid (Abbildung 64) verblieb.

Somit sollen die benötigten Suppressionskomponenten konstitutiv zur Verfügung gestellt werden, während das Gen von Interesse (*gene of interest*, GOI) unter Kontrolle eines starken induzierbaren Promotors steht.

Dies gibt zusätzlich den Vorteil, dass das GOI auf einem beliebigen Plasmid eingebracht werden kann, welches nicht mit der Resistenz des pACYC (CmpR) interferiert.

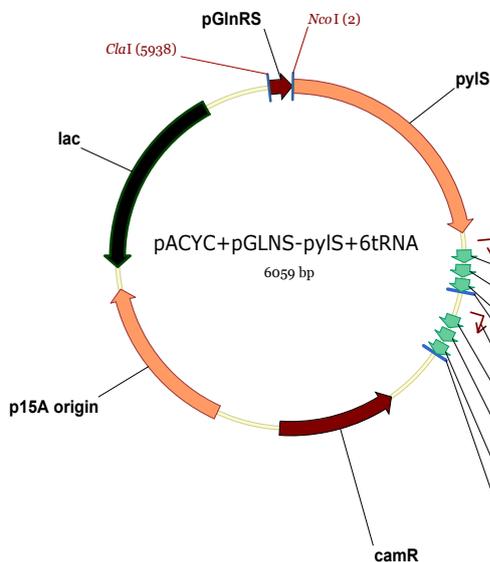


Abbildung 63: Co-Expressionsvektor mit konstitutivem Promoter (pACYC-pGlnS-norbeCo).

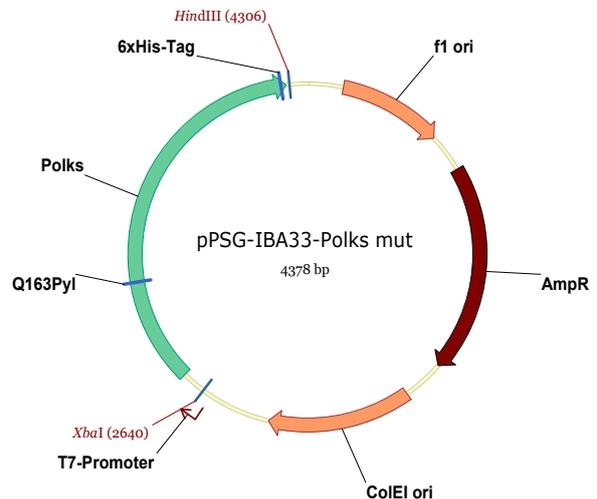


Abbildung 64: Expressionsplasmid für das GOI (hier: Pol κ_s).

Damit wurde ein System fertiggestellt, das eine unnatürliche Aminosäure inkorporieren konnte. Diese ist durch Click-Chemie unter nativen Bedingungen modifizierbar. Es zeigte gute Suppressionsausbeuten, wie in den folgenden Anwendungen bestätigt werden konnte.

5.4 Anwendung von Amber-Suppression und Click-Chemie

5.4.1 Modifikation von Polymerasen für FRET-Studien

Die weiterentwickelte Technik wurde nun an einem labileren Protein eingesetzt und zwar an der humanen DNA-Polymerase κ .

5.4.1.1 Klonierung und Expression von Pol κ_s zur Suppression

Es sollte eine DNA-Polymerase der Y-Familie so modifiziert werden, dass sich ein FRET-Partner in der Nähe der gebundenen DNA befindet, während beide Enden des DNA-Stranges den zweiten FRET-Partner tragen könnten. Dadurch würde eine zeitliche Auflösung des exakten Ablaufes der Polymerase-Strangverlängerung möglich, auch in Bezug auf geschädigte DNA.^[250] Auf gleiche Weise wäre auch eine detaillierte Untersuchung der Domänenbewegung von Polymerase κ während der Strangverlängerung bzw. zwischen geöffnetem und geschlossenem Komplex mit DNA möglich.

Es sollte eine gut exprimierbare und biologisch besonders relevante Y-Familie-Polymerase verwendet werden. Deshalb wurde die verkürzte Version von humaner DNA-Polymerase κ (19 – 526) ausgewählt. Zunächst musste eine Position für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure festgelegt werden.

Die zu modifizierende Position musste vier Grundparameter erfüllen:

- DNA-nahe Position
- Aktivität soll nicht beeinträchtigt werden
- Analytik der Modifikation einfach
- Gut zugänglich für die Click-Reaktion

Daher wurde die Position 163 ausgewählt. Diese Position befindet sich auf der DNA-abgewandten Seite der Finger-Domäne (Abbildung 65) und greift nicht in die Verlängerungsreaktion der Polymerase ein. Außerdem zeigten sich Peptidfragmente, die diese Aminosäure nach einem Trypsinverdau beinhalten, die leicht ionisierbar und in allen bisherigen LC-MS-Analysen detektierbar waren.

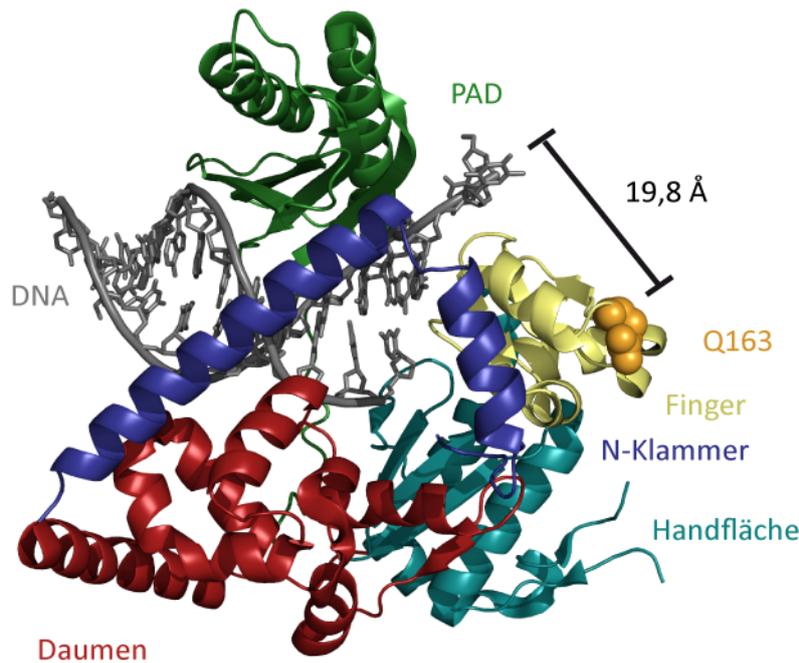


Abbildung 65: Cartoon-Darstellung von Polymerase κ_s (PDB-Code: 2OH2) mit hervorgehobener Aminosäure Q163 (orange), die zum Norbornen-Derivat mutiert wurde. Der hypothetische Abstand einer Modifikation zur DNA im aktiven Zentrum wurde markiert (19,8 Å).

Der erste Schritt war die Anpassung des gewählten Codons 163 von CAA zu TAG. Dies wurde durch direkte Mutagenese des Plasmids pPSG_IBA33_polk κ_s mit den Primern PolK_mut163_FW und PolK_mut163_RV erreicht.

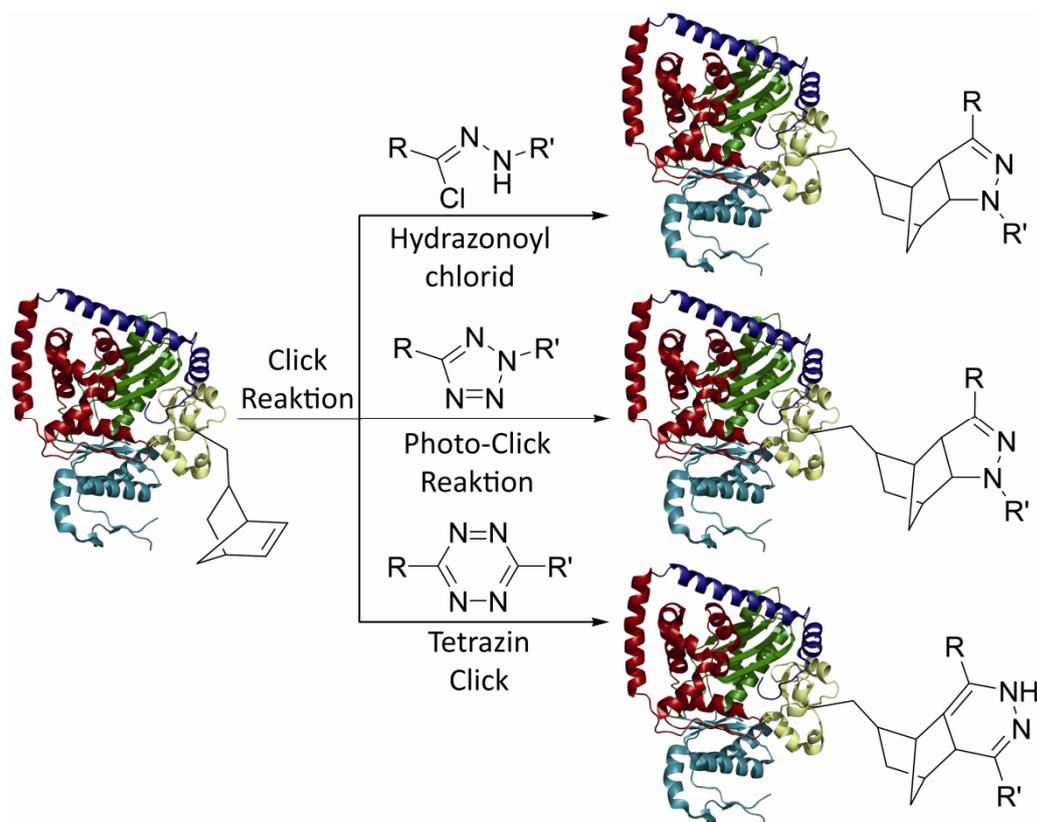
Das Co-Expressionssystem wurde aus pACYC-pGlnS-norbeCo und pPSG-IBA33-Polk κ_s _mut163 zusammengesetzt. Es wurde ein Autoinduktionsmedium mit 2 mM Norbornen-Aminosäure verwendet und bei 25 °C über Nacht inkubiert. Der Zellaufschluss wurde mit *french press* durchgeführt.

Die Reinigung erfolgte durch eine Ni-NTA-Säule. Nach der Elution wurde die Polk κ_s mut-Fraktion durch Ultrazentrifugation in Heparin A-Puffer gebracht und auf eine Heparin-Säule aufgetragen. Die Elution stellt das modifizierte Protein (Polk κ_s 33 mut163) in einer Ausbeute von etwa 2 mg/l dar. Das Produkt wurde in Polk-Puffer Click-Puffer (10 mM Tris/HCl 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin) und 50 % Glycerin bei -20 °C gelagert.

5.4.1.2 Kupferfreier Click an Polk κ_s mut

Norbornen stellte für uns auf Grund seiner mannigfaltigen Modifikationsmöglichkeiten den vielversprechendsten Ausgangspunkt dar. Die Nutzung des Norbornens basierte auf früheren Arbeiten zur Modifikation von Norbornen-tragender-DNA.^[244]

Dr. Milan Vrabel testete viele verschiedene Methoden. Die Erfolgreichsten sind in Schema 5 dargestellt.



Schema 5: Reaktionsschema von Norbornen in verschiedenen Cu-freien Click-Reaktionen.

Als Reaktionspartner dienten Nitrilimine, welche sich als besser geeignete Partner gegenüber Nitriloxiden erwiesen, da sie keine Kreuzreaktivität mit Nukleophilen zeigten.

In Reaktion 1 (Hydrazonoylchlorid, Schema 5) wurde das Nitrilimin durch eine basenunterstützte HCl-Freisetzung *in situ* generiert. Diese Methode basiert auf einer Arbeit von Huisgen und verläuft bereits bei mildem pH-Wert von 7,4 mit ausreichender Geschwindigkeit.^[245]

Alternativ kann eine Nitrilimingenerierung auch durch Photoaktivierung eines Tetrazols (Reaktion 2, Schema 5) erfolgen.^[251-252]

Außerdem kann Norbornen auch mit Tetrazinen in einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf reagieren (Reaktion 3, Schema 5).^[185-186]

Für alle Reaktionen wurde die Norbornen-modifizierte Polk_s mit den Komponenten **35**, **36**, **37** in Click-Puffer (10 mM Tris/HCl 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin) für 1 h bei

RT inkubiert. Im Falle des Tetrazols wurde die Reaktion außerdem für 10 min bei 302 nm belichtet.

Wie im SDS-Gel (Abbildung 66) erkennbar, zeigt nur die Norbornen-modifizierte Polκ₃ eine Reaktion und nicht der Wildtyp. Dies ist ersichtlich, da die Nitrilimine (**35**, **36**) nach der Reaktion eine fluorogene Verbindung erzeugen, die direkt im SDS-Gel mittels UV-Anregung detektierbar ist. Das Tetrazin (**37**) ist mit einer weiteren fluorogenen Gruppe modifiziert und so ebenfalls nachweisbar. In allen drei Fällen ist das Ergebnis positiv (Abbildung 66, Bahn 2, 4, 6).

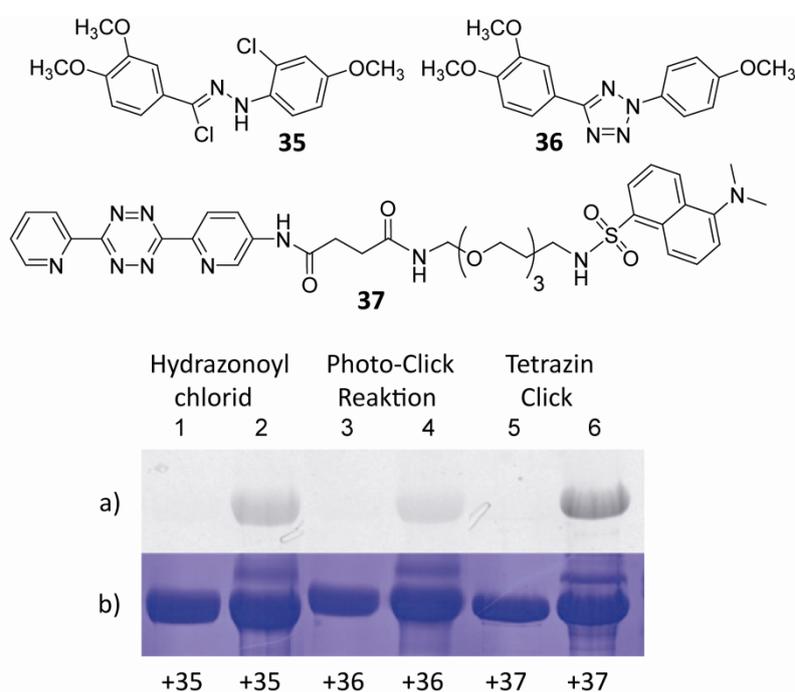


Abbildung 66: SDS-PAGE-Analyse der Reaktionen von Norbornen-modifizierter Polymerase κ₃ mit den Click-Reagenzien 29, 30 und 31; a) Fluoreszenzdarstellung des SDS-Gels; b) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; Die Banden 1, 3 und 5 enthalten *wt* Polκ₃ 33 als Kontrolle, die Banden 2, 4 und 6 Polκ₃ 33 mut163.

Die korrekte Position der chemischen Modifikation wurde mittels hochauflösender LC-ESI-MS-Analyse nach tryptischem Verdau der funktionalisierten humanen Polymerase κ bestätigt. Das modifizierte Protein von Polκ₃ 33 mut163 konnte im Massenspektrum mit exzellenter Sequenzabdeckung von 80 % nachgewiesen werden. Weiter konnten wir das mit Hydrazonoylchlorid modifizierte Peptid (LCPX1LIIVPPNFDK, mit X1 als modifizierte Norbornen-Aminosäure) detektieren. Die gemessene Masse dieses Peptids (m/z 2031,10) war in guter Übereinstimmung mit der berechneten Peptidmasse (2031,06).

Eine anschließende MS-MS Analyse der Peptide konnte eindeutig das Sequenzmuster des modifizierten Fragmentes identifizieren (Abbildung 67).

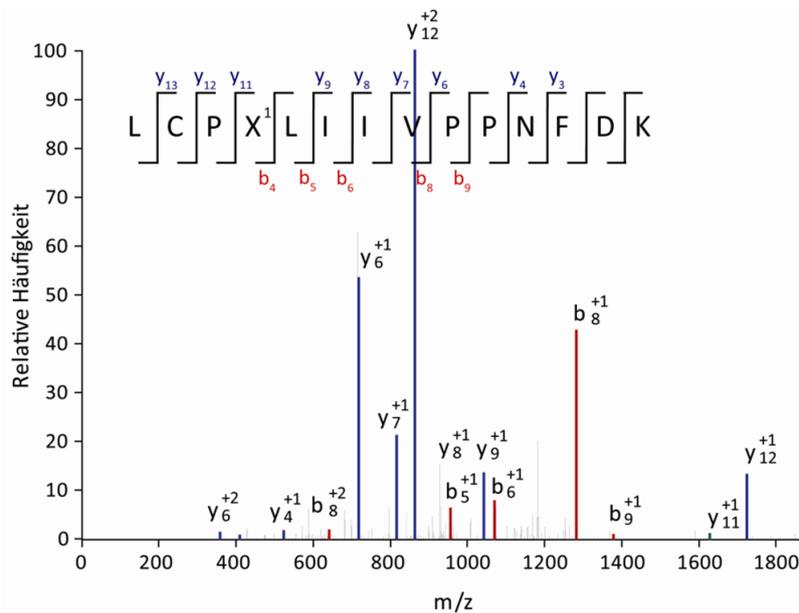


Abbildung 67: Darstellung der LCMS-Daten des Norbornen-modifizierten Peptidfragments der Polymerase κ_s nach einem Trypsin-Verdau.

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Nitrilimine als auch die Diels-Alder-Reaktion am Norbornen ablaufen.

5.4.1.3 Evaluation des kupferfreien Clicks mit Nitrilimininen an PolK_s

Zusätzlich sollte getestet werden, welche Auswirkung die Modifikation auf die Aktivität des Proteins hatte. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da für alle geplanten Experimente (z. B. FRET-Studien mit Polymerasen) die Enzymaktivität erhalten bleiben muss.

Um dies zu verifizieren wurden Primer-Verlängerungsstudien mit *wt*PolK_s bzw. den Reaktionsprodukten der Click-Reaktion durchgeführt (Abbildung 68). Ebenso wie bei den vorhergegangenen Inhibitorstudien wurde ein Fluorescein-Primer-Templat-Duplex in Gegenwart der zu testenden Polymerase unter Standardbedingungen verlängert.

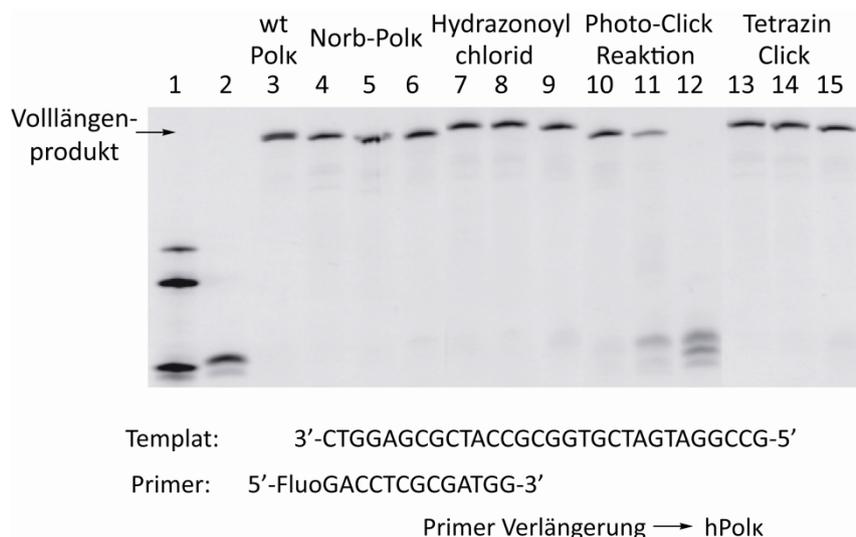
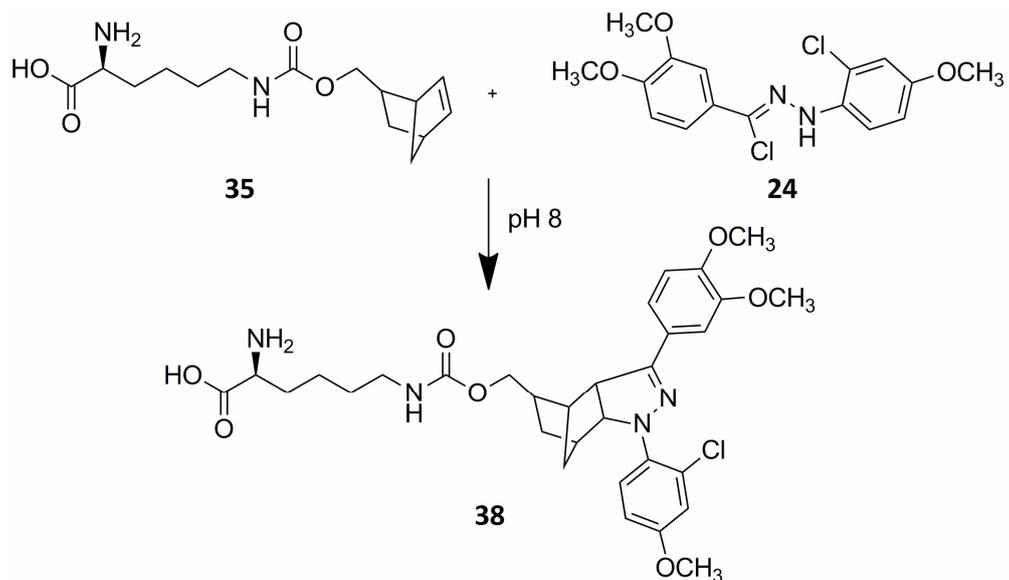


Abbildung 68: Aktivitätstest von Polymerase κ_s durch Primer-Verlängerungsanalysen unter Standardbedingungen (vgl. Inhibitorenstudien); die Polymerasekonzentrationen entsprechen 1 μM (Bahn 4, 7, 10, 13), 0,5 μM (Bahn 5, 8, 11, 14) und 0,1 μM (Bahn 3, 6, 9, 10, 15).

Hierbei ergab, dass die Aktivität im Allgemeinen nicht abnahm. Nur im Falle des Photoclicks war dies erkennbar. Allerdings könnte die UV-Schädigung des Proteins durch neue Derivate, die bereits bei 365 nm aktiviert werden, verringert werden.^[253-254]

Somit zeigten alle Reaktionen - bis auf den Photoclick - ein sehr proteinverträgliches Verhalten. Durch dieses System sind orthogonale chemische Reaktionen in nativer Umgebung möglich.

Die Ausbeute der neu entwickelten Nitrilimin-Reaktion wurde durch Fluoreszenzanalysen untersucht. Hierzu wurde zunächst **35** mit der Norbornen-Aminosäure **24** zur Reaktion gebracht (Schema 6) und deren Fluoreszenz bei 480 nm detektiert. Es wurde ein 100-facher Überschuss von **35** verwendet, um eine vollständige Reaktion zu Produkt **38** zu garantieren. Außerdem enthielten alle Proben 3 % SDS. Dies wurde benötigt, um den Einfluss der Umgebungseffekte der Tertiärstruktur von modifizierten Proteinen in späteren Experimenten zu unterdrücken. Es wurden Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von 2,5 – 50 μM durchgeführt (Abbildung 69) und eine Eichgerade (Abbildung 70) generiert.



Schema 6: Reaktion von Norbornenaminosäure und **38** zu dem durch Fluoreszenz quantifizierbaren Clickprodukt.

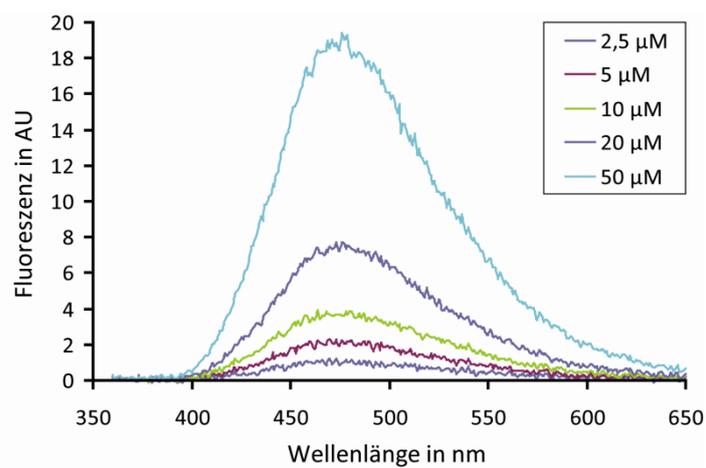


Abbildung 69: Messung von konzentrationsabhängigen Fluoreszenz-Standardkurven von **38** in Click-Puffer mit 3 % SDS.

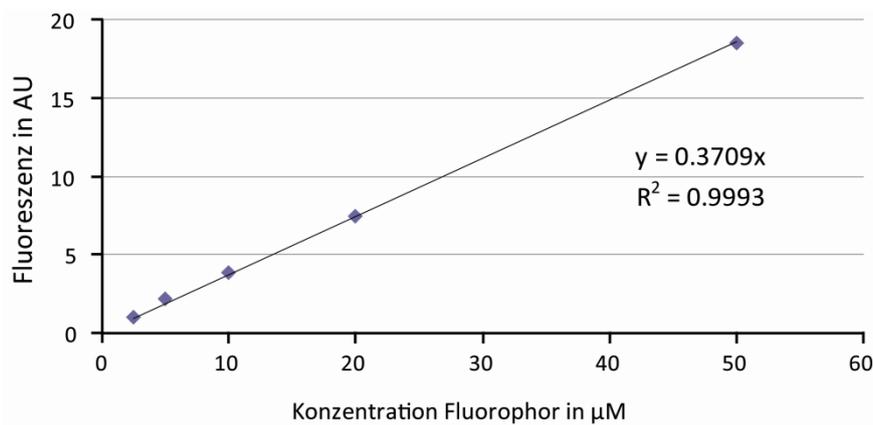


Abbildung 70: Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung von **38**; die Werte entsprechen den Fluoreszenzmaxima aus Abbildung 69.

Um die Reaktionsbedingungen zu optimieren wurde zunächst ein 10-mer Peptid (AFD**X**KDKPAA) mit einer Norbornen-Aminosäure an Position X von Dr. Viviana Fluxa synthetisiert. Dieses wurde in verschiedenen Verhältnissen von **35** für eine Stunde bei RT in Click-Puffer inkubiert und anschließend die Fluoreszenz mit Bestrahlung durch 330 nm angeregt und bei 480 nm detektiert. Der Reaktionsverlauf wurde durch MALDI-TOF-Messungen kontrolliert.

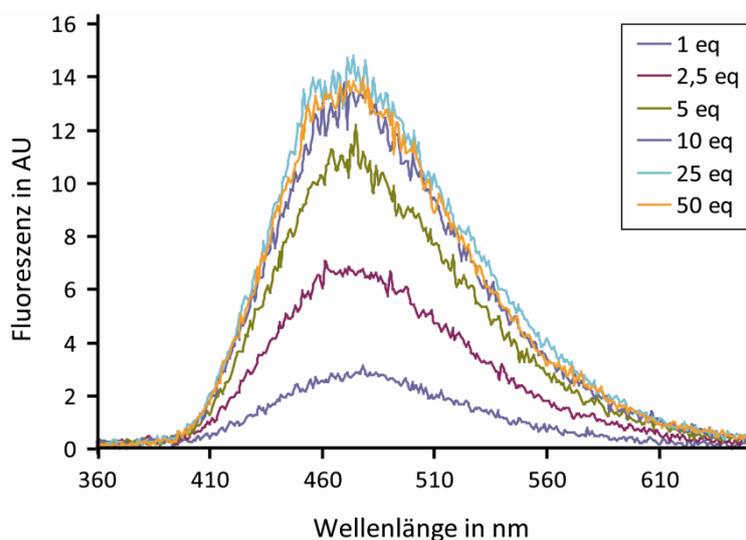


Abbildung 71: Fluoreszenzmessung der Reaktion von einem 10-mer Peptid mit **33** in verschiedenen Verhältnissen. $c(\text{Peptid}) = 36 \mu\text{M}$.

Dies zeigte eine vollständige Reaktion bei mindestens 10-fachem Überschuss an **35**. Dieses Ergebnis bestätigte unsere Voruntersuchungen mit der Norbornen-Aminosäure.

Als Kontrolle wurden die Proben erneut in Gegenwart von unmodifiziertem Protein gemessen. Es ergaben sich mit und ohne Protein die gleichen Fluoreszenzwerte.

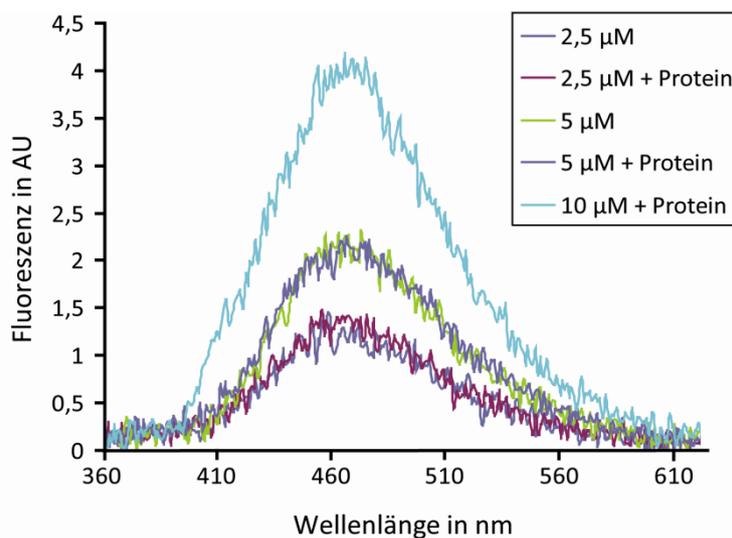


Abbildung 72: Fluoreszenzmessung von Click-Proben (**35** + Peptid) in An- und Abwesenheit von Polymerase κ ; $c(\text{Peptid}) = c(\text{Protein})$.

Nun sollte die Reaktion an Pol κ_3 ausgewertet werden. Dazu wurde die Reaktion von 240 pmol Protein mit verschiedenen Äquivalenten an **35** nach Standardbedingungen durchgeführt und anschließend in 3 % SDS denaturiert. Die maximale Ausbeute wurde bei einem 100-fachen Überschuss von **35** erreicht.

Dabei ergab sich eine Fluoreszenzintensität von 88 % gegenüber dem Modellpeptid. Es wurde jedoch deutlich, dass sich durch den Einfluss der Proteinumgebung ein hypsochromer Effekt einstellt. Bezieht man diesen in die Berechnung mit ein und misst die Fluoreszenz im verschobenen Maximum bei 470 nm, erhält man mit über 98 % eine annähernd quantitative Umsetzung. In Abbildung 73 ist eine Übersicht aller Peptid- und Proteinproben gegeben.

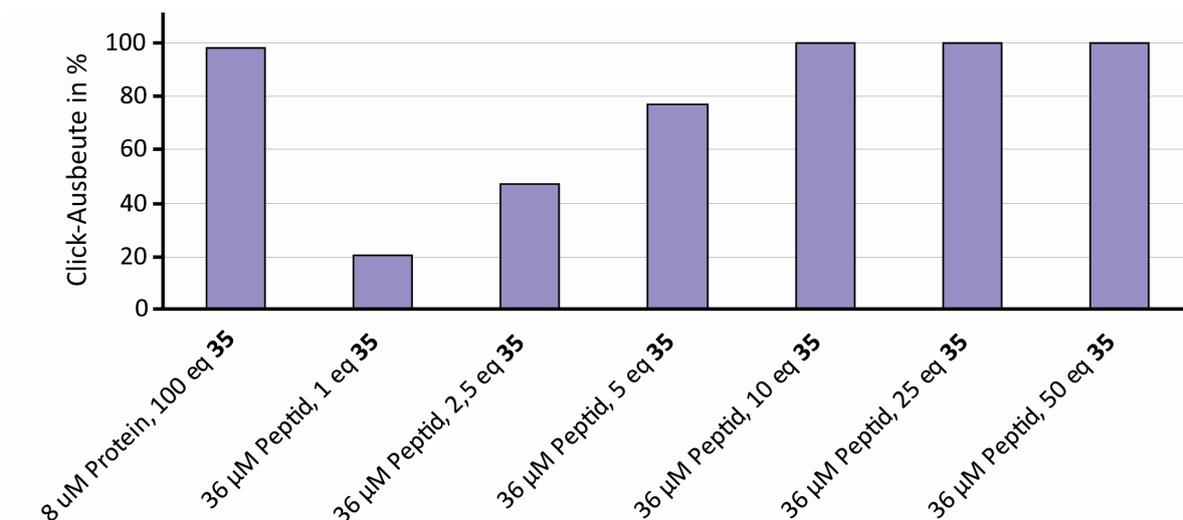


Abbildung 73: Balkendiagramm der gewonnenen Quantifizierungsdaten der Cu-freien Click-Reaktion des Norbornens mit Nitrilimin.

Zusammenfassend kann man anführen, dass die Reaktion im Vergleich zu anderen kupferfreien Click-Reaktionen sehr schnell und vollständig abläuft. Im Falle der Einzelaminosäure und des Peptids sind die Umsetzungen quantitativ und in Reaktion mit einem größeren Protein wie Polk_s liegt die Ausbeute bei 98 %.

Da dieses Thema sehr kompetitiv bearbeitet wird und Gegenstand aktueller Forschung ist wurde diese Methode parallel von zwei weiteren Gruppen in ähnlicher Form veröffentlicht.

Die Gruppe um Chin konnte den Norbornen-Tetrazin-Click zur *in-vivo*-Modifikation von Proteinen nutzen, wobei die Norbornen-Aminosäure **24** ebenso durch das Pyrrolsyl-System kodiert wurde.^[183] Zeitgleich publizierten Prof. Lemke und Mitarbeiter die Funktionalisierung von Norbornenen, die durch Amber-Suppression in Proteine inkorporiert wurden.^[184]

Im Vergleich mit anderen Click-Reaktionen ist das Norbornen dem Kupfer-Click sowohl an Bio-Verträglichkeit als auch an Reaktionsgeschwindigkeit überlegen. Der Geschwindigkeitsunterschied liegt je nach verwendetem Konstrukt bei einem Faktor von etwa 100 – 1000.^[255]

Wenn man die oben verwendeten Click-Gruppen vergleicht, kann man einen Geschwindigkeitsfaktor von etwa 3 zwischen der Reaktion von Tetrazin mit Norbornen ($9,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Nitrilimin mit Norbornen ($32 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) bestimmen.^[255-256]

Es wurden weitere Pyrrolsinderivate entwickelt, die in Bezug auf Reaktionsgeschwindigkeit noch deutlich höhere Werte aufweisen. Eine Literaturübersicht ist in Tabelle 11 aufgeführt.

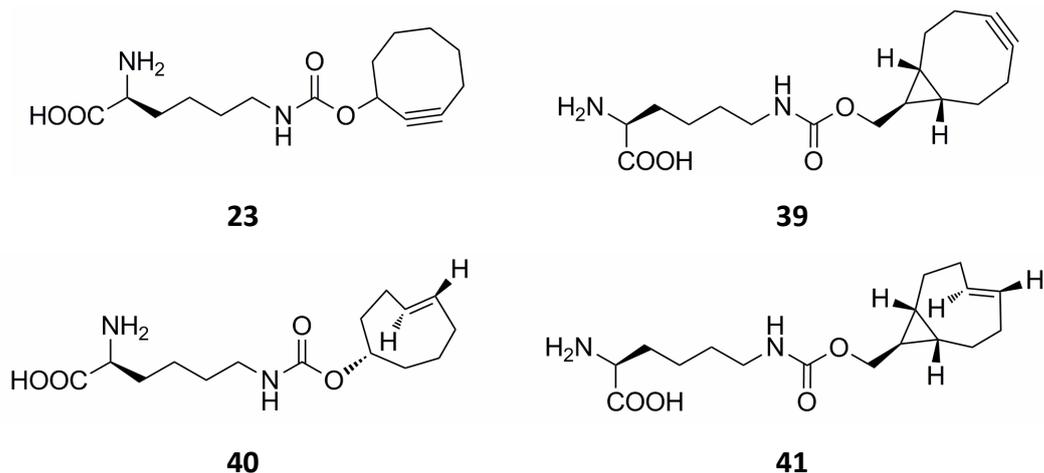


Abbildung 74: Cyclooctin- und Cycloocten-Derivate mit erhöhter Ringspannung zur Beschleunigung der Reaktionsrate.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Reaktionsgeschwindigkeiten von bioorthogonalen Reaktionen

Reaktionspartner 1	Reaktionspartner 2	Bemerkung	Reaktionsrate k_2 ($M^{-1}s^{-1}$)
Phosphin	Azid	Staudinger-Ligation	0,0025 ^[257]
Alkyne	Azid	Cu(I)-katalysiert	$10^{-4} - 10^{-2}$ ^[257]
Cyclooctin	Azid	kupferfrei	$10^{-3} - 10^{-1}$ ^[255]
Norbornen	Tetrazin	kupferfrei	9,5 ^[255]
Norbornen	Nitrilimin	kupferfrei	32 ^[256]
Cyclooctin	Tetrazin	kupferfrei	10^2 ^[255]
39	Tetrazin	kupferfrei	10^3 ^[258]
40	Tetrazin	kupferfrei	10^4 ^[258]
41	Tetrazin	kupferfrei	$>10^5$ ^[258]

Es wird deutlich, dass neu entwickelte Reaktionen mit deutlich höherer Geschwindigkeit ablaufen. Dies bedeutet allerdings nicht, dass der Click zwischen Norbornen und Nitrilimin langsam verläuft, was im Vergleich zum Cu-Click (etwa 1000-fach langsamer) und der Staudinger-Ligation (etwa 10000-fach langsamer) deutlich wird. Im Detail werden andere Faktoren wie Suppressionseffizienz, sterische Zugänglichkeit und Bioverträglichkeit der unnatürlichen Aminosäure über den Einsatz im Einzelfall entscheiden. In Bezug auf diese Anforderungen zeigt das Norbornen-Derivat vergleichbare Eigenschaften mit anderen kupferfreien Clickgruppen. Ein weiterer Vorteil liegt in dem breiten Spektrum an möglichen Reaktanten für Norbornene.

5.4.2 Entwicklung der nativen-chemischen Click-Ligation

Die native-chemische Ligation ist eine weit verbreitete und ausgereifte biochemische Methode, die die Ligation von modifizierten Peptiden mit Proteinen ermöglicht. Allerdings ist dies auf den N- oder C-Terminus des Proteins beschränkt, da die Peptidlängen durch die Effizienz der Peptidfestphasensynthese begrenzt werden.

5.4.2.1 Einfluss von Co-Faktoren auf TLS-Polymerasen

In der Analyse von TLS-Polymerasen ist besonders interessant, die Proteine auch in zentralen Bereichen der Sequenz konjugieren zu können, um zum Beispiel Ubiquitinierungen oder SUMOylierungen simulieren zu können. Dadurch könnte eine Möglichkeit der Analyse von Proteinnetzwerken, wie einer TLS-Polymerase, im Zusammenwirken mit ihren kooperativen Bindepartnern wie REV1, RPA, PCNA oder RFC ermöglicht werden.

Ein erster, einfacher Versuch zu diesem Thema verdeutlicht die Bedeutung des Zusammenwirkens der Proteinpartner. Es wurden Primer-Verlängerungsstudien, wie bereits zuvor mit Inhibitoren beschrieben, durchgeführt, allerdings wurden die Proben in An- oder Abwesenheit von RPA inkubiert. Das Protein wurde von Ulrike Lischke exprimiert und gereinigt. In der Literatur war bekannt, dass Faktoren wie RPA die Prozessivität von DNA-Polymerasen steigern können. Die Abbildung 75 zeigt, dass in Proben mit zugesetztem RPA ein Teil des Primers zum Volllängenprodukt verlängert wurde; auch bei sehr niedrigen Polymerase-Konzentrationen, die ohne Hilfsfaktoren keine Volllängenprodukte generieren können. In diesem Fall könnte dies durch die Einzelstrang-bindenden Eigenschaften von RPA zu erklären sein, was die Affinität der Polymerase zum DNA-RPA-Komplex erhöht. Dies zeigt, dass sich Analysen im Bezug auf andere Transkriptionsfaktoren wie z. B. auch PCNA auszahlen könnten. Dafür wären Ubiquitinierungen durch eine positionsspezifische Modifizierungsmethode nötig.^[259-260]

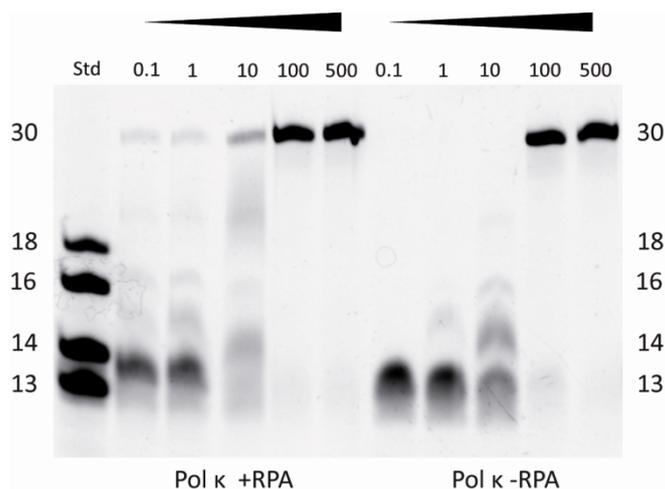


Abbildung 75: Primer-Verlängerungsstudien mit Pol κ_s unter Standardbedingungen (s. Inhibitorstudien) mit variabler Pol κ_s Konzentration (0,1 – 500 nm) in An- und Abwesenheit von RPA (5 μ M).

Diese Überlegung zeigt, wie entscheidend die Anwesenheit von Co-Faktoren und in deren Folge auch die Vollängenversion einer DNA-Polymerase inklusive der regulatorischen Motive sein kann. Daraus entstand die Idee eine Methode zu entwickeln, um Proteine durch einen Click-baren-Linker (kurze Version: **42**, lange Version **43**) unter nativen Bedingungen verbinden und modifizieren zu können. Alle im Folgenden verwendeten Substanzen, die durch organische Synthese dargestellt wurden, wurden von Dr. Milan Vrabel hergestellt.

5.4.2.2 Prinzip der nativen chemischen Ligation

Dr. Milan Vrabel konstruierte die in Abbildung 76 gezeigten Substanzen, welche eine zweistufige Ligation von Proteinen ermöglichen. Hierzu reagiert zunächst der Tetrazinteil des Linkers mit der Norbornenfunktionalität des ersten Reaktionpartners. Nun wird der überschüssige Linker aus der Reaktionslösung durch Größenausschlusschromatographie entfernt (PD10-Säule). Im Anschluss wird der Linker UV-aktiviert und der zweite Reaktionspartner zugegeben. Der große Vorteil hierbei liegt in der Positionsunabhängigkeit dieser Methode. Trotzdem gibt es an verschiedenen Positionen in Proteinen deutliche Unterschiede in der Suppressionseffizienz, was den Einbau der benötigten Aminosäuren erschweren kann.^[261]

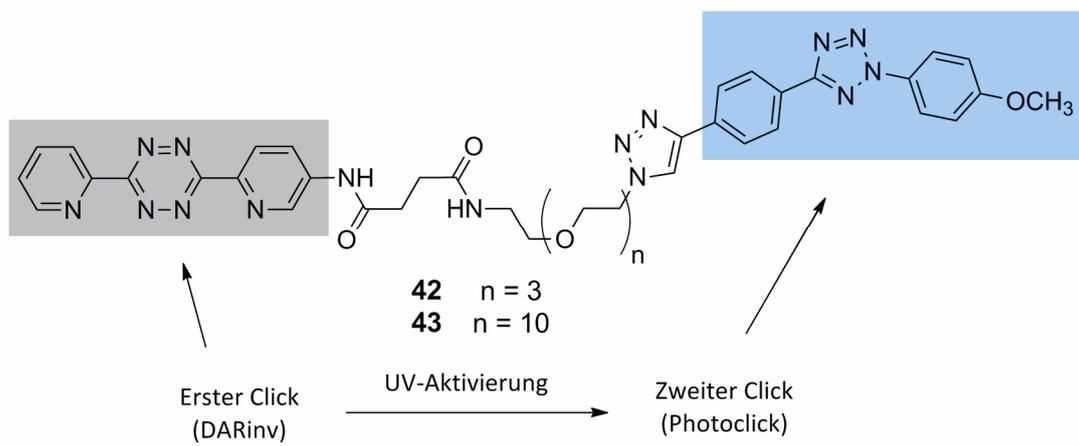
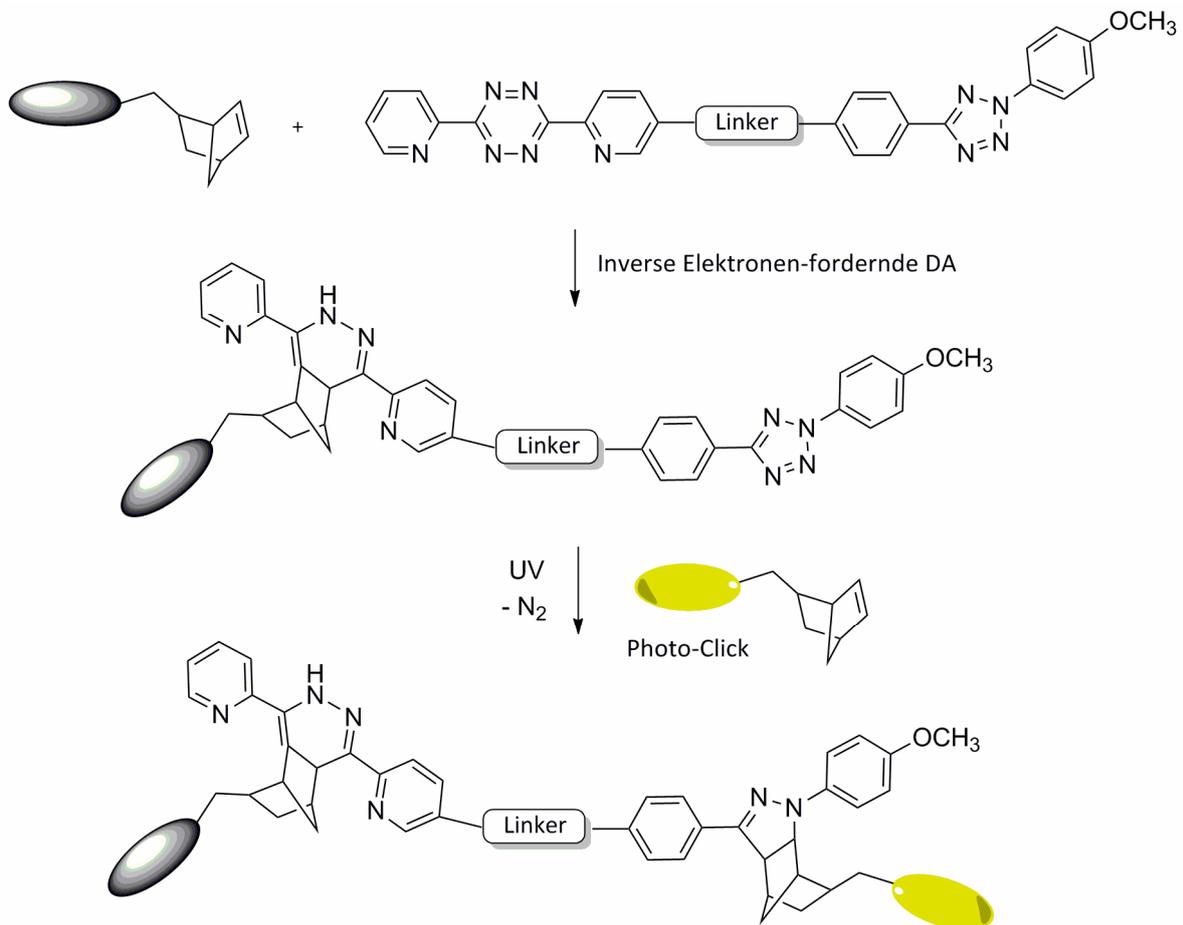


Abbildung 76: Schematische Darstellung des Ablaufs der nativen chemischen Click-Ligation mit verschiedenen Linkern.



Schema 7: Detaildarstellung der nativen chemischen Ligation zweier Substanzen; DA: Diels-Alder-Reaktion.

5.4.2.3 *Proof of principle mit Polk_s*

Die entwickelte Variante wurde zunächst mit bereits bekannten Komponenten getestet. Es sollte hierfür Norbornen-modifizierte Polk_s (Q163Norb) zu einem Dimer ligiert werden.

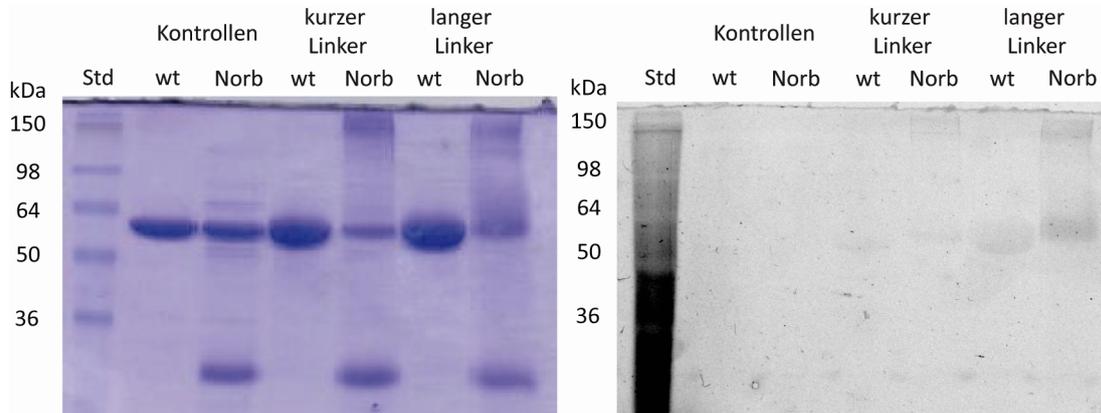


Abbildung 77: SDS-PAGE-Analyse (links) und UV-Belichtung des gleichen Gels (rechts) von der nativen-chemischen Click-Ligation zweier Polk_s Q163Norb. In Kontrollen wurde kein Linker eingesetzt.

Jede Reaktion umfasste 10 µl Gesamtvolumen. Polymerase κ_s Norb163 (5 µg, etwa 80 pmol) wurden mit 100 eq. des jeweiligen Linkers zur Reaktion gebracht. Es zeigte sich, dass die Reaktanten in wässrigen Puffern schlecht löslich waren. Da der Linker jeweils im 100-fachen Überschuss vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass ein sehr hoher Anteil an Protein mit dem Linker modifiziert wurde. Nun wurden für den Photoclick freie Norbornene und damit neues Protein benötigt. Bei Zugabe des neuen Norbornen-enthaltenden Proteins würde die Kinetik der Reaktion des Linkers mit dem frischen Protein die der Protein-Linker-Protein-Reaktion deutlich übersteigen. Daher ist es essentiell, den Überschuss an Linker abzutrennen. Dies geschieht durch eine PD10-Filtrationssäule, die kleine Moleküle zurückhält, während Proteine hindurchfließen. Das Eluat wird nun nochmals mit der gleichen Menge Polymerase κ_s Norb163 (etwa 80 pmol) versetzt und UV-behandelt um die zweite Nitrilimin-Gruppe des Linkers freizusetzen. Das Produkt des Photoclicks zeigt eine Fluoreszenz bei 480 nm.

Auf den gezeigten Gelen ist nur in den Spuren, die sowohl Linker als auch norbornen-modifizierte Polymerase enthalten, eine Bande im Größenbereich über 150 kDa zu erkennen, was ein positives Ergebnis anzeigt. Das Molekulargewicht liegt zwar deutlich über dem des reinen Komplexes; allerdings ist es wahrscheinlich, dass die interne Vernetzung der beiden Monomere und somit deren nicht-lineare Form eine Retardierung der Bande bewirken. Im Besonderen zeigt sich das positive Ergebnis in der Fluoreszenzanalyse, welche ein deutliches Signal in den hochmolekularen Banden aufweist. Die Hintergrundbanden bei etwa 60 kDa in

den Kontrollen können durch eine Überladung des Gels erklärt werden, da in diesen Banden, wie in der Coomassie-Färbung zu sehen ist, große wtPolk_s-Mengen aufgetragen wurden.

5.4.3 Anwendung der nativen chemischen-Click-Ligation

Nach dem erfolgreichen Test dieser Methode sollte nun versucht werden, durch Ligation zweier theoretisch leichter zugänglicher Moleküle ein normalerweise schwerer zugängliches Protein zu erzeugen.

Die zuvor angestellten Überlegungen zu Regulationsstudien mit TLS-Polymerasen benötigen Vollängenversionen der Proteine. Die meisten Studien verwenden TLS-Polymerasen nur in verkürzter Form, da so die Stabilität stark erhöht wird, während die Aktivität nur in geringem Maße beeinflusst wird. Die für Proteininteraktion zuständigen Domänen der Y-Polymerasen befinden sich allerdings im C-Terminus.

5.4.3.1 Expression und Reinigung von humaner Polymerase κ (1 – 870)

Zunächst wurde durch eine PCR mit den Primern PolKfull_SG_FW und PolKfull_SG_RV das Stargate-Reaktions-Templat erzeugt, aus welchem durch Standardprotokoll das Expressionsplasmid pPSG-IBA33-PolK_f (1 – 870) hergestellt wurde.

Expression, Aufschluss und erste Reinigung erfolgten mittels Autoinduktion, *french press* und Ni-NTA-Säule. Hierbei konnte nur eine sehr geringe Menge an Vollängenprodukt erhalten werden, welches im weiteren Verlauf der Reinigung durch eine Heparin-Säule vollständig degradierte. Da bereits die nach der Ni-NTA-Säule gewonnene Menge an wtPolK_f von etwa 200 µg sehr gering war und nicht in hoher Reinheit isoliert werden konnte, wurde dieses als Testsystem ausgewählt, um ein schwer darstellbares Makromolekül aus zwei einfachen zu erzeugen.

Es war bereits bekannt, dass die N-terminale Domäne einfach verfügbar war, somit wurde die sowohl in unserem System als auch in der Literatur bekannte Position 526 gewählt.

Daher wurden Expressionssysteme für eine N-terminale Version von Polk (1 – 526) und eine C-terminale Version (527 – 870) hergestellt.

5.4.3.2 Klonierung der zur Ligation benötigten Proteinabschnitte

Die Klonierung des N-Terminus (1 – 526) wurde durch eine Stargate-PCR mit den Primern Polk_{full_FW_SG} und Polk_{s_TEV_RV_SG} durchgeführt. Das Endprodukt wurde durch eine zweite PCR des vorher erzeugten Templates mit Polk_{full_FW_SG} und Polk_{s_CTEV_Strepadd_SG} hergestellt. Anschließend wurde mittels Stargate®-Klonierung und pPSG-IBA33 der Expressionsvektor pPSG-IBA33X Polk 1 – 526 erstellt. Außerdem wurde durch die Primer Polk_{526_mut_FW} und Polk_{526_mut_RV} eine Punktmutagenese durchgeführt, um einen Vektor für spätere Suppressionsstudien zu erhalten.

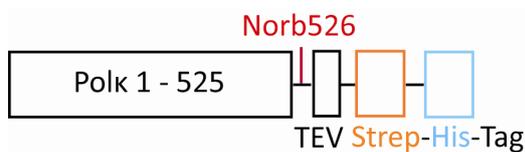


Abbildung 78: Schematischer Aufbau des N-terminalen Polk-Konstruktes für die native chemische Ligation.

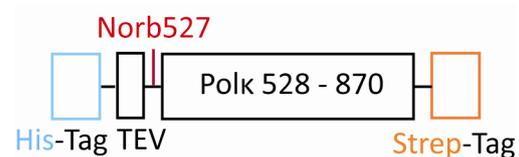


Abbildung 79: Schematischer Aufbau des C-terminalen Polk-Konstruktes für die native chemische Ligation (Polk_s C-Term).

Der zweite Teil der Klonierung bestand in der Herstellung des pPSG-IBA43-Polk 527 – 870. Dieser begann durch eine PCR mit pPSG-IBA33-Polk_f als Templat und den Primern Polk_{527wt_TEV_SG_FW} und Polk_{SG_870_RV} für das Wildtyp-Konstrukt. Für die Suppressionsvariate wurde die PCR mit den Primern Polk_{527wt_TEV_SG_FW} und Polk_{SG_870_RV} durchgeführt. Beide PCR-Produkte wurden in den pPSG-IBA43 integriert.

Mit Erhalt der beiden Suppressionsproteine sollte es nun möglich sein (mittels TEV-Protease) die Norbornen-Funktionalitäten in räumlicher Nähe des C- bzw. N-Terminus freizulegen. Diese sollten dann mit Hilfe des vorher beschriebenen bifunktionalen Linkers ligiert werden.

Die Expressionsbedingungen sollten zunächst durch die Wildtypvarianten validiert werden. Für die N-terminale Variante konnten die bekannten Bedingungen der Expression des pPSG-IBA33X und eine Reinigung über Ni-NTA-Säule und Gelfiltration verwendet werden.

Diese führten zu einer Ausbeute von etwa 45 mg/l Autoinduktionsmedium (vgl. Kristallisation Polk_s 33X).

Der C-Terminus sollte nach den gleichen Konditionen gereinigt werden. Dabei ergab sich keine Bindung des Proteins an die Säule. Eine Western-Blot-Analyse mit einem Anti-6x-Histitin-Antikörper-*Meerrettichperoxidase*-Konjugat zeigte allerdings große Polymerasemengen im Pellet an (Abbildung 80). Außerdem musste die Expression des Proteins in Rosetta® 2 (DE3) durchgeführt werden, da bei der Verwendung des Stammes T7-Express® kein Protein sichtbar war (Daten nicht gezeigt).

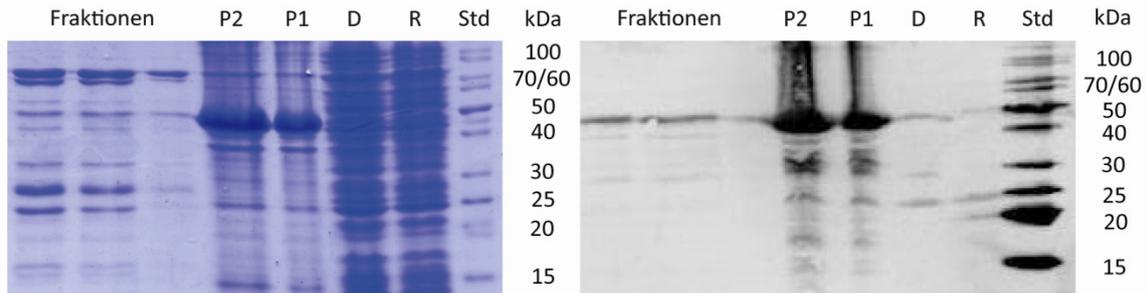


Abbildung 80: SDS-PAGE-Analyse mit zugehörigem Western-Blot (His-Tag-Detektion) einer Ni-NTA-Reinigung von Polk_s C-Term; Fraktionen: Elutionsmaximum der Ni-NTA-Säule, P2, P1: In SDS-Puffer resuspendiertes Pellet (P1: 1 µl, P2: 2,5 µl), D: Durchfluss der Ni-NTA-Säule, R: Rohextrakt, Std: Proteinstandard zur Größenbestimmung.

Die Ergebnisse wiesen auf die Bildung von Protein-Einschlusskörpern hin. Diese sollten durch eine denaturierende Reinigung aufgelöst werden, so dass die entfalteten Polymeraseketten mit einer Ni-NTA-Säule abgetrennt werden konnten. Die Zellyse erfolgte auch denaturierend in einer *french press*. Es konnten große Mengen an Polk (527 – 870) gewonnen werden (etwa 50 – 100 mg/l).

Die Rückfaltung des Proteins erwies sich als großes Problem, da sowohl eine Dialyse gegen nativen HisA-Puffer, als auch eine HisA-Puffer Abwandlung mit dem Zusatz von 2 % Lauroylsarcosin ein vollständiges Präzipitieren zur Folge hatte. Es könnte allerdings auch ein vollständig denaturiertes Click-System erfolgreich sein. In dem Fall würden die entfalteten Teilproteine ligiert, um diese dann in einer Vollängenversion zurückzufalten. Dies konnte ebenso nicht erfolgreich erreicht werden. Somit wurde klar, dass die Komplexität der Expression den Nutzen als Testsystem für native Click-Ligation überstieg.

5.4.3.3 Native-Click-Ligation von Polk_s und YFP

Nach den ersten Versuchen sollte nun ein System getestet werden, welches zwei Makromoleküle nicht nur an den Enden, sondern an beliebigen Positionen verbinden kann.

Als Reaktionspartner wurden die bereits in vorherigen Experimenten beschriebenen Proteine Polk_s (19 – 526) Q163Norb und eYFP K114Norb eingesetzt.

Es wurden für jeden Ansatz 2,5 µM (etwa 50 pmol) Polk_s mit 100 eq. Linker für 1 h in Click-Puffer bei RT zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde jeweils in An- und Abwesenheit von 1 % SDS (w/v) durchgeführt. Das SDS sollte die Löslichkeit des Linkers verbessern. Es zeigte sich allerdings, dass das Elutionsverhalten der Proteine derart beeinflusst wurde, dass sich die Trennung der Polymerase von dem Linker durch eine PD10-Säule äußerst schwierig gestaltete. Dieser Umstand kann durch Mizellenbildung bei kritischen Konzentrationen an SDS erklärt werden. Diese schließen Moleküle unabhängig von ihrer Größe ein und transportieren sie ungetrennt durch die Säule. Die eluierten Fraktionen wurden mit einer äquimolaren Menge an YFP versetzt und 10 min UV-aktiviert. Die Ergebnisse (Abbildung 81, 1 % SDS) zeigen deutlich, dass es im Falle mit SDS nicht gelungen war den Linker zu entfernen, da kein höhermolekulares Clickprodukt erkennbar ist. Allerdings weist die native Variante (Abbildung 81, 0 % SDS) ein deutliches Click-Produkt ohne erkennbare Nebenprodukte (Abbildung 81, 1 % SDS) auf.

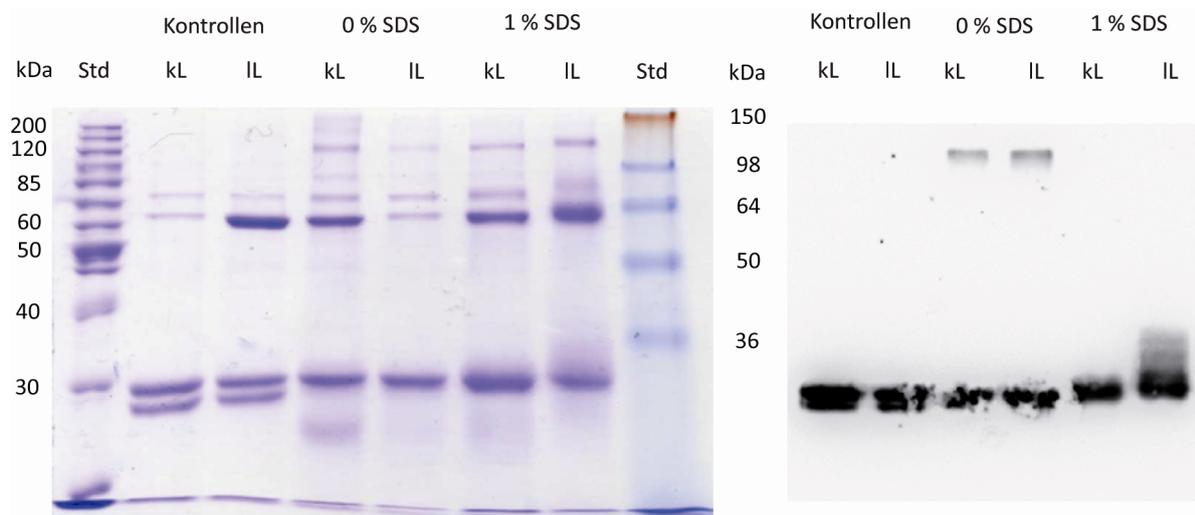


Abbildung 81: SDS-PAGE-Analyse von nativen-chemischen Click-Reaktionsansätzen (IL: langer Linker **43**, kL kurzer Linker **42**), In den Kontrollen wurden identische Reaktionen durchgeführt, allerdings mit *wt* Polk_s und *wt* YFP; coomassie-gefärbt (links), Chemolumineszenzanalyse des zugehörigem Western-Blots (GFP/YFP-Antikörper-Detektion, rechts).

Trotz relativ geringer Ausbeuten ist dieses Ergebnis eine sehr gute Ausgangsposition für eine native positionsunabhängige Modifikation von Proteinen und deren Ligation. Das fluoreszierende Produkt (Abbildung 81, 0 % SDS kL, IL) entspricht dem Konstrukt

Polks Q163Norb-eYFP K114Norb. Es könnte auch der Fall sein, dass ein Polk-Dimer erzeugt wurde. Allerdings würde dies nicht durch den GFP-Antikörper markiert werden.

Der Unterschied zwischen 0 % und 1 % SDS ist wieder durch die Mizellenbildung zu erklären, was dazu führt, dass in der Reinigungsstufe über eine PD10-Säule eine Koelution des Linkers mit der Proteinfraction erfolgt. Bei 0 % SDS ist eine Abtrennung möglich. Der koelutierende Linker inaktiviert sonst bereits vor der UV-Behandlung das zugegebene eYFP-Q163Norb und macht eine weitere Verknüpfung unmöglich.

Durch das Ausschlussprinzip kann man beweisen, dass die zu erkennenden fluoreszierenden Banden (Abbildung 81, 0 % SDS oben) das Polk Q163Norb-eYFP K114Norb-Konstrukt enthalten müssen.

Die Abweichung vom Größenstandard ist durch die ungewöhnliche Form des quervernetzten Proteins zu erklären, da es eher einem unsymmetrischen Chromosom als einem linearisierten Protein ähnelt.

Somit war die Entwicklung einer Protein-Protein-Ligation mittels eines kupferfrei-clickbaren-Linkers erfolgreich. Die Vorteile dieser Methode liegen in den bekannten *in-vivo*-Problemen von Kupfer, was unterhalb von 0,5 mM von Säugerzellen toleriert wird, aber bereits ab 1 mM negative Auswirkungen auf Zellteilung und Lipidstoffwechsel hat. Ebenso führt Cu^{2+} auch *in vitro* zu Komplexbildung z. B. mit Cysteinen, was die Tertiärstruktur bzw. die Aktivität beeinflusst.^[262-265]

Eine ähnliche Methode zur Ligation von Proteinen wurde von der Gruppe um Marx verwendet, um Ubiquitin-modifizierte PCNA herzustellen. Es wurden hierfür eine Alkin-modifizierte PCNA und ein Azid-modifiziertes Ubiquitin exprimiert. Diese wurden durch Cu-Click verbunden.^[260] Die gleiche Methode wurde genutzt, um Ubiquitin-Dimere zu erzeugen.^[266] Die Protein-Ligation mittels Tyrolysyl-System und einer Thiol-Gruppe durch einen bifunktionalen Linker wurde von Schultz und Mitarbeitern beschrieben.^[267]

Ein weiteres vergleichbares Projekt gelang Chin und Mitarbeitern mit der Inkorporation eines Pyrrolysinanaloges mittels Suppression, welches eine native chemische Ligation ermöglicht. Dadurch wurden eine ubiquitinierte Form von SUMO und ein Ubiquitin-Dimer erzeugt.^[259]

Zusammenfassend kann durch das Zwei-Plasmid-System eine robuste Expression mit Proteinmengen bis 2 mg/l ermöglicht werden, die in unseren Händen allerdings noch nicht mit dem System von Schultz konkurrieren kann, da dieses System 20 – 50 mg/l modifiziertes Protein liefern kann.^[268] Dies resultiert zunächst auch aus der geringeren Basisexpression des hier gezeigten Proteins, da unser System pro Suppressionsstelle etwa eine Größenordnung an

Ausbeute verliert. Somit könnte bei einer Wildtyp-Expressionsrate von 200 mg/l auch eine Suppressionsmenge von 20 mg/l erreicht werden. Eine Optimierung der Suppressionsstelle nach Proteinmenge könnte eine weitere Verbesserung ermöglichen.^[261] Außerdem ist sicherlich auch der Balanceakt zwischen der erfolgreichen Suppression und der toxischen Wirkung auf das System zu beachten. Die Konkurrenz zwischen RF1 und Suppressor-tRNA beeinflusst die Proteinproduktion massiv.

Es könnte durch eine Erhöhung der Menge Suppressor-tRNA und Synthetase stöchiometrisch auf das System eingewirkt werden. Durch die Mutation des aktiven Zentrums konnte eine starke Verbesserung der beladenen tRNA erreicht werden. Die Verwendung eines konstitutiven und eines induzierbaren Promotors sollte eine bessere Verträglichkeit in Bezug auf Zelltoxizität und gleichzeitig auf die Proteinausbeute ermöglichen.

Ein Extrembeispiel zeigt sich im System von Sakamoto, das keine Termination durch den RF1 mehr gestattet.^[153] Dabei müssen essentielle Gene unter Kontrolle eines anderen Terminators gestellt werden, um die Zellen am Leben zu erhalten. Die Wachstumsraten sind allerdings extrem reduziert. Somit muss immer der Spagat zwischen Suppressionsausbeute und Lebensfähigkeit der Zellen gemeistert werden. Der Gold-Standard in Bezug auf Ausbeute ist weiterhin das Tyrosin-basierte System, welches in jahrelanger Arbeit optimiert wurde. Dabei muss auch erwähnt werden, dass unser Hauptanliegen nicht die Suppression selbst ist, sondern die Modifikation von Proteinen für spätere Untersuchungen. Somit wurde ein gutes System als Handwerkzeug erstellt, welches die benötigten Proteinnengen liefert und nun durch Methodenentwicklung weiter optimiert werden kann.

Die Modifikation läuft unter sehr milden Bedingungen ab. Unter vergleichbaren Bedingungen erreichen andere Modifikationsformen, wie Keton und (Hydroxyl-)amin (Tyrosyl-System) oder gespannte Ringe (z. B. Cyklooktin, Bertozzi), nur langsame Reaktionsgeschwindigkeiten und müssen oft über Nacht reagieren. Die Cyklooktine können, wie zuvor bereits gezeigt, mittels Tetrazin-Click und einer Verstärkung der Ringspannung deutlich höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erreichen.^[258]

Zur Norbornen-Reaktion werden potente aber trotzdem sehr spezifisch reagierende Nitrilimine generiert. Es werden ebenso hohe Proteinkonzentrationen benötigt, um eine schnelle Kinetik zu gewährleisten.

5.5 Analyse von modifizierten Proteinen durch Massenspektrometrie

Die exakte Analytik von modifizierten Proteinen ist ein zentraler Schritt bei der Anwendung der gezeigten Methoden und Entwicklungen. Daher ist es nötig, eine hochsensitive und genaue Nachweismethode zu besitzen.

Die LC-MS Analytik wurde auf einer LTQ Orbitrap XLTM durchgeführt, die von einer Ultimate-3000TM Nano-HPLC adressiert wurde. Die ersten Analysen mit diesem System zeigten allerdings nur befriedigende Ergebnisse bei der Vollständigkeit von Proteinsequenzen.

Es wurden hierfür Optimierungen auf vielen Ebenen durchgeführt:

- Saubere Proben durch den Einsatz von C18-Filterspitzen
- Herstellung und Einsatz von Nano-Nadelsäulen
- Ergänzung des Systems durch eine stabilere Nanoflex-Ionenquelle
- Einbau eines Säulen-Ofens
- Optimierte HPLC-Gradienten
- Erstellen von optimierten Massenmethoden
- Erweiterung des Geräts um eine HCD-Zelle mit axialem Feld

5.5.1.1 Veränderungen an der Ultimate 3000 Nano-HPLC

Die Probenvorbereitung wurde wie im Standardprotokoll durchgeführt, allerdings durch Reinigung der Probe durch C-18-Zip-Tips® (Millipore, Schwalbach) ergänzt.

In der HPLC wurde die Probe durch das Programm „*ul-pickup*“ in das System gespült und auf eine Konzentrationssäule (Acclaim PepMap100®, C18, 5 µm, 100 Å, 500 µm i.d. x 5 mm) geladen. Die Vorsäule wurde dann in den Gradientenfluss gebracht, wobei die Peptide mit steigender Acetonitrilkonzentration eluierten. So wurden diese bereits vorseparierten Peptide auf die Hauptsäule gebracht, welche dann durch eine sehr kleine Porengröße des C18 Materials (100 Å) eine feinere Trennung ermöglichte. Dadurch konnte eine stark verbesserte Separation erreicht werden, wobei sich die Auftrennung der Peptide über einen Bereich von etwa 40 Minuten für einfache Mischungen und 120 – 150 Minuten für Proteome erstreckte. Es wurde zunächst mit Säulen gearbeitet, die von Prof. Dr. M. Mann (MPI für Biochemie, München) zur Verfügung gestellt wurden. Im späteren Verlauf des Projektes wurden durch Einsatz der Druckkammer NC77-MAG (Next advance, Averill Park, USA), New Objectives

(Woburn, USA), *fused-silica*-Nadeln und der Dionex Ultimate 3000TM-Nano-HPLC (Germering) eigene Säulen hergestellt.

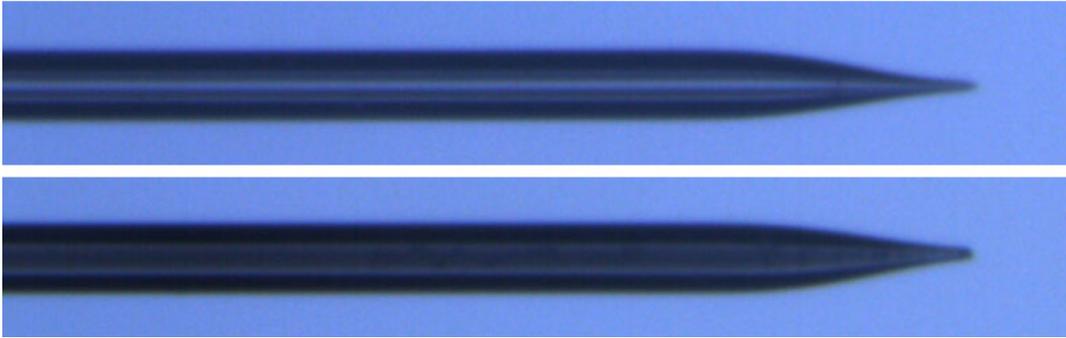


Abbildung 82: Durchlicht-Bild (25-fache Vergrößerung) von Fused-Silica-Kapillar-Nadeln (Durchmesser: 360 μm) vor (oben) und nach (unten) der Beladung und Verdichtung mit Säulenmaterial mittels einer Druckkammer.

Zusätzlich konnte eine höhere Haltbarkeit von Säulen und Nadeln erreicht werden, indem das System dauerhaft unter einem Fluss von 0,01 $\mu\text{l}/\text{min}$ Wasser/ACN (20/80) gehalten wurde. Dabei konnte während isokratischer Elution durch eine Zyklisierung des Flussteilers eine Lösungsmittelersparnis von 99,9 % erreicht werden.

Außerdem wurde durch eine neue Anschlussvariante der Pumpenköpfe die Haltbarkeit des Pumpensystems deutlich verlängert. Hierbei wurde der Flusskreislauf der Mikro- und der Ladepumpe ausgetauscht, da beide Pumpen baugleich sind und nur durch einen Flussteiler der Nanofluss generiert wird. Somit sollte die bisher deutlich weniger belastete Pumpe die volle Leistungsfähigkeit des Nanoflusses (bis $> 1 \mu\text{l}/\text{min}$) garantieren. Es wurden ebenso die Zuleitungskapillare zwischen Vorkonzentrierungssäule und Nadel von 50 μm auf 20 μm verengt, was eine Zunahme des Rückdrucks von etwa 10 bar zur Folge hatte, allerdings das Totvolumen des Systems deutlich reduzierte.

5.5.1.2 Optimierung der Ionisation durch eine neue Ionenquelle

Die Standardversion der Nanospray-Quelle lieferte befriedigende Daten, wenn das System in optimaler Verfassung war. Allerdings zeigten sich Probleme in der Spraystabilität. Diese konnten durch verbesserte Probenvorbereitung gemindert, jedoch nicht gelöst werden.

Daher wurden sowohl neue Emitter-Nadeln (New Objective, PicoTip Emitter FS360-75-30-CE-5-C10.5) als auch eine neue Ionisationsquelle (*Thermo Scientific, Nanospray Flex Ion source*) eingebaut. Zusätzlich wurde die Quelle durch einen Säulenofen (PRSO-V1, Sonation, Biberach) ergänzt, der schnelle Temperaturgradienten (etwa 90 sec) von RT + 3 $^{\circ}\text{C}$ bis 50 $^{\circ}\text{C}$

ermöglichte. Mit dem Einsatz dieser neuen Ionenquelle konnte eine Verbesserung in den Bereichen Spraystabilität, Trennverhalten, Flussrate und somit Analysezeit pro Probe erreicht werden.

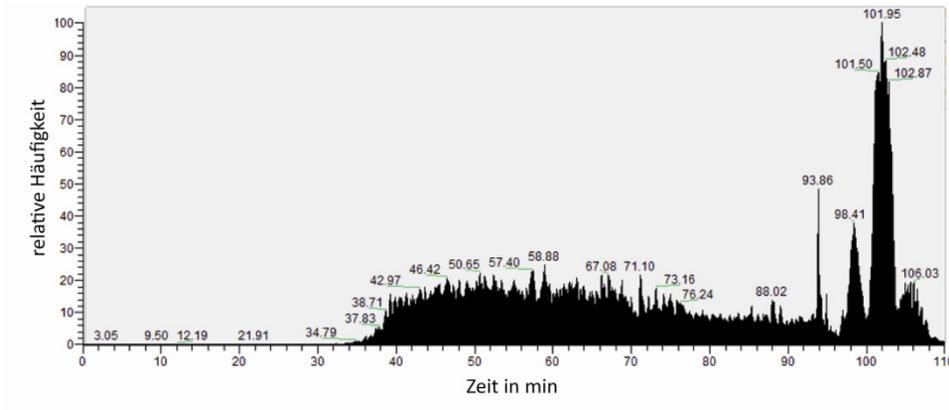


Abbildung 83: Elutionsprofil einer Proteomanalyse aus HeLa-Zellen (TIC-Darstellung).

Zusammenfassend wurde eine Analytikmethode optimiert, so dass eine exakte Bestimmung der Peptide aus tryptisch-verdauten Proteinproben möglich ist. Diese wurde erfolgreich an Thioredoxin und YFP für intakte Proteine und an verschiedensten tryptisch-verdauten Proteinen (hPolk, hPol η , yPol η , RPA, XPA u.a.) getestet. Ebenso wurden vollständige Zellextrakte (wie in Abbildung 83 gezeigt) analysiert.

Die verwendeten Techniken entsprechen dem aktuellen Standard der Forschung. Der Trypsin-Verdau entspricht den typischen Varianten, die auch in der Gruppe von Prof. Mann Anwendung finden. Um das System für weitere Studien im Bereich der Proteomics auf den neuesten Stand der Technik zu bringen, wurde die Standard-HCD-Zelle der LTQ Orbitrap XLTM durch eine Zelle mit axialem Feld ausgetauscht. Diese erzielt deutlich höhere Transfereffizienzen im Bereich der positiven und negativen Ionen. Somit ist das Gerät für verschiedene Markierungsmethoden wie SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*), ICAT (*isotope coded affinity tags*) oder iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*) einsetzbar.^[269-270]

Die LTQ Orbitrap XLTM erfüllt alle aktuellen Anforderungen an moderne Massenspektrometrie.

Im Bereich der Separation erreicht das System sehr gute Werte (etwa identifizierte 5000 – 10000 Peptide in 1 h). Sollte noch bessere Trennung benötigt werden, könnten längere Säulen (30 – 50 cm) erzeugt werden. Die benötigten Drücke würden allerdings eine Nano-UPLC (*ultra performance liquid chromatographie*) erfordern.



6 Ausblick

In den in Abschnitt 5.1 beschriebenen Experimenten wurden die Grundlagen für die Lösung von Kristallstrukturen von Y-Familie-Polymerasen in Komplex mit verschiedensten DNA-Schäden gelegt. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Kristallen von Polymerase κ soll die Untersuchung der DNA-Schäden AAF, AF und cisplatin durchgeführt werden. Hierfür sollte im Besonderen die Anwendung von *microseeding*-Ansätzen erfolgsversprechend sein. Die in Reinform zur Verfügung stehende humane DNA-Polymerase ι ist besonders für oxidative Schäden prädestiniert. Nachdem die Struktur im Komplex mit 8-oxodG gelöst wurde, sind weiterhin FaPydA und FaPydG von Interesse. Hierfür ist ein breiter Vortest an Kristallisationsbedingungen durchzuführen.

Ein weiteres Ziel ist, die Untersuchung verschiedener DNA-Schäden durch Einzelnukleotid-, Primer-Verlängerungsstudien und Pyrosequenzierungen durchzuführen.^[240] Im Fokus würden hier die drei DNA-Polymerasen Pol η , Pol ι und Pol κ stehen. Die Vergleiche des Verhaltens der Polymerasen wären besonders für AAFdG, AFdG, FaPydG, FaPydA und andere oxidative Schäden vielversprechend. Erste Versuche wurden bereits von Tim Gehrke und Ulrike Lischke durchgeführt. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.

Die Studien von Inhibitoren können für die Studien des Mechanismus von Polymerasen von großer Bedeutung sein. Die hier durchzuführenden Primer-Verlängerungsstudien können ebenso in Gegenwart von DNA-Schäden erfolgen. Dies könnte auch chemische Leitstrukturen für klinisch genutzte Inhibitoren generieren, die im Falle der Pol η helfen könnten, die Resistenz gegen Chemotherapeutika zu verringern. Ebenso können die Inhibitoren zur Stabilisierung von Proteinkristallen beitragen, was gleichzeitig einen Einblick in den Mechanismus der Inhibition gewähren würde.

Die Etablierung des kupferfreien Clicks an Polymerase κ könnte durch weitere Tests noch vielfältiger genutzt werden. Ein sonst schwer darstellbares Protein wäre z. B. Epo, das vier Glykosylierungsstellen besitzt, welche essentiell für dessen Aktivität sind. Die in dieser Arbeit beschriebene positionsspezifische chemische Ligation würde die Darstellung von homogen glykosyliertem EPO ermöglichen.

Nach der erfolgreichen Verknüpfung von zwei nativen Proteinen wäre der nächste Schritt ein biologisch bedeutendes Testsystem zu adressieren. Die Wechselwirkung ubiquitinerter

PCNA mit Y-Polymerasen wurde in diesem Zusammenhang bereits mit Cu-Click analysiert, allerdings nicht unter Cu-freien Bedingungen.^[260]

Eine Weiterentwicklung dieser Methode könnte sich in der Inkorporation der beiden Reaktionspartner als Aminosäurederivate durch Amber-Suppression ergeben. Dies könnte eine Ligation in einem Reaktionsschritt ohne Linker möglich machen.

Die Analytik per LC-MS mittels LTQ Orbitrap XL für Proteine und verdaute Peptide funktioniert sehr gut. Von besonderem Interesse wäre noch eine weitere Optimierung der Messung intakter Proteine, um einen exakten Molekularpeak auch von größeren Proteinen (>30 – 60 kDa) zu erhalten.

Weiteres Optimierungspotential läge in einem Austausch der Pumpen der Ultimate 3000 Nano-HPLC von Kohlewender-getriebenen Motoren zu Nano-HPLC-Pumpen, die ohne Flussteiler konstante Flussraten im nl-Bereich bereitstellen könnten. Dies würde Lösungsmiteleinparungen von ungefähr 400 ml pro Tag Messzeit zur Folge haben.



7 Materialien und Methoden:

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien

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

Lösungsmittel und Formiat für LCMS-Analysen wurden von Sigma/Aldrich/Fluka (Deisenhofen) in Chromasolv- bzw. Massenspektrometrie-Qualität bezogen.

7.1.2 Geräte

Tabelle 12: Liste der verwendeten Gerätschaften

Gerätebezeichnung	Hersteller
Äkta Basic Chromatographie System	GE, München
Äkta Purifier Chromatographie System	GE, München
Agarose Gelelektrophoresekammer	Biorad, München
Autoklav Vakulab S3000	Systec, Gießen
Autoklav Laboklav	HSP, Magdeburg
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
Hochdruckhomogenisator	Avestin, Mannheim
HPLC	Waters, Eschborn
Inkubator 1S	Noctua, Wiesloch
Inkubator 44R	New Brunswick, Nürtingen
LCMS Dionex Ultimate 3000 Nano	Dionex, Germering
LCMS LTQ Orbitrap XL	Thermo, Dreieich

Gerätebezeichnung	Hersteller
LCMS LTQ FTICR Ultra	Thermo, Dreieich
Mastercycler Personal	Eppendorf, München
Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Nanodrop UV-Spektrometer	Peqlab, Erlangen
pH Meter MP220 Mettler Toledo, Gießen	Mettler Toledo, Gießen
PCR Realplex Eppendorf, Hamburg	Eppendorf, Hamburg
Protean xi cell XL	Biorad, München
Sorvall Zentrifuge, Evolution RC	Kendro, Dreieich
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, 5424	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blotter, Semi-Dry	Biorad, München

7.1.3 Plasmide

Tabelle 13: Liste der verwendeten kommerziellen Plasmide

Bezeichnung	Resistenzen	Hersteller
pACYC-Duet-1	camR	Novagen
pCR4Blunt TOPO	carR, kanR	Invitrogen
pENTRY-IBA10	kanR	IBA
pENTRY-IBA51	kanR	IBA
pET-Duet-1	carR	Novagen
pPSG-IBA3	carR	IBA
pPSG-IBA23	carR	IBA
pPSG-IBA33	carR	IBA
pPSG-IBA35	carR	IBA
pPSG-IBA43	carR	IBA

7.1.4 Stämme

Tabelle 14: Aufzählung der eingesetzten Bakterienstämme

Stamm- Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
BL21 (DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen
BL21 (DE3) pLys	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3) pLysS(cmR)	Novagen
ccdB Survival 2	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2	Invitrogen
DH5α	F-, endA1, hsdR17(rK-mK+), supE44, thi-recA1, gyrA1, gyrA (Nalr), relA1, Δ(lacIZYAargF),U169 deoR (ΦdlacD(lacZ))	NEB
NEB Turbo	F' proA+B+ lacIq ΔlacZM15/fhuA2 Δ(lac-proAB). glnV zgb-210::Tn10 (TetR) endA1 thi-1 Δ(hsdSmcrB)	NEB
Rosetta 2 (DE3)	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CamR)	Novagen
SoluBL21	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) (+ unbekannte Mutationen)	Genlantis
TOP10	F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15, lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK, rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
XL10 Gold	TetRΔ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F-proAB lacIqZΔM15Tn10(Tetr)Amy Camr]	Stratagene

7.1.5 Kits

Tabelle 15: Liste von in der Arbeit verwendeten Kits

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
GeneJet Plasmid MiniPrep Kit	Plasmidpräparation	Fermentas (Thermo Fisher)
GeneJet Gelextraction Kit	Agruose-Gelextraktion	Fermentas (Thermo Fisher)
Minelute Gelextraction Kit	Agruose-Gelextraktion	Qiagen
Qiaquick Nucleoside Removal Kit	DNA-Reinigung	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	PCR-Produkt-Reinigung	Qiagen
Stargate Combi Entry Kit	Stargate-Entry-Vektor-Erstellung	IBA
Stargate Transfer Reagent Kit	Stargate-Expression-Vektor-Erstellung	IBA
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Transfer-Plasmid-Herstellung	Invitrogen

7.1.6 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von NEB erworben, ebenso wie Ligasen, Phosphatasen und die in der PCR eingesetzten Polymerasen. Eine Ausnahme bildete die *Phusion Hot Start DNA Polymerase* (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific).

7.1.7 Oligonukleotide

Alle unmodifizierten DNA-Stränge wurden von der Metabion AG (Martinsried) hergestellt und gereinigt. Hinzu kommen mit didesoxy-Cytidin modifizierte DNA-Stränge.

7.1.7.1 DNA-Stränge zur Kristallisation

Tabelle 16: Zusammenstellung aller verwendeten Plasmide

DNA-Name	Sequenz
Polk-cry_13nt_ddC	GGG GGA AGG ACT ddC
AAF_template_1	CCT AGG AGT CCT TCC CCC
AAF_template_noles	CCT AGG AGT CCT TCC CCC
CPD_Templat	CTA TTG AGT CCT TCC CCC
AAF_primer_T_ddC	AGG GGA AGG ACC ddC
AAF_template_2	CCT AGG AGT CCT TCC CCT
Polk_primer_E	GGG GGA AGG ATT ddC
Templat_E_noles	TCA CGG AAT CCT TCC CCC
Pt_ddC	GGG GGA AGG ATT ddC
Polk_GG_1	TCA CGG AAT CCT TCC CCC
Poli_primer_ddC	AGG ACC ddC
Poli_template_nolesion	TCA GGG GTC CT

7.1.7.2 DNA-Stränge für Primer-Verlängerungsstudien

Tabelle 17: Liste aller DNA-Stränge für Primer-Verlängerungsstudien

DNA-Name	Sequenz
Polk Primer Fluo	5'-Fluo-GAC CTC GCG ATG G
Polk 30 Template	GCC GGA TGA TCG TGG CGC CAT CGC GAG GTC
Polk_templ30_iota	GCC GGA AGA ACG AGG CGC CAT CGC GAG GTC
Polk_cryagg_13nt_dC	5'-Fluo-GGG GGA AGG ACT C
AAF_template_1	CCT AGG* AGT CCT TCC CCC
Pt_Fluo	5'-Fluo-GGG GGA AGG ATT
Polk_GG_1	TCA CGG AAT CCT TCC CCC

7.1.7.3 Sequenzierungsprimer

Tabelle 18: Liste von Sequenzierungsprimern

DNA-Name	Sequenz
Suppression_RV_Primer	TGC TCA GCG GTG GCA GCA GCC
eCo_GOI_FW	AAC AGA AAG TAA TCG TAT TG
pet_duet down	GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA
pet_duet1_lacrep_FW	ACT GGT TTC ACA TTC ACC A
PSG_primer_RV	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG
Polk _s _sequmid_FW	CCA TTA GAA AGG TTT CTG G
PolI_mid_sequ_FW	CTT CTA AGT GTG TGC TTC T
PolI_mid_sequ_RV	AGC CAG CTC GCA GGG AGT T
M13_FW	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13_RV	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
Pyl-Sequ-FW	AAC TAG TAC GCA GGG GCA

7.1.7.4 Mutationsprimer

Tabelle 19: Auflistung von allen verwendeten Mutationsprimern

DNA-Name	Sequenz
Polk_mut_163_FW	GCT AAG AGG CTG TGC CCA TAG CTT ATA ATA GTG CCC CCC
Polk_mut_163_RV	GGG GGG CAC TAT TAT AAG CTA TGG GCA CAG CCT CTT AGC
Polk_527mut_TEV_SG_FW	AGC GGC TCT TCA ATG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC TCC TTC ACC TAG AGC ATT ATT GGC TTT TTA CAG G
Polk_527wt_TEV_SG_FW	AGC GGC TCT TCA ATG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC TCC TTC ACC AGG AGC ATT ATT GGC TTT TTA CAG G
Polk_447_mut_FW	GTG AGC TTG CTC AGG ATC TAT AGA AAG AAA GAC TTA AGG GTA G
Polk_447_mut_RV	CTA CCC TTA AGT CTT TCT TTC TAT AGA TCC TGA GCA AGC TCA C
Polk_526_mut_FW	AAG AGG ACA GGA AAC ACC AAT AGG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GC
Polk_526_mut_RV	GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC CTA TTG GTG TTT CCT GTC CTC TT
PolI_Q59A_FW	CAA ACC TTT AGG GGT TCA AGC GAA ATA TTT GGT GGT TAC CTG
PolI_Q59A_RV	CAG GTA ACC ACC AAA TAT TTC GCT TGA ACC CCT AAA GGT TTG

7.1.7.5 Klonierungssequenzen

Tabelle 20: Alle für Klonierung eingesetzten DNA-Stränge

DNA-Name	Sequenz
Polκ_full_FW_SG	AGC GGC TCT TCA ATG GAT AGC ACA AAG GAG AAG TGT G
PolKs_SG_FW	AGC GGC TCT TCA ATG GGC CTG AAC GAT AAT AAA GCA GGA ATG GAA GGA T
Polκ_68_FW_SG	AGC GGC TCT TCA ATG CAA CAA AAA GCT CAA ATC ACC AGC
PolKs_SG_RV	AGC GGC TCT TCT CCC TTG TTG GTG TTT CCT GTC CTC TTC
Polκ_full_FW_SG	5'-Pho-AAT GGA TAG CAC AAA GGA GAA GTG TGA C
Polκ_full_RV_SG	5'-Pho-TCC CCT TAA AAA ATA TAT CAA GGG TAT GTT TGG G
Polκ _s _TEV_FW_SG	AGC GGC TCT TCA ATG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC TCC TTC ACC ATG GGC CTG AAC GAT AAT AAA GCA
Polκ _s _TEV_RV_SG	AGC GGC TCT TCT CCC GGT GAA GGA GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC TTG TTG GTG TTT CCT GTC CTC TTC
Polκ _s _CTEV_Strepadd_SG	AGC GGC TCT TCT CCC TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA AGC GCT CCC GGT GAA GGA GCC CTG AA ATA
Polκ_SG_870_RV	AGC GGC TCT TCT CCC CTT AAA AAA TAT ATC AAG GGT ATG TTT G
Polκ _s _SG_FW	AGC GGC TCT TCA ATG GAA CTG GCG GAC GTG GGG
Polκ _s _SG_RV	AGC GGC TCT TCT CCC GGT GAA GGA GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC CTT AGC AGT ATT TAG TGC TTT AAG
KAN_FW_AatII	AGA TGT CAG ACG TCG CAA GCA GCA GAT TAC GCG CAG
KAN_RV_SacI	TCG TAA CCG AGC TCG CTA GAT GGG TCC AGC ACT TTT CGG
pACYC_KAN_FW_SacI	GAG ACT ACG AGC TCA GCT TCC TTA GCT CCT GAA AAT CTC G
pACYC_KAN_RV_AatII	TGT TCA AGA CGT CGG CAG TTA TTG GTG CCC TTA AAC G

DNA-Name	Sequenz
L19_Fc_wt_FW	CCG CGT GAA GAA CAG TAT AAT AGC ACC TAT CGT GTT GTT
L19_Fc_wt_RV	AAC AAC ACG ATA GGT GCT ATT ATA CTG TTC TTC ACG CGG
TFIIB_FW_SG	AGC GGC TCT TCA ATG ATG ACT AGG GAG AGC ATA GAT A
TFIIB_RV_SG	AGC GGC TCT TCT CCC TTT CTT TTC AAC GCC CGG TAA

7.1.8 Chromatographie-Säulen

Tabelle 21: Liste aller eingesetzten Chromatographie-Säulen

Säulentyp	Material	Abmessungen	Säulenvolumen	Hersteller
His-Säule	Ni-NTA-Superflow	16 x 200 mm	7,5 ml	GE Healthcare/ Qiagen
Heparin	Heparin Sepharose™ 6 Fast Flow	16 x 100 mm	20 ml	GE Healthcare
MonoQ	MonoBeads Q (10 µm)	5 x 50 mm	4 ml	GE Healthcare
Steptactin-Säule	Strep-Tactin® Superflow	1 x 50 mm	5 ml	IBA
Superdex G75	Superdex G75	16 x 600 mm	120 ml	GE Healthcare
Superdex S200	Superdex S200	16 x 600 mm	120 ml	GE Healthcare
Nano-Vorsäulen	Acclaim Pepmap 100, C18, 5 µm, 100 Å	0,3 x 5 mm	0,004 ml	Dionex (Thermo Fisher)
Nano HPLC Säule	Reprosil C18 3 µm 120 Å Reprosil C4 5 µm 300 Å	0,075 x 150 mm	0,001 ml	New Objective, Dr. Maisch GmbH

7.1.9 Pufferbedingungen

Tabelle 22: Aufzählung aller verwendeten Lösungen und Puffer

Puffer	Bestandteile
Agarose-Ladepuffer (5x)	5 x TBE Puffer 30% Glycerin (w/v) 1 mg/ml Bromphenolblau
Click-Puffer	50 mM Tris/HCl pH = 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA 5 % Glycerin
Heparin A	50 mM Tris/HCl pH = 7,5 1 mM EDTA 5 mM DTT 5 % Glycerin (w/v) 100 mM NaCl
Heparin B	Heparin A 800 mM NaCl
His A	50 mM Tris/HCl pH = 7,5 500 mM NaCl 20 mM Imidazol
His B	50 mM Tris/HCl pH = 7,5 500 mM NaCl 250 mM Imidazol
MonoQ A	10 mM Tris/HCl pH = 7,5 1 mM EDTA 100 mM NaCl
MonoQ B	10 mM Tris/HCl pH = 7,5 1 mM EDTA 1 M NaCl
NEB-Puffer 1 (1x)	10 mM Bis-Tris-Propan/HCl pH = 7,0 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol
NEB-Puffer 2 (1x)	10 mM Tris/HCl pH = 7,9 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol
NEB-Puffer 3 (1x)	50 mM Tris/HCl pH = 7,9 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol

Puffer	Bestandteile
NEB-Puffer 4 (1x)	50 mM KOAc pH = 7,9 20 mM Tris-acetat 10 mM Magnesium Acetate 1 mM Dithiothreitol
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ pH = 7,4 1,76 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
PBST (1x)	PBS (1x) 0,1 % Tween 20 (w/v)
Polκ-Click-Puffer	50 mM MOPS/NaOH pH = 7,5 200 mM NaCl 1 mM EDTA 5 % Glycerol
Polκ-Kristallisationspuffer	27,5 mM HEPES/NaOH pH = 7,0 220 mM NaCl 11 mM MgCl ₂ 1,1 mM TCEP
SDS-Ladepuffer (5x)	5 x SDS-Laufpuffer 30% Glycerin 1 mg/ml Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris/HCl pH = 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)
Strep A	100 mM Tris/HCl pH = 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Strep B	Strep A 2,5 mM Desthiobiotin
T4-Ligase-Puffer (1x)	50 mM Tris/HCl pH = 7,5 10 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol 1 mM ATP
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris/HCl pH = 8,5 20 mM Eisessig 1 mM EDTA
TBE-Puffer (1x)	89 mM Tris pH = 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA

Puffer	Bestandteile
TBS	50 mM Tris/HCl pH = 7,5 150 mM NaCl
TBST	TBS 0,1 % Tween 20 (w/v)
Urea-Ladepuffer (2x)	2x TBE-Puffer 7 M Urea 20 % Glycerin (w/v) 1 mg/ml Bromphenol (5 mg/ml) Xylencyanolblau

7.1.10 Medien

Tabelle 23: Liste aller verwendeten Wachstums-Medien

Bezeichnung	Bestandteile
Autoinduktionsmedium	siehe Rezept Autoinduktionsmedium
LB-Agar	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 10 g/l Pepton aus Casein 15 g/l Agar-Agar
LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 10 g/l Pepton aus Casein
M9-Minimalmedium	1 x M9 salts 2 mM MgSO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ 0,4 % Glycerin oder Glukose pH ≈ 7,4
SOB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton aus Casein 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ pH = 7,5 (NaOH)
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glukose (sterilfiltriert)
TB-Medium	24 g/l Hefeextrakt 12 g/l Pepton aus Casein 72 mM KH ₂ PO ₄ 17 mM Na ₂ HPO ₄ 4 ml Glycerin

7.2 Methoden

7.2.1 Molekularbiologische Methoden

7.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode dient zur Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte mittels Primern und einer temperaturstabilen DNA-Polymerase. Ein Temperaturzyklus wird zur Strangvervielfältigung verwendet.

PCR-Ansatz:
1x Reaktionspuffer
100 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer
etwa 1 – 10 fmol Templat
250 µM dNTPs
0,5 – 2 U DNA-Polymerase
ad 100 µl MQ-Wasser

Ein PCR-Programm besteht im Allgemeinen aus 5 Schritten, wobei sich Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung zyklisch wiederholen.

Zur Strangtrennung wurden 98 °C für *Phusion*®-DNA-Polymerase bzw. *Vent*®-DNA-Polymerase und 95 °C für die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Die Primeranlagerung wurde bei etwa 5 – 10 °C unterhalb der Schmelztemperatur der bindenden Sequenz durchgeführt. Zur Elongation wurde die Reaktion bei 72 °C inkubiert, wobei für die Taq-Polymerase 60 sec/kb und die Phusion-Polymerase 30 sec/kb eingeplant wurden. Das PCR-Programm für die Phusion®-DNA-Polymerase ist in Tabelle 24:

Tabelle 24: Programm einer Standard-PCR mit Phusion®-DNA-Polymerase

98 °C	30 sec	1 x
98 °C	20 sec	
55 °C	10 – 30 sec	25 x
72 °C	30 sec/kB	
72 °C	8 min	1x

7.2.1.2 Einzelkolonie-PCR (*single colony PCR*)

Es wurde hierfür eine Standard-PCR wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings ohne Templat. Da hier die Sequenzgenauigkeit sekundär ist, konnten, um Kosten zu einzusparen, günstigere Enzyme (wie z. B. Taq-Polymerase) verwendet werden. Die Primer mussten hierbei so gewählt werden, dass sich ein für das Klonierungsprodukt charakteristisches Muster abzeichnete; im Speziellen sollte die Orientierung des Fragments im Plasmid zu erkennen sein.

Die fertigen Reaktionslösungen wurden im 20 – 33 µl Ansatz in einzelne PCR-Röhrchen überführt. Nun wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie in einen Reaktionsansatz gegeben und die an der Spitze verbleibenden Zellen auf eine neue LB-Platte mit gleicher Resistenz übertragen. Der Reaktionsansatz wurde auf einem Agarosegel analysiert. Über die neue LB-Platte konnten die positiven PCR-Banden mit den Klonen in Relation gesetzt werden.

7.2.1.3 Positionsspezifische Mutagenese

Direkte Mutagenese:

Hierfür wurden Primer entworfen, die selbstkomplementär sind und die die zu mutierende Position der Sequenz mit etwa 15 – 20 Basen stromaufwärts und -abwärts flankierten. Die Schmelztemperatur errechnete sich nach der Formel des Kits „*QuikChange Lightning*“ (Agilent, Waldbronn, Abbildung 84).

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

Abbildung 84: Formel zum Berechnen der benötigten DNA-Schmelztemperatur zur Punktmutagenese; T_m : Schmelztemperatur der DNA, %GC: GC-Gehalt der DNA in %, N: Länge des DNA-Stücks, %Fehlpaarungen: Anteil der fehlpaarenden Basen in Relation zum Gesamtstrang in %.

Mutagenese-Reaktion:
30 pmol der beiden Primer
10 - 100 fmol Ausgangsplasmid,
1 x HF Puffer
2 U Phusion-DNA-Polymerase
ad 100 µl MQ-Wasser

Tabelle 25: Ablauf einer PCR zur direkten Mutagenese

98 °C	3 min	
98 °C	1 min	
55 °C	1 min	20 x
72 °C	8 min	
72 °C	14 min	

Nach der PCR wurde die Reaktionslösung über Nacht bei 37 °C mit 1 µl *DpnI* (20 U) verdaut. Dadurch wurden die Ausgangsplasmide zerstört und es blieb das unmethylierte PCR-Produkt zurück, da *DpnI* nur methylierte CATG-Sequenzen schneidet. Das Reaktionsprodukt wurde in einen *recA*-defizienten Stamm transformiert. Es empfahl sich der Einsatz von ultrakompetenten Zellen, da sich geknickte Plasmide ergaben, welche schwieriger in die Zellen aufgenommen werden konnten. Die erhaltenen Plasmide wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert.

Megaprimer:

Für schwierige Mutationen mit anspruchsvollen Templat-Plasmiden konnte man ein mehrstufiges PCR-Programm durchführen. Hierbei erfolgte die PCR-Reaktion mit einem Primer, der wie oben beschrieben entworfen wurde. Als zweiter Primer diente allerdings ein normal-bindender kurzer DNA-Strang, der sich etwa 500 – 2000 bp entfernt anlagerte. Nun erzeugte man in den ersten Runden der PCR die Megaprimer, welche zu 50 % die gewünschte Mutation tragen sollten. Im Folgenden konnten diese langen DNA-Doppelstränge leichter an das Plasmid anlagern und es amplifizieren.

Tabelle 26: Programm einer Megaprimer-PCR-Amplifikation

98 °C	3 min	
98 °C	1 min	
55 °C	1 min	5 x
72 °C	1 min/kB	
98 °C	1 min	
72 °C	1 min/kB	20 x
72 °C	16 min	

Die weiteren Schritte inklusive Analytik waren identisch zur direkten Mutagenese.

7.2.1.4 Primer-Verlängerungsstudien

Die Analysen wurden jeweils im 10 µl-Maßstab durchgeführt. Es wurde hierbei ein fluorescein-markierter Primer verlängert. Die Standardreaktionen erfolgten mit einem 13-mer-Primer (Polk Primer Flou) und einem 30-mer-Templat (Polk Templat 30).

Es wurde eine 2-fach-konzentrierte Reaktionsmischung erstellt und diese mit Zugabe der Polymerase gestartet.

Tabelle 27: 2-fach-konzentrierte Reaktionsmischung für Primer-Verlängerungsstudien

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Primer	5 µl (100 µM)	5 µM
Templat	7,5 µl (100 µM)	7,5 µM
dNTPs	1 µl (4 x 25 mM)	4 x 0,25 mM
1x NEB-Puffer 2	ad 100 µl	1 x NEB-Puffer 2

Die Polymeraselösung enthielt genau die doppelte gewünschte Endkonzentration im gleichen Puffer. Die Standardreaktion bestand aus 5 µl Reaktionsmischung (2x) und 5 µl Polymeraselösung. Diese wurde für 5 Minuten bei RT vorinkubiert und 25 Minuten bei 37 °C belassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Urea-Ladepuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte durch Harnstoff-PAGE.

7.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die Stoffmenge an DNA wurde über Absorption der Proben bei 260 nm gemessen. Hierfür wurde für lange DNA-Stränge der Wert nur nach dem Standardwert für einzelsträngige DNA (33 µg/A₂₆₀), doppelsträngige DNA (50µg /A₂₆₀) oder RNA (40µg /A₂₆₀) ermittelt. Kurze DNA-Oligonukleotide wurden über den Extinktionskoeffizienten (ϵ_{260}) berechnet. Die Ausgangswerte waren: $\epsilon_{\text{Adenin}} = 15200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Guanin}} = 12010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Thymidin}} = 8400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Adenin}} = 7050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Alle Messungen erfolgten an einem Nanodrop 1000.

7.2.1.6 Agarose-Gel

In diesem weitmaschigen Gel, welches durch das Schmelzen und Polymerisieren von langen Agaroseketten entsteht, kann langsträngige DNA (100 – 10000 Basenpaare) getrennt werden. Die Konzentration der Agarose bestimmt hierbei die Porengröße und somit die trennbaren Größenbereiche von Nukleinsäuren.

Zur Standardanalytik von PCR-Produkten und Plasmid-Restriktionen wurden 500 mg Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer gelöst (1 %iges Gel) und aufgekocht, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde dann mit 1 mM Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelapparatur mit Kamm gegossen. Hierbei ist es wichtig das Gel mit Puffer zu bedecken, bevor der Kamm gezogen wird. Typische Laufparameter entsprechen etwa 10 V/cm. Als Standard wurde die *1 kb Ladder* von NEB verwendet. Für Fragmente kleiner 1000 bp wurde der *100 bp Marker* benutzt.

7.2.1.7 Polyacrylamidgele

Polyacrylamid kann durch die Kombination von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid ein engmaschiges Netz bilden. Für die Analyse kurzer DNA-Stränge wurde ein Verhältnis von 19 : 1 verwendet, während Proteine typischerweise durch ein 37,5 : 1 Gemisch getrennt wurden. Zusätzlich konnte die Dichte des Gels variiert werden. Zur DNA-Analytik wurden eher „dicke“ Gele eingesetzt (etwa 15 – 25 %), während Proteinen 4 – 20 %ige Gele zum Trennen dienen.

Denaturierende Harnstoff-PAGE

Zur Analyse von Primer-Verlängerungsreaktionen oder anderer kurzer DNA-Oligomere wurde die Harnstoff-PAGE verwendet. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass der enthaltene Harnstoff als chaotropes Salz wirkt, was zum Bruch von Wasserstoffbrücken und zur Denaturierung von Doppelsträngen führt. Somit ist eine exakte Auftrennung nach Stranglänge möglich.

Harnstoff-PAGE-Ansatz:
1x TBE-Puffer
0,83 M Harnstoff
20 % Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese Sequenziergel)
2,2 mM (0,5 % w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
0,5 mM (0,05 % v/v) Tetramethylethyldiamin (TMEDA)

Die Taschen mussten gründlich mit Puffer gespült werden, um ein sauberes Einlaufen der Banden in das Gel zu gewährleisten. Nachdem die Proben mit 1x Harnstoff-Auftragspuffer versetzt wurden, konnten sie vorsichtig in die Mitte des Taschenbodens pipettiert werden. Die Spannung wurde zunächst auf etwa 10 V/cm gehalten und nach dem Eindringen der Banden

in das Gel wurde die Spannung auf 20 V/cm erhöht. Das Bromphenolblau im Auftragspuffer diente, beim Erreichen des Plattenendes, als Marker für den Abschluss der Elektrophorese.

Native PAGE:

Der Gelaufbau ist dem denaturierenden Gel sehr ähnlich, allerdings entfällt das denaturierende Agens, deshalb eignet sich die native PAGE, um Komplexe oder spezielle Sekundärstrukturen von DNA sichtbar zu machen. Dabei muss bedacht werden, dass es aufgrund von Faltung zu Abschirmung von Ladungen kommen kann, somit ist das Laufverhalten der Probe nicht mehr exakt mit der Molekülgröße in Relation zu setzen. Daher können lediglich Verschiebungen beobachtet werden.

Native PAGE-Ansatz:
1 x TBE Puffer,
10 – 20 % Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese 30)
2,2 mM (0,05 % w/v) APS
0,5 mM (0,005 % v/v) TMEDA

Die Vorbereitung des Gels war identisch zur Harnstoff-PAGE. Die Spannung musste allerdings so variiert werden, dass die Temperatur nicht zur thermischen Denaturierung der Probe führte.

7.2.1.8 Stargate-Klonierung

Das Stargate-System bietet die Möglichkeit, eine gewünschte Sequenz zunächst in einen *Entry-Vektor* einzubringen, um von diesem aus ein breites Spektrum von Expressionsvektoren zu adressieren.

Zum Erzeugen des *Entry-Vektors* wurde eine PCR-Reaktion der Zielsequenz entweder mit 5'-phosphorylierten Primern (pENTRY-IBA10) oder mit angefügter Signalsequenz am 5'- und 3'-Ende des zu klonierenden Bereiches (pENTRY-IBA51) durchgeführt. Die Primer sollten eine Schmelztemperatur von 60 – 63°C aufweisen.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde durch einen *Qiagen PCR-Purification-Kit* gereinigt und anschließend in eine *Stargate-Entry-Reaktion* eingesetzt.

Dazu wurden 20 – 50 ng PCR-Produkt (in 12 µl) in das Stargate-Reaktionsröhrchen gegeben und dann jeweils 1 µl der Reaktionslösungen M1, M2 und M3 zugesetzt. Die Reaktionslösung

wurde für 2 h bei 30 °C geschüttelt und anschließend 5 – 10 µl in den gewünschten Klonierungsstamm (TOP 10 oder DH5α) transformiert.

Die Plasmide wurden durch den Aufschluss von 5 ml Vorkulturen gewonnen, die aus einzelnen Kolonien angeimpft wurden.

Nach molekularbiologischer Verifizierung des Produktes durch Restriktionsverdau und Sequenzierung wurden etwa 50 ng *Entry-Plasmid* in eine Ziel-Vektor-Reaktion eingesetzt und mit je 1 µl A1-, A2- und A3-Lösung versetzt. Nach 2 h bei RT wurden 5 – 10 µl in einen Klonierungsstamm transfiziert. Nach erneuter Überprüfung des Produkts konnte das erzeugte Plasmid in den gewünschten Expressionsstamm eingebracht werden.

7.2.1.9 TOPO-Klonierung:

TOPO-Reaktionen bieten die Möglichkeit ein PCR-Produkt ungerichtet in ein TOPO-Plasmid einzubringen (pCR4Blun-TOPO-PCR-Klonierung) und so eine amplifizierbare Ausgangskomponente zu erzeugen oder neue Schnittstellen zu generieren.

Ansatz TOPO-Zero-Blunt:
1 µl des Blunt-Vektors (15 – 20 ng)
20 – 50 ng PCR-Produkt
1 µl Salz-Mix (für chemisch kompetente Zellen)
1 µl Salz-Mix (1:4 verdünnt, für elektrokompetente Zellen)
ad 6 µl MQ-Wasser.

Die Reaktion lief 30 min bei RT. Anschließend wurden die Reaktion transformiert und die Produkte überprüft.

Die zweite Variante ist die gerichtete TOPO-Klonierung, welche dazu dient ein *Donor-Plasmid* für die Gateway-Klonierung zu erzeugen. Die Reaktion lief analog zur oben beschriebenen mit dem Unterschied, dass das PCR-Produkt eine 5'-CACC-Sequenz tragen musste.

Der Ansatz erfolgte wie bei der ungerichteten TOPO-Klonierung mit einer Reaktionszeit von 30 Minuten.

7.2.1.10 Klassische Klonierung

Restriktion

Die Schnittstellen für betreffende DNA-Doppelstränge wurden so ausgewählt, dass die Schnittstellen mindestens 6 – 8 Basen vor Ende der Sequenz lagen, um ein effizientes Schneiden durch Restriktionsenzyme zu ermöglichen.

Es wurden jeweils etwa 5 U Enzymlösung pro Schnittstelle und 1 µg an DNA zugegeben und 1 – 2 h in dem empfohlenen Puffer und bei geeigneter Enzymtemperatur inkubiert. Dies ermöglichte ein schnelles und effizientes Verdauen und war besonders bei Reaktionen, die ein vollständiges Verdauen von DNA benötigten (z. B. Mutagenese), von Vorteil.

Ligation

Für eine Ligation von zwei Fragmenten mit überhängenden Enden wurden Plasmid und Insert in einem Verhältnis von 1 : 3 (n/n) in T4-Ligase-Puffer (NEB) zusammengegeben. Dabei wurde das Plasmid-Fragment zuvor stets dephosphoryliert. Beide Fragmente wurden zuvor per Agarosegel gereinigt und durch Gelextraktion rückgewonnen.

Die Reaktion erfolgte für 1 – 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C. Das Produkt wurde in einen Klonierungsstamm eingebracht. Je nach Bedarf wurden die Plasmide durch Plasmidpräparation von 5 ml Bakterienkulturen gewonnen oder es wurden bereits die Kolonien durch Einzelkolonie-PCR (*single colony PCR*) analysiert.

7.2.2 Proteinbiochemische Methoden

7.2.2.1 SDS-PAGE

Dieser Geltyp ermöglicht es Proteine in entfalteter Form nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Dies geschieht über thermische Denaturierung und Anlagerung von SDS an kationische und lipophile Aminosäurereste, wodurch es zu einer Maskierung der Eigenladung des Proteins kommt. Die SDS-PAGE besteht aus Sammel- und Trenngel, die sich im pH-Wert unterscheiden. Das führt zu einem Leitonenwechsel, der die Proteinbanden zunächst fokussiert und anschließend aufgetrennt.

Ansatz SDS-Sammelgel
3,75 % Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese 30)
0,25 M Tris/HCl (pH = 6,8)
0,1 % SDS (w/v)
4,4 mM (0,1 %, w/v) APS
2,5 mM (0,025 %, v/v) TMEDA
ad 4 ml MQ-Wasser

Ansatz SDS-Trenngel
12,5 % Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese 30)
0,375 M Tris/HCl (pH=8,8)
0,1 % SDS (w/v)
4,4 mM APS (0,1 %, w/v)
1 mM TMEDA (0,01 %, v/v)
ad 12 ml MQ-Wasser

Das Trenngel wurde in die Gelapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 2 h wurde diese Schicht restlos entfernt, die Sammelgellösung aufpipettiert und der Kamm eingesteckt.

Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm „trocken“ gezogen. Das Gel wurde mit 1 x SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 20 V/cm betrieben bis der Bromphenolblau-Farbstoff das Gelende erreichte.

Das Gel wurde in Coomassie-Lösung (0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R-250 in Entfärber-Lösung (10 % Eisessig (v/v), 20 % Ethanol (vergällt), 70 % VE-Wasser)) gefärbt und anschließend der Hintergrund in Entfärberlösung ausgewaschen.

7.2.2.2 Western-Blot

Mit diesem Blotting-Verfahren können selektiv Proteine nachgewiesen werden, die im SDS-Gel nicht direkt durch Coomassie-Färbung detektiert werden können (Nachweisgrenzen: Coomassie-Färbung 50 – 100 ng Protein, Western Blot (Chemolumineszenz) bis zu <1 ng).

Es wurde wahlweise eine ein- oder eine zweistufige Detektion durchgeführt (Abbildung 86).

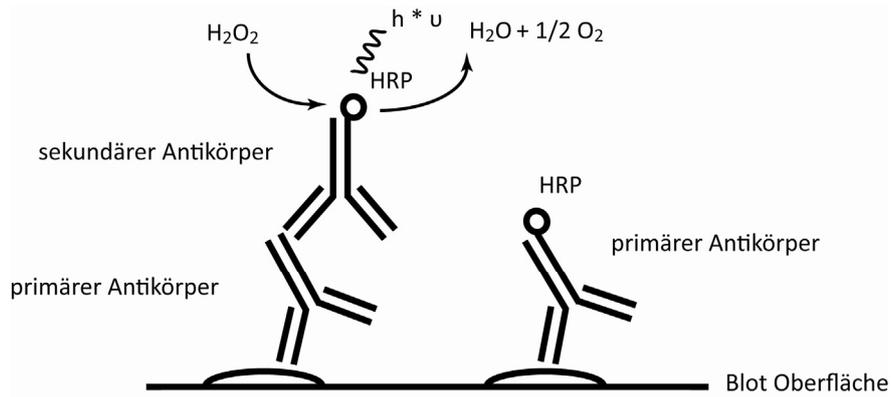


Abbildung 85: Reaktionsverlauf eines Chemolumineszenznachweises auf einer Western-Blotmembran im Zweistufenverfahren (links) und im Einstufenverfahren (rechts).

Zur Durchführung eines Western-Blots wurde eine ungefärbte SDS-PAGE in einer semi-trockenen Blotting-Apparatur (Trans-Blot SD Cell, Biorad) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA 3) übertragen. Hierzu wurden zunächst alle Komponenten in Blotting-Puffer eingelegt und - wie in Abbildung 86 gezeigt - zusammengesetzt. Es durften sich keinesfalls Luftblasen zwischen den Schichten bilden.

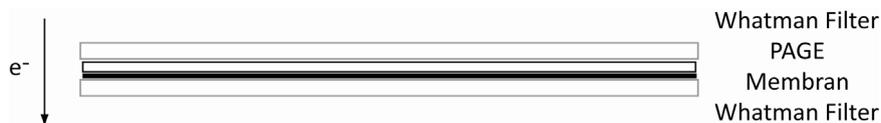


Abbildung 86: Schematischer Aufbau einer semi-dry Western-Blot Apparatur.

Der Blot wurde für etwa 20 min bei 15 V durchgeführt, bis die Stromstärke merklich abfiel.

Für die Bindung von Strep-TagII-enthaltenden Proteinen wurde ein Anti-Strep-MAB-IgG (Maus-Antikörper-Immunglobulin G) verwendet. Als Sekundär-Antikörper wurde ein HRP-konjugierter (Meerrettich-Peroxidase) Anti-Maus-IgG eingesetzt.

Zunächst wurde die Membran in TBST-Puffer gewaschen und mit einer 3%igen (w/v) BSA-Lösung in TBST-Puffer bei 4 °C 1h blockiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST überspült und eine 1 : 2500 verdünnte primäre Antikörperlösung in TBST auf die Membran gegeben und für 2 – 4 h bei 4 °C inkubiert. Nun wurde 3-mal für je 10 min mit TBST gewaschen und der sekundäre Antikörper 1 : 15000 verdünnt zugegeben. Dieser wurde für 0,5 – 1 h auf der Membran belassen und anschließend 3-mal je 15 min mit TBST gewaschen.

Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde die Membran zunächst mit 500 mM Tris/HCl (pH = 7,5) gespült und im Folgenden mit Detektionslösung 1 und 2 behandelt.

Tabelle 28: Detektionslösungen für die Entwicklung eines chemolumineszenten Western-Blots

Detektionslösung 1	Detektionslösung 2
5 mM Luminol	6,5 mM H ₂ O ₂ (10 µl 30%iger Lösung)
0,8 mM p-Cumarsäure	ad 15 ml MQ-Wasser
67 mM Tris/HCl 8,0	
ad 15 ml MQ-Wasser	

Die Analyse des Blots erfolgte in einer *Intelligent Darkbox* (LAS-3000, Fujifilm).

7.2.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

UV-Spektroskopische Analyse per Nanodrop 1000

Die Proteinkonzentration wurde mit einem Nanodrop 1000 gemessen. Hierbei wurde die Absorption bei 280 nm beobachtet. Die Konzentration wurde mittels ϵ_{280} bestimmt. Dieser wurde durch den *protein calculator V 3.3* von Chris Putnam (Scripps Institut, CA, USA) ermittelt (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>).

Bradford Assay

Zur Proteinbestimmung wurde das Bradford-Protein-Assay von Biorad verwendet. Die Stammlösung wurde 1 : 4 (v/v) verdünnt. Davon wurden 950 µl in eine 1-ml-Küvette gegeben und die Probe in 50 µl Volumen zugegeben. Das Hintergrundsignal wurde durch 950 µl Bradfordlösung und 50 µl des Puffers der Probe ermittelt. Die Assays wurden mit Hilfe des Microbradford-Programms des Biospektrometers von Eppendorf gemessen.

7.2.3 Zellaufschlussmethoden:

7.2.3.1 Homogenisator (Emulsi-Felx C5)

Diese Form des Zellaufbruchs basiert auf den schnellen Wechseln (etwa 2 mal/sec) zwischen Hochdruckzustand (500 – 1000 bar) und Normaldruck. Die Methode ist relativ rabiät und erzeugt mehr Hitze als z. B. die *french press*. Sie ist allerdings gut für größere Volumina (> 100 ml) geeignet.

Es wurde penibel darauf geachtet, dass die Zellsuspension keine Klumpen enthielt, da die Ventile im Inneren des Gerätes über Porzellankugeln schließen, wobei schon minimale Verschmutzungen zur Fehlfunktion führen können.

Vor dem Beginn des Versuchs wurde die Apparatur mit eiskaltem Wasser und Puffer gekühlt (nur für nativen Aufschluss).

Zum Aufschluss wurde die gelöste Bakterienkultur in das Reservoir des Homogenisators gegeben und das Gerät durch Anlegen von Druck (10 bar Stickstoff) gestartet. Nun wurde schnell das Gegendruckventil so stark geschlossen, dass sich ein rhythmischer Aufschluss einstellte. Dies wurde so lange fortgesetzt, bis sich eine deutliche Farbvertiefung des Lysates zeigte.

7.2.3.2 *French press*

Der Unterschied zwischen French press und Homogenisator besteht darin, dass in diesem Fall die gesamte Probe verdichtet wird und das Entspannen durch ein Auslassventil erfolgt. Das Druckgefälle geht von etwa 1000 bar bis zum Normaldruck. Ein Vorteil der *French Press* ist eine gute Kühlung der Probe bei nativen Aufschlüssen, wobei allerdings nur eine relativ kleine Probenmenge prozessiert werden kann (Kammervolumen 30 ml).

Die gesamte Apparatur wurde vor dem Beginn des Aufschlusses auf Eis gekühlt und dann zusammengebaut. Beim Einfüllen der Zellsuspension wurde auf den Ausschuss von jeglichen Luftblasen geachtet, da diese die Qualität des Aufschlusses deutlich verschlechterten. Die Abfolge des Zykluses von Probeneinzug, Verschließen des Ventils, Druckaufschluss und Öffnen des Ventils wurde so lange wiederholt bis der Aufschluss einen bräunlichen Farbton annahm.

7.2.3.3 Vorbereitung des Zellysates für die weitere Reinigung

Um Zellreste, Proteinpräzipitate und andere unlösliche Verunreinigungen abzutrennen wurde das Lysat zentrifugiert (Sorval Evolution RC, SS-34, 18000 rpm, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde möglichst schnell dekantiert und mit Spritzenfiltern (Millipore 0,4 µm Minisart 16555-K) von Kleinstpartikeln abgetrennt.

7.2.4 Proteinreinigungsmethoden:

7.2.4.1 Reinigung 6x-Histidin-modifizierter Proteine

Einfüllen des Säulenmaterials und Wartung

Als Säule wurde eine XK-16 (GE-Helthcare) verwendet und mit 15 ml (etwa 7,5 ml Material) Ni-NTA-Superflow-Suspension (Qiagen) gefüllt. Zur Aktivierung des Säulenmaterials wurden entweder Ni²⁺- oder Co²⁺-Ionen eingesetzt.

Für die ausgiebige Reinigung der Säule wurde das Protokoll aus dem *Quiagen Expressionist* verwendet. Bei geringeren Verschmutzungen und zum Neubeladen der Säule mit Ionen wurde ein verkürztes Reinigungsprotokoll durchgeführt. Die Säule wurde hierfür lediglich mit 5 CV MQ-Wasser, 2 CV EDTA (100 mM, pH = 8,0), 5 CV MQ-Wasser, 2 CV NiCl₂ oder CoCl₂ (100 mM) und 5 CV MQ-Wasser gespült. Für eine erhöhte Bindekapazität konnte die Säule während des Spülens mit NiCl₂ oder CoCl₂ für einige Zeit ruhen gelassen werden und anschließend wurde das Protokoll wie oben fortgesetzt.

Reinigungsprotokoll (nativ)

Die beiden Pumpenköpfe des Systems wurden mit den Puffern His A und His B äquilibriert. Die Säule wurde zunächst mit MQ-Wasser und dann mit HisA equilibriert (Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt).

Tabelle 29: Übersicht von verwendeten Pufferlösungen für Ni-NTA-Säulen

His-Lysis-Puffer	His A	His B
50 mM Tris/HCl pH = 7,4	50 mM Tris/HCl pH = 7,4	50 mM Tris/HCl pH = 7,4
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl
20 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
+ 1 Tablette Roche complete (0,2 % Tween 20, w/v)		

Anschließend wurde der vorbereitete Rohextrakt (in His-Lysis-Puffer) über einen *Superloop* (50 ml) auf die Säule gespült und so lange ausgewaschen bis wieder die Grundlinie der Absorption bei 280 nm erreicht wurde. Die Elution erfolgte in einem Stufengradienten von 0 auf 100 % His B.

Reinigungsprotokoll (denaturierend)

Diese Arbeitsanleitung diente zur Gewinnung von sauberem Protein in entfalteter Form (z. B. zur Solubilisierung von *inclusion bodies*).

Die denaturierende Reinigung war identisch zur nativen Reinigung, allerdings erfolgten alle Schritte bei RT und alle Puffer enthielten zusätzlich 7 M Harnstoff.

7.2.4.2 Reinigung Streptavidin-Tag-markierter Proteine

Der Rohextrakt wurde mit einem Fluss von 1 ml/min in Strep-Puffer A auf die Säule gebracht. Es wurde gewaschen bis die UV-Spur wieder die Basislinie erreichte. Die Elution erfolgte per Stufenelution auf 100 % Strep-Puffer B.

7.2.4.3 Reinigung des Polymerase- κ -43-Proteins

Zunächst wurde eine Standard-Ni-NTA-Säule mit den Puffern HisA und HisB benutzt und der Rohextrakt aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit HisA wurde direkt hinter der Ni-NTA-Säule eine Streptactin-Säule in das System eingebracht und mit HisB eluiert (Abbildung 38, 120 Minuten). Somit konnten die Polymerase-Fractionen direkt an das Streptactin-Material gebunden werden. Es war ein großer Absorptionsanstieg zu erkennen, der anzeigte, dass die Bindekapazität der Ni-NTA-Säule die der Streptavidin-Säule um ein Vielfaches überstieg. (Für größere Proteinmengen könnte eine größere Streptactin-Säule eingesetzt werden oder es könnten mehrere Säulen in Reihe geschaltet werden.) Nun wurde die Ni-NTA-Säule aus dem System entfernt und das Protein mit einem Wechsel auf StrepB-Puffer eluiert (Abbildung 38, 145 Minuten).

7.2.5 Mikrobiologische Methoden

7.2.5.1 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Für elektrokompetente Zellen wurde zunächst eine LB-Medium-Vorkultur (*lysogenic broth*) von 10 ml mit dem gewünschten Bakterienstamm beimpft und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde in eine 200 ml LB-Medium-Kultur überimpft, bis zu einer OD von 0,4 – 0,6 inkubiert und 20 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden für 8 min bei 4000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und die Ablagerungen in 40 ml einer kalten sterilen 10 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Danach wurde nochmals abzentrifugiert, in 20 ml

Glycerin-Lösung resuspendiert, und dann wurde der gleiche Zyklus mit 10 ml wiederholt. Am Ende wurde das Pellet in 1 – 4 ml Glycerin-Lösung aufgenommen, in 50 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

7.2.5.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli*-Zellen

Es wurde eine bakterielle Vorkultur über Nacht in LB-Medium gezogen und am nächsten Morgen in eine 200 ml Schüttelkultur in SOB-Medium (*super optimal broth*) überimpft. Diese wurde bis zu einer OD von 0,7 inkubiert und dann auf Eis für 10 min abgekühlt. Die Zellen wurden anschließend bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 50 ml RF1-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in etwa 3 – 5 ml RF2-Puffer gelöst. Es wurden 50 µl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

7.2.5.3 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Transformation chemisch-kompetenter E.coli Zellen

Nachdem ein Aliquot kurz auf Eis angetaut wurde, wurden etwa 50 – 100 ng des Plasmids zugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte der Hitzeschock für 30 – 45 sec bei 42 °C. Danach wurden die Zellen noch 2 min auf Eis gestellt und anschließend mit 250 µl SOC-Medium (SOB-Medium mit zusätzlicher Kohlenstoffquelle) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension per Drygalskyspatel auf eine Agarplatte mit passenden Antibiotika ausgestrichen.

Transformation elektrokompeterer E.coli Zellen

Die Zellen wurden auf Eis vorinkubiert und etwa 50 – 100 ng Plasmid zugegeben. Nach 5 – 10 Minuten wurde die Zellsuspension in einer gekühlten Elektroporationsküvette (PEQlab, *elektroporation cuvette*, 2 mm) in einen *Biorad Micro Pulser* gestellt und das Programm „*Ec2*“ ausgeführt. Nun wurden 500 µl LB Medium in die Küvette überführt, die gesamte Suspension in das vorher benutzte sterile Reaktionsgefäß überführt und das Röhrchen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf LB-Agar mit den zugehörigen Antibiotika ausplattiert.

7.2.5.4 Expression von rekombinaten Proteinen in Schüttelkultur

IPTG-induzierte T7-Expression

Es wurde zunächst eine Vorkultur in 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1 l LB-Medium-Expressionskulturen mit 5 ml/l Vorkultur überimpft und bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 – 0,7 wachsen gelassen. Nun konnte mit 1 mM IPTG induziert und nach 4 h die Kulturen durch Zentrifugieren (Sorval Evolution RC, 8000 rpm, 8 min, 4 °C) pelletiert werden.

Autoinduzierte T7-Expression

Zu Beginn wurde eine 20 ml TB-Medium-Vorkultur (1 % Glukose enthaltend, v/v) beimpft, über Nacht inkubiert (37 °C) und am nächsten Tag in große Autoinduktionskulturen überimpft (5 ml/ 500 ml). Für gute Sauerstoffversorgung wurden 500 ml Kultur in einem 2 l Schüttelkolben (220 rpm) inkubiert, die Zellen für 4 h bei 37 °C wachsen gelassen und die Expression je nach Protein bei einer Temperatur zwischen 16 °C und 30 °C für 16 h durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorval Evolution RC, 8000 rpm, 8 min, 4 °C) geerntet.

Rezept für das Autoinduktionsmedium

Die Zusammensetzung dieses Mediums ist eine leicht abgewandelte Form des ZYP-5052-Mediums, entwickelt von Studier.^[271] Alle Lösungen, bis auf die Spurenelemente, die sterilfiltriert werden, werden autoklaviert und unter sterilen Bedingungen zusammengemischt.

Tabelle 30: Ansatz für 1 l Autoinduktionsmedium

Stammlösung	Menge
LB Medium (2x)	500 ml
50 % Glycerin (w/v)	20 ml
20 % Glukose (w/v)	5 ml
7 % Laktose (w/v)	50 ml
10 x Autoinduktions-Puffer	100 ml
MgSO ₄ (1 M)	2 ml
Spurenelemente (1000 x)	300 µl
dH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 31: Spurenelement-Stammlösung (50 ml, 1000 x)

Substanz	Konzentration	MW (g/ mol)	c (mg/ 50 ml)
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	20 mM	147,0	147,0
FeCl ₃	50 mM	162,2	405,5
MnCl ₂ * 5 H ₂ O	10 mM	197,9	99,0
ZnSO ₄ * H ₂ O	10 mM	179,5	98,8
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	2 mM	237,9	23,8
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	2 mM	249,7	25,0
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	2 mM	237,7	23,8
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	2 mM	242,0	24,2
SeO ₂	2 mM	111,0	11,1
H ₃ BO ₃	2 mM	61,8	6,2

Tabelle 32: Referenz für 10 x Autoinduktionspuffer

Substanz	Konzentration [mM]	Konzentration [g/l]
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	500	89,0
KH ₂ PO ₄ * H ₂ O	500	68,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	250	33,0

7.2.5.5 Expression in einem Fermenter (Minifors, Infors)

Der Fermenter bietet die Möglichkeit sehr exakt definierte Expressionbedingungen zu generieren. Es können Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Nährwertgehalt des Mediums angepasst werden.

Die Hauptkammer des Fermenters wurde mit dem benötigten Medium gefüllt. Im Fall von TB-Medium wurde die Lösung ungepuffert zugegeben. Nun wurden die Korrekturmittelflaschen mit 3 M Phosphorsäure, bzw. 5 M NaOH gefüllt. Diese mussten nicht mit in den Autoklaven gestellt werden, allerdings müssen die Schläuche des Fermenters während des Sterilisierens mit Wasser gefüllt sein. Eine weitere Korrekturmittelflasche wurde mit 50 % Glycerin als später einsetzbare Kohlenstoffquelle gefüllt. Die vierte Flasche verblieb leer. Nur im Falle von TB-Medium konnte über diese Flasche der Phosphatpuffer zugeführt werden. Alle weiteren Vorbereitungen wurden wie im Minifors Handbuch durchgeführt.

7.2.6 Einbau unnatürlicher Aminosäuren

Die Expression der Proteine mit unnatürlichen Aminosäuren erfolgte in Schüttelkultur. Proteinabhängig wurde hierbei Autoinduktionsmedium oder IPTG-induziertes LB-Medium verwendet.

Beim Einsatz von Autoinduktionsmedium wurde der Ansatz wie bereits beschrieben durchgeführt. Nach dem Animpfen wurde gewartet bis ein Anwachsen der Zellen sichergestellt war, um zu verhindern, dass die unnatürliche Aminosäure verloren ging. Dann wurde das Medium mit 2 mM Aminosäure versetzt und weiter inkubiert (4 h bei 37 °C und 16 h bei 16 – 30 °C).

Für die IPTG-induzierte Variante wurde ebenso verfahren, nur wurde bei einer OD = 0,6 – 0,7 mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C exprimiert.

Für analytische Tests wurden kleine Ansätze (5 ml) der Schüttelkulturen verwendet. Die Versuche basierten stets auf dem Auslesen des Fluoreszenzsignals von eYFP (K114Pyl). Es konnte entweder eine Analyse an einem konfokalen Mikroskop (Leica) oder durch ein Tecan-Fluoreszenzlesegerät (Tecan, GENios Pro) durchgeführt werden.

7.2.6.1 Konfokale Mikroskopie

Um Proben für das Mikroskop vorzubereiten wurden 10 µl Bakterienkultur auf einen Objektträger gegeben. Das Deckplättchen wurde an allen Kanten mit Hochvakuum-Schmierfett bestrichen, damit ein Austrocknen der Probe verhindert wurde. Die Anregung des Fluorophors erfolgte durch einen 488 nm Laser, das erzeugte Signal wurde durch einen Fluorescein-Filter geleitet und detektiert.

7.2.6.2 Fluoreszenzplattenlesegerät

Für eine Wachstumsanalyse wurde für jeden Messwert 100 µl Flüssigkultur in eine schwarze Mikrotiterplatte (96-well) gegeben und mit dem Tecan-Reader analysiert, dazu wurden die Filtereinstellungen von Fluorescein verwendet.

7.2.7 LCMS (Dionex Ultimate 3000, LTQ Orbitrap XL)

7.2.7.1 Präparierung der verdauten Proteinproben

Aus einem frischen SDS-Gel wurde die betreffende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dies konnte am besten auf einer sauberen Glasplatte durchgeführt werden. Das Gelstück wurde in kleine Würfel zerteilt ($< 1 \text{ mm}^3$) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Gelstücke wurden in MQ-Wasser und anschließend mit 200 μl 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$ (1 : 1, v/v) für je 15 min gewaschen, danach für 10 min mit ACN überschichtet und der Überstand verworfen. Nun wurden die Gelstücke in 100 μl 50 mM NH_4HCO_3 rehydriert, nach 5 min weitere 100 μl ACN zugegeben und 15 min gewartet. Im Anschluss wurde die Lösung wieder entfernt und die Stücke mit ACN bedeckt. Nachdem sich die Gelpartikel zusammengezogen hatten, wurden sie in einem Zentrifugalverdampfer (*Speedvac*) getrocknet. Die Gelstücke wurden in 10 mM Dithiothreitol (gelöst in 50 mM NH_4HCO_3) aufgenommen und für 45 min bei 56 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Überstand durch 55 mM Iodacetamid (gelöst in 50 mM NH_4HCO_3) ersetzt, für 30 min im Dunkeln bei RT geschüttelt und die Gelstücke 2 – 3 mal für je 15 min mit 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$ (1:1, v/v) gewaschen. Danach wurden die Gelstücke erneut in ACN geschrumpft und in einer *Speedvac* getrocknet.

Im Folgenden wurden die Proteinbanden mit einer 2 μl Trypsinlösung (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin) in 100 μl NH_4HCO_3 (50 mM) bei 37 °C üN inkubiert.

Die nun verdauten Peptide wurden in Stufen aus den Gelpartikeln eluiert. Zunächst behielt man die 100 μl Reaktionslösung in einem anderen Gefäß zurück. Die restlichen Stückchen wurden nun mit 100 μl 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung für 15 min mit Ultraschall behandelt. Dies wurde nach Zugabe von 100 μl ACN wiederholt. Die so gewonnenen 200 μl wurden ebenfalls in das Sammelgefäß gegeben. Die Gelstücke wurden nun mit 100 μl 5 %iger Ameisensäure 15 min im Ultraschall behandelt und erneut, nachdem 100 μl ACN zupipettiert wurden. Auch diese 200 μl wurden gesammelt. Die erhaltenen 500 μl (100 μl + 200 μl + 200 μl) wurden in einer *Speedvac* auf etwa 20 μl eingengt. Die Probe wurde nun noch über C18-Material Filterspitzen (Millipore) gereinigt und je nach Bedarf in 5 – 20 μl eluiert.

7.2.7.2 LCMS-Nano-Säulen-Herstellung

Als Grundausrüstung wurden Nadeln von der Firma New Objectives (FS360-75-N-5-C15), C-18 Säulenmaterial der Dr. Maisch GmbH (ReproSil-Pur C18-AQ, 3 μm , 120 \AA) und eine Packungsbombe von NEXT Advance (PC77-MAG) verwendet.



Abbildung 87: Druckkammer mit Gasflasche (N_2).

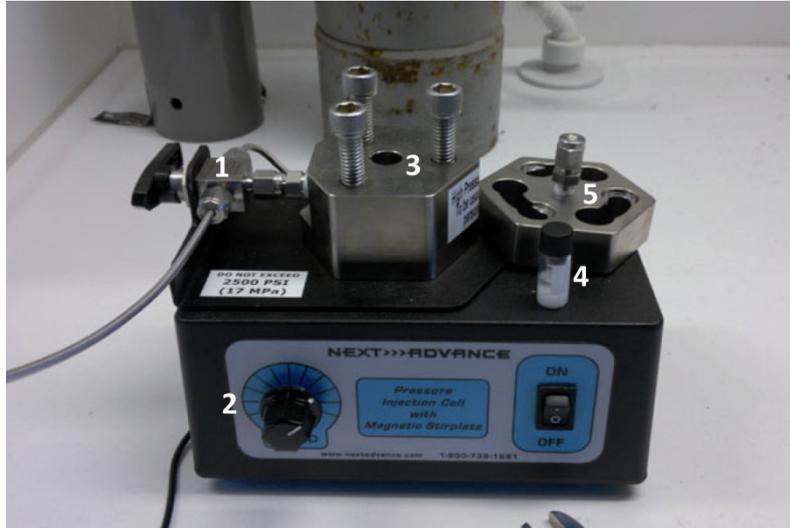


Abbildung 88: Detailaufnahme Druckkammer; 1: Gaszuführung Dreiwegehahn, 2: Magnetrührer, 3: Druckkammer, 4: Säulenmaterial (in MeOH), 5: Kammerdeckel mit Nadeleinpassung.

Es wurden zunächst 10 mg Säulenmaterial in etwa 500 μl Methanol (HPLC-Reinheitsstufe) in einem HPLC-Gläschen (2 ml) gelöst und für 10 min mit Ultraschall behandelt. Für manche Materialien konnte mit Aceton ein noch besseres Ergebnis erzielt werden. Nun wurde ein Rührfisch (5 mm) in das Gläschen gegeben und in die Säulenbombe eingebracht.

Die Kammer wurde verschraubt und eine der Nadeln mit der Spitze nach außen durch den oberen Dichtring in die Kammer eingeführt; in einer Weise, dass das Nadelende im Methanol steckte, allerdings den Rührfisch nicht behinderte. Nun wurde langsam Druck aus einer 200 bar Stickstoffflasche auf die Kammer gegeben. Zunächst 40 bar, wenn sich ein konstanter Fluss aus der Nadel eingestellt hatte, konnte der Druck auf 80 bar erhöht werden. Nach etwa 45 min war die Nadel gepackt. Die Packung konnte unter einem Lichtmikroskop validiert werden. Die endgültige Packung der Säule erfolgte an der Nano-HPLC (Dionex Ultimate 3000) unter einem Fluss von 0,75 – 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Druck: etwa 150 – 200 bar).

In gleicher Weise wurde auch für die Herstellung von Säulen zur Gesamtproteinanalytik verfahren. Hierfür wurde C4-Material (5 μm , 300 \AA , Dr. Maisch GmbH) verwendet.

7.2.7.3 LC-MS Kalibrierung

Die Gesamtkalibrierung des Gerätes wurde nur alle 2 – 3 Monate vorgenommen. Hardware-Einstellungen wie *FT-Transmission* und *Storage-Transmission* wurden nur in Anwesenheit von Technikern durchgeführt.

Vor Beginn der Kalibrierung mit einem Fluss von 3 – 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ *positive ion mode calibration solution* (Met-Arg-Phe-Ala Acetate, Kaffeine, UltramarkTM 1621) wurde ein stabiles Spray eingestellt (3 – 7 % RSD). In großen zeitlichen Abständen (1 – 2 / a) wurden Parameter, die für Scanprozesse der Ionenfalle essentiell sind (*normal, turbo (AGC) oder zoom scan*), kalibriert. Ebenso verfahren wurde mit Einstellungen für die Isolierung und die Fragmentierung von Ionen. In regelmäßigen Abständen (1 – 2 Wochen) wurden die Massengenauigkeit der Orbitrap und die Multiplier der linearen Ionenfalle geeicht. Für die Kalibrierung des negativen Modus wurde *negative ion mode calibration solution* verwendet (SDS, Tauroylchlorid, UltramarkTM 1621).

7.2.7.4 LC-MS Messung von tryptisch verdauten Proteinproben

Für eine Messung einer verdauten Proteinprobe wurde ein TOP 10-Scan verwendet. Hierbei wurden die Peptide in der Nadel ionisiert und in der LTQ-Falle gesammelt. Die Probe wurde zunächst in der Orbitrap bei einer Auflösung von 60000 ausgelesen. Somit konnte auch die Ladungszahl des Signals bestimmt werden. Es wurden alle einfach-geladenen Moleküle aus der Messung ausgeschlossen, da sie in der Fragmentierung nicht genug detektierbare Bruchstücke bilden. Es wurde ein Massenbereich von 400 – 1650 m/z (*normal range*) untersucht. Nun wurden von den übrigen Signalen die 10 höchsten ausgewählt, in der LTQ fragmentiert (CID) und ausgelesen. Die Identifikation des Mutterions erfolgte über die exakte Masse des Fullscans in der Orbitrap und dem erhaltenen Fragmentmuster der MS/MS-Analyse.

Die Nano-HPLC wurde im *preconcentration*-Modus verwendet. Das heißt, die Probe wurde zunächst in die Probenschleife gezogen und auf die Vorkonzentrierungssäule geladen. Das Spülen der Probe auf die Hauptsäule erfolgte nun mit dem Gradienten des Programms, so wurden eine doppelte Trennung und eine bessere Auflösung ermöglicht. Die Flussrate betrug 200 nl/min . Für den Mikropumpenkreislauf wurden LCMS-Mikro-Puffer A (Chromasolv H_2O , 0,1 % Ameisensäure), LCMS-Mikro-Puffer B (Chromasolv ACN, 0,1 % Ameisensäure) und LCMS-Mikro-Puffer C (Chromasolv ACN/ H_2O 80/20 (v/v)) verwendet. Der Ladepumpenkreislauf wurde von LCMS-Ladepuffer A (Chromasolv H_2O , 0,1 %

Ameisensäure) gespeist. Für Standard-Trypsin-Verdau-Analysen wurde ein Gradient von 5 % nach 35 % Puffer B über 45 Minuten verwendet.

7.2.7.5 LC-MS-Messung von intakten Proteinen

Die Parameter für diese LC-MS-Analysen orientieren sich an der technischen Anleitung „*Intact protein analysis combining micro-high performance liquid chromatography and LTQ Orbitrap mass spectrometry*“ von Dionex, Thermo Fisher Scientific.

Es wurde ein Programm verwendet, welches bisher für Proteine zwischen 12 und 60 kDa erfolgreich getestet wurde. Das Programm nutzte dauerhaft den Scanmodus FT, je nach Proteingewicht mit einer Auflösung zwischen 30.000 – 100.000 in einem Massenbereich von 600 – 2000 (m/z). Zur Beschleunigung der Laufzeit wurde die Analyse bei 40 °C und einem Fluss von 300 nl/min durchgeführt. Das Programm erstreckte sich über eine Zeit von 45 Minuten. Dabei stieg der Gradient in 10 Minuten zunächst von 5 % ACN auf 40 % an, dann erfolgte die Steigerung auf 80 % in 20 Minuten, gefolgt von 10 Minuten Waschen bei 90 % ACN, wonach das System wieder auf 5 % ACN zurückgeführt wurde. Die ersten Signale erreichten die Masse nach etwa 15 Minuten.

7.2.8 **Organische Synthese**

7.2.8.1 DNA-Schäden

Die verwendeten DNA Schäden wurden nach im AK Carell etablierten Synthesen hergestellt. Die CPD-Stränge wurden von Korbinian Heil und Veronika Reiter synthetisiert. Alle Stränge, die sperrige Addukte enthielten, wurden von Stephanie Schorr, Viviana Fluxa und Karola Gasteiger dargestellt. Für Cisplatin-Schäden wurde DNA von Stefan Schiesser mit Cisplatin-Reagenzien behandelt und gereinigt.

7.2.8.2 Polymerase-Inhibitoren

Alle verwendeten Polymerase-Inhibitoren und deren Derivate wurden von Michael Ehrlich hergestellt.

7.2.8.3 Suppressions-Komponenten

Bausteine und modifizierte Aminosäuren, die in kupferfreier und Kupfer-Click-Chemie erforderlich waren, wurden von Milan Vrabel dargestellt.



8 Abkürzungsverzeichnis

3- <i>O</i> -MEF	Methyl 2-(6-Ethyl-5-methoxy-4-oxo-4 <i>H</i> -pyran-3-ylcarbonyl)-3,5-dimethoxybenzoat
AAF	Acetylaminofluoren
AF	Aminofluoren
Ac	Acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
AGC	<i>automatic gain control</i>
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>
APPI	<i>atmospheric pressure photo ionisation</i>
AP	A-Purin-/ A-Pyrimidin-
APS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BER	Basenexzisionsreparatur (<i>base excision repair</i>)
BINAP	(1,1'-binaphthalene-2,2'-diyl)bis(diphenylphosphine)
BRCT	<i>breast cancer susceptibility protein C-terminal domain</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CI	Chemische Ionisation (<i>chemical ionisation</i>)
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CLG	β -Cholesterol-(6'- <i>O</i> -lineoyl)-glukosid
CPD	<i>cyclobutane dimer</i>
dA	2'-Desoxyadenosin
dATP	2'-Desoxyadenosintri-phosphat
dATP α S	2'-Desoxyadenosin 5'-(α -thio)tri-phosphat
dC	2'-Desoxycytidin
dCTP	2'-Desoxycytidintri-phosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtri-phosphat
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
dT	Thymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Thymidintri-phosphat
dU	2'-Desoxyuridin
ECL	Enzymatische Chemolumineszenz
EDTA	Ethylenediamin-tetra-Essigsäure
ERCC1	<i>excision repair cross-complementing protein 1</i>
ESI	Elektrospray Ionisation (<i>electrospray ionisation</i>)
ETD	<i>electron transfer dissociation</i>

FaPy	Formamidopyrimidin
FT	Fourier-Transformation
FT-ICR	<i>Fourier-transformation-ion cyclotron resonance</i>
GOI	Gen von Interesse (<i>gene of interest</i>)
HCD	<i>higher energy collision induced dissociation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	Halb-maximal-inhibierende Konzentration
ICAT	<i>isotope coded affinity tags</i>
IRMPD	<i>infrared multiphoton dissociation</i>
iTRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantification</i>
IT	<i>ion time</i> (Zeit des Ioneneinlasses in die Falle; vgl. AGC)
K _i	Inhibitor-Konstante
K _M	Michaelis-Konstante
LB	<i>Lysogenic broth</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MRFA	Tetrapeptid in pos. Kalibrationslösung (Met, Arg, Phe, Ala, Acetat)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
NER	Nukleotidexzissionsreparatur (<i>nucleotide excision repair</i>)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (magnetische Kernresonanz)
ODN	Oligodesoxynucleotid
PAD	<i>polymerase associated domain</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>protein data bank</i>
PEX	<i>primer extension</i>
PGG	penta- <i>O</i> -galloyl-β-D-glukose
Ph	Phenyl
POI	Protein von Interesse (<i>protein of interest</i>)
Pol	Polymerase
PP	Photoprodukt
PPi	Pyrophosphat
Pyl	Pyrolysin
Rapicon	Benzoessäure,3,5-dimethoxy-2-[(6-methyl-4-oxo-4H-pyran-3-yl)carbonyl]-,methylester
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>

SID	<i>in-source dissociation</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
SIM	<i>single ion monitoring</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLG	β -Sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-glucosid
ssDNA	Einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
Sumo	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T(6-4)T	6-4-TT Photoschaden
T(6-4)C	6-4-TC Photoschaden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline tween</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris-EDTA
TF	Trankriptionsfaktor
TIC	<i>total ion count</i> (Gesamtionenanzahl)
TLS	<i>trans lesion synthesis</i>
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamin
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i> , Proteinaktivität (1 nmol Substrat/h bei 37 °C)
UV	Ultraviolett
XP-V	<i>Xeroderma pigmentosum</i> Variante
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group D</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group G</i>



9 Literaturverzeichnis

- [1] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, New York, **2004**.
- [2] R. D. Wood, *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 135-167. *DNA repair in eukaryotes*.
- [3] A. Sancar, *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 43-81. *DNA excision repair*.
- [4] N. Diamant, A. Hendel, I. Vered, T. Carell, T. Reissner, N. de Wind, N. Geacinov, Z. Livneh, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 170-180. *DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity*.
- [5] A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn, *Annu Rev Biochem* **2004**, *73*, 39-85. *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*.
- [6] K. Heil, D. Pearson, T. Carell, *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 4271-4278. *Chemical investigation of light induced DNA bipyrimidine damage and repair*.
- [7] W. Yang, *Protein Sci* **2011**. *Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions*.
- [8] 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*.
- [9] 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*.
- [10] 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*.
- [11] F. Veglia, G. Matullo, P. Vineis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2003**, *12*, 157-160. *Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis*.
- [12] L. Wang, S. Broyde, *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, 785-795. *A new anti conformation for N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (AAF-dG) allows Watson-Crick pairing in the Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV (Dpo4)*.
- [13] S. Schorr, S. Schneider, K. Lammens, K. P. Hopfner, T. Carell, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 20720-20725. *Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase $\{\eta\}$ by bulky acetylaminofluorene DNA adducts*.
- [14] S. M. Sherrer, D. J. Taggart, L. R. Pack, C. K. Malik, A. K. Basu, Z. Suo, *Mutat Res* **2012**. *Quantitative analysis of the mutagenic potential of 1-aminopyrene-DNA adduct bypass catalyzed by Y-family DNA polymerases*.
- [15] E. Cadenas, *Annu Rev Biochem* **1989**, *58*, 79-110. *Biochemistry of oxygen toxicity*.
- [16] B. Demple, L. Harrison, *Annu Rev Biochem* **1994**, *63*, 915-948. *Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology*.
- [17] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chemistry* **2002**, *8*, 293-301. *Synthesis, stability, and conformation of the formamidopyrimidine G DNA lesion*.
- [18] M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2003**, *42*, 4947-4951. *The two main DNA lesions 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties*.
- [19] 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*.
- [20] M. Ober, H. Müller, 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*.

- [21] H. Miller, A. S. Fernandes, E. Zaika, M. M. McTigue, M. C. Torres, M. Wenthe, C. R. Iden, A. P. Grollman, *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 338-345. *Stereoselective excision of thymine glycol from oxidatively damaged DNA.*
- [22] G. E. Damsma, A. Alt, F. Brueckner, T. Carell, P. Cramer, *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14*, 1127-1133. *Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA.*
- [23] T. Carell, R. Epple, *Eur J Org Chem* **1998**, 1245-1248. *Repair of UV-light Induced DNA Lesions: A Comparative Study with Model Compounds.*
- [24] S. Schneider, S. Schorr, T. Carell, *Curr Opin Struct Biol* **2009**, *19*, 87-95. *Crystal structure analysis of DNA lesion repair and tolerance mechanisms.*
- [25] J. O. Fuss, P. K. Cooper, *PLoS biology* **2006**, *4*, e203. *DNA repair: dynamic defenders against cancer and aging.*
- [26] R. Dip, U. Camenisch, H. Naegeli, *DNA Repair (Amst)* **2004**, *3*, 1409-1423. *Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair.*
- [27] E. Compe, J. M. Egly, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 343-354. *TFIIH: when transcription met DNA repair.*
- [28] S. Bleich, B. K., B. D., *Was ist was: Der menschliche Körper, Vol. 50*, Tessloff Verlag, Nürnberg, **2005**.
- [29] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, Am. Soc. for Microbiology, Washington D.C., **1995**.
- [30] J. E. Sale, A. R. Lehmann, R. Woodgate, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 141-152. *Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage.*
- [31] L. S. Waters, G. C. Walker, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 8971-8976. *The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G(2)/M phase rather than S phase.*
- [32] J. N. Glover, R. S. Williams, M. S. Lee, *Trends in biochemical sciences* **2004**, *29*, 579-585. *Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two.*
- [33] P. Kannouche, B. C. Broughton, M. Volker, F. Hanaoka, L. H. Mullenders, A. R. Lehmann, *Genes Dev* **2001**, *15*, 158-172. *Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells.*
- [34] Q. Gueranger, A. Stary, S. Aoufouchi, A. Faili, A. Sarasin, C. A. Reynaud, J. C. Weill, *DNA Repair (Amst)* **2008**, *7*, 1551-1562. *Role of DNA polymerases eta, iota and zeta in UV resistance and UV-induced mutagenesis in a human cell line.*
- [35] S. Avkin, Z. Sevilya, L. Toubé, N. Geacintov, S. G. Chaney, M. Oren, Z. Livneh, *Mol Cell* **2006**, *22*, 407-413. *p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load.*
- [36] G. L. Moldovan, B. Pfander, S. Jentsch, *Cell* **2007**, *129*, 665-679. *PCNA, the maestro of the replication fork.*
- [37] C. Hoegge, B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis, S. Jentsch, *Nature* **2002**, *419*, 135-141. *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO.*
- [38] P. Stelter, H. D. Ulrich, *Nature* **2003**, *425*, 188-191. *Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation.*
- [39] A. A. Davies, D. Huttner, Y. Daigaku, S. Chen, H. D. Ulrich, *Mol Cell* **2008**, *29*, 625-636. *Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a.*
- [40] M. Bienko, C. M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A. R. Lehmann, K. Hofmann, I. Dikic, *Science* **2005**, *310*, 1821-1824. *Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis.*

- [41] B. S. Plosky, A. E. Vidal, A. R. Fernandez de Henestrosa, M. P. McLenigan, J. P. McDonald, S. Mead, R. Woodgate, *EMBO J* **2006**, *25*, 2847-2855. *Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin.*
- [42] M. G. Bomar, S. D'Souza, M. Bienko, I. Dikic, G. C. Walker, P. Zhou, *Mol Cell* **2010**, *37*, 408-417. *Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases iota and Rev1.*
- [43] M. Lopes, M. Foiani, J. M. Sogo, *Mol Cell* **2006**, *21*, 15-27. *Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions.*
- [44] Y. Daigaku, A. A. Davies, H. D. Ulrich, *Nature* **2010**, *465*, 951-955. *Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication.*
- [45] G. I. Karras, S. Jentsch, *Cell* **2010**, *141*, 255-267. *The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase.*
- [46] C. Guo, T. S. Tang, M. Bienko, J. L. Parker, A. B. Bielen, E. Sonoda, S. Takeda, H. D. Ulrich, I. Dikic, E. C. Friedberg, *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 8892-8900. *Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage.*
- [47] S. Sabbioneda, I. Bortolomai, M. Giannattasio, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, *DNA Repair (Amst)* **2007**, *6*, 121-127. *Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon MEC1.*
- [48] M. Bienko, C. M. Green, S. Sabbioneda, N. Crosetto, I. Matic, R. G. Hibbert, T. Begovic, A. Niimi, M. Mann, A. R. Lehmann, I. Dikic, *Mol Cell* **2010**, *37*, 396-407. *Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination.*
- [49] T. Gohler, S. Sabbioneda, C. M. Green, A. R. Lehmann, *J Cell Biol* **2011**, *192*, 219-227. *ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase eta is needed for efficient recovery from UV damage.*
- [50] Y. S. Jung, A. Hakem, R. Hakem, X. Chen, *Mol Cell Biol* **2011**. *Pirh2 E3 Ubiquitin Ligase Monoubiquitinates DNA Polymerase eta to Suppress Translesion DNA Synthesis.*
- [51] V. Pages, S. R. Santa Maria, L. Prakash, S. Prakash, *Genes Dev* **2009**, *23*, 1438-1449. *Role of DNA damage-induced replication checkpoint in promoting lesion bypass by translesion synthesis in yeast.*
- [52] Z. Livneh, O. Ziv, S. Shachar, *Cell Cycle* **2010**, *9*, 729-735. *Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis.*
- [53] S. Shachar, O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reissner, S. Chaney, E. C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, Z. Livneh, *EMBO J* **2009**, *28*, 383-393. *Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals.*
- [54] S. Prakash, R. E. Johnson, L. Prakash, *Annu Rev Biochem* **2005**, *74*, 317-353. *Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function.*
- [55] D. Gu, (ProQuest, UMI Dissertation Publishing), **2011**.
- [56] W. A. Beard, S. H. Wilson, *Structure* **2001**, *9*, 759-764. *DNA lesion bypass polymerases open up.*
- [57] T. Matsuda, K. Bebenek, C. Masutani, F. Hanaoka, T. A. Kunkel, *Nature* **2000**, *404*, 1011-1013. *Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase-eta.*

- [58] F. H. de Groote, J. G. Jansen, Y. Masuda, D. M. Shah, K. Kamiya, N. de Wind, G. Siegal, *DNA Repair (Amst)* **2011**, *10*, 915-925. *The Rev1 translesion synthesis polymerase has multiple distinct DNA binding modes.*
- [59] L. S. Waters, B. K. Minesinger, M. E. Wiltrout, S. D'Souza, R. V. Woodruff, G. C. Walker, *Microbiol Mol Biol Rev* **2009**, *73*, 134-154. *Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance.*
- [60] J. H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 18219-18224. *Highly error-free role of DNA polymerase eta in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells.*
- [61] R. Vasquez-Del Carpio, T. D. Silverstein, S. Lone, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *J Mol Biol* **2011**, *408*, 252-261. *Role of human DNA polymerase kappa in extension opposite from a cis-syn thymine dimer.*
- [62] O. Ziv, N. Geacintov, S. Nakajima, A. Yasui, Z. Livneh, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 11552-11557. *DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients.*
- [63] A. Tissier, E. G. Frank, J. P. McDonald, A. Vaisman, A. R. Fernandez de Henestrosa, F. Boudsocq, M. P. McLenigan, R. Woodgate, *Biochemical Society transactions* **2001**, *29*, 183-187. *Biochemical characterization of human DNA polymerase iota provides clues to its biological function.*
- [64] A. Vaisman, K. Takasawa, S. Iwai, R. Woodgate, *DNA Repair (Amst)* **2006**, *5*, 210-218. *DNA polymerase iota-dependent translesion replication of uracil containing cyclobutane pyrimidine dimers.*
- [65] D. H. Lee, G. P. Pfeifer, *Mutat Res* **2008**, *641*, 19-26. *Translesion synthesis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine by DNA polymerase eta in vivo.*
- [66] A. Irimia, R. L. Eoff, F. P. Guengerich, M. Egli, *J Biol Chem* **2009**, *284*, 22467-22480. *Structural and functional elucidation of the mechanism promoting error-prone synthesis by human DNA polymerase kappa opposite the 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine adduct.*
- [67] R. Kusumoto, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6090-6099. *Translesion synthesis by human DNA polymerase eta across thymine glycol lesions.*
- [68] J. H. Yoon, G. Bhatia, S. Prakash, L. Prakash, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 14116-14121. *Error-free replicative bypass of thymine glycol by the combined action of DNA polymerases kappa and zeta in human cells.*
- [69] O. Rechkoblit, Y. Zhang, D. Guo, Z. Wang, S. Amin, J. Krzeminsky, N. Louneva, N. E. Geacintov, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 30488-30494. *trans-Lesion synthesis past bulky benzo[a]pyrene diol epoxide N2-dG and N6-dA lesions catalyzed by DNA bypass polymerases.*
- [70] S. Schorr, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **2010**.
- [71] Y. Zhang, F. Yuan, X. Wu, M. Wang, O. Rechkoblit, J. S. Taylor, N. E. Geacintov, Z. Wang, *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 4138-4146. *Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase kappa in vitro.*
- [72] A. C. Klarer, L. J. Stallons, T. J. Burke, R. L. Skaggs, W. G. McGregor, *PLoS One* **2012**, *7*, e39596. *DNA polymerase eta participates in the mutagenic bypass of adducts induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells.*
- [73] S. Avkin, M. Goldsmith, S. Velasco-Miguel, N. Geacintov, E. C. Friedberg, Z. Livneh, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 53298-53305. *Quantitative analysis of translesion DNA synthesis across a benzo[a]pyrene-guanine adduct in mammalian cells: the role of DNA polymerase kappa.*

- [74] 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 eta.*
- [75] T. Reissner, S. Schneider, S. Schorr, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 3077-3080. *Crystal structure of a cisplatin-(1,3-GTG) cross-link within DNA polymerase eta.*
- [76] S. Sabbioneda, C. M. Green, M. Bienko, P. Kannouche, I. Dikic, A. R. Lehmann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, E20; author reply E21. *Ubiquitin-binding motif of human DNA polymerase eta is required for correct localization.*
- [77] U. Hübscher, S. Spadari, V. G., *DNA Polymerases: Discovery, Characterization and Functions in Cellular DNA Transactions*, World Scientific Pub Co (Auflage: 1 (15. April 2010), **2010**.
- [78] D. T. Nair, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *Nature* **2004**, *430*, 377-380. *Replication by human DNA polymerase-iota occurs by Hoogsteen base-pairing.*
- [79] M. T. Washington, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, *Mol Cell Biol* **2004**, *24*, 936-943. *Human DNA polymerase iota utilizes different nucleotide incorporation mechanisms dependent upon the template base.*
- [80] J. Wang, *Nature* **2005**, *437*, E6-7; discussion E7. *DNA polymerases: Hoogsteen base-pairing in DNA replication?*
- [81] K. N. Kirouac, H. Ling, *EMBO J* **2009**, *28*, 1644-1654. *Structural basis of error-prone replication and stalling at a thymine base by human DNA polymerase iota.*
- [82] K. N. Kirouac, H. Ling, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 3210-3215. *Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxo-guanine lesion by human DNA polymerase iota.*
- [83] L. V. Gening, *Biochemistry (Mosc)* **2011**, *76*, 61-68. *DNA polymerase iota of mammals as a participant in translesion synthesis of DNA.*
- [84] E. G. Frank, R. Woodgate, *J Biol Chem* **2007**, *282*, 24689-24696. *Increased catalytic activity and altered fidelity of human DNA polymerase iota in the presence of manganese.*
- [85] E. Ohashi, K. Bebenek, T. Matsuda, W. J. Feaver, V. L. Gerlach, E. C. Friedberg, H. Ohmori, T. A. Kunkel, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 39678-39684. *Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DINB1 gene.*
- [86] S. Lone, S. A. Townson, S. N. Uljon, R. E. Johnson, A. Brahma, D. T. Nair, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *Mol Cell* **2007**, *25*, 601-614. *Human DNA polymerase kappa encircles DNA: implications for mismatch extension and lesion bypass.*
- [87] R. L. Levine, H. Miller, A. Grollman, E. Ohashi, H. Ohmori, C. Masutani, F. Hanaoka, M. Moriya, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 18717-18721. *Translesion DNA synthesis catalyzed by human pol eta and pol kappa across 1,N6-ethenodeoxyadenosine.*
- [88] N. Suzuki, E. Ohashi, A. Kolbanovskiy, N. E. Geacintov, A. P. Grollman, H. Ohmori, S. Shibutani, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6100-6106. *Translesion synthesis by human DNA polymerase kappa on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-N(2)-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene).*
- [89] N. Suzuki, E. Ohashi, K. Hayashi, H. Ohmori, A. P. Grollman, S. Shibutani, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15176-15183. *Translesional synthesis past*

- acetylaminofluorene-derived DNA adducts catalyzed by human DNA polymerase kappa and Escherichia coli DNA polymerase IV.*
- [90] H. Ling, J. M. Sayer, B. S. Plosky, H. Yagi, F. Boudsocq, R. Woodgate, D. M. Jerina, W. Yang, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 2265-2269. *Crystal structure of a benzo[a]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase.*
- [91] L. Haracska, L. Prakash, S. Prakash, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 16000-16005. *Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis.*
- [92] P. Garg, C. M. Stith, J. Majka, P. M. Burgers, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 23446-23450. *Proliferating cell nuclear antigen promotes translesion synthesis by DNA polymerase zeta.*
- [93] L. Haracska, S. Prakash, L. Prakash, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 15546-15551. *Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase.*
- [94] C. Guo, P. L. Fischhaber, M. J. Luk-Paszyc, Y. Masuda, J. Zhou, K. Kamiya, C. Kisker, E. C. Friedberg, *EMBO J* **2003**, *22*, 6621-6630. *Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis.*
- [95] P. L. Andersen, F. Xu, W. Xiao, *Cell research* **2008**, *18*, 162-173. *Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA.*
- [96] C. Guo, E. Sonoda, T. S. Tang, J. L. Parker, A. B. Bielen, S. Takeda, H. D. Ulrich, E. C. Friedberg, *Mol Cell* **2006**, *23*, 265-271. *REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo.*
- [97] M. Morpurgo, E. A. Bayer, M. Wilchek, *J Biochem Biophys Methods* **1999**, 17-28. *N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins.*
- [98] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem Asian J* **2009**, *4*, 630-640. *Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology.*
- [99] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. J. Gatto, *Angew Chem Int Ed* **2005**, *44*, 7342-7372. *Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications.*
- [100] F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405-417. *Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions.*
- [101] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 459-476. *Chemistry for peptide and protein PEGylation.*
- [102] M. J. Hinner, K. Johnsson, *Current opinion in biotechnology* **2010**, *21*, 766-776. *How to obtain labeled proteins and what to do with them.*
- [103] J. P. Pellois, T. W. Muir, *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10*, 487-491. *Semisynthetic proteins in mechanistic studies: using chemistry to go where nature can't.*
- [104] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779. *Synthesis of proteins by native chemical ligation.*
- [105] V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nature methods* **2006**, *3*, 429-438. *Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins.*
- [106] F. H. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, *192*, 1227-1232. *General nature of the genetic code for proteins.*
- [107] M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1961**, *47*, 1588-1602. *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides.*
- [108] M. Nirenberg, P. Leder, M. Bernfield, R. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman, C. O'Neal, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1965**, *53*, 1161-1168. *RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code.*

- [109] D. Soll, E. Ohtsuka, D. S. Jones, R. Lohrmann, H. Hayatsu, S. Nishimura, H. G. Khorana, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1965**, *54*, 1378-1385. *Studies on polynucleotides, XLIX. Stimulation of the binding of aminoacyl-sRNA's to ribosomes by ribotrinnucleotides and a survey of codon assignments for 20 amino acids.*
- [110] F. H. Crick, *J Mol Biol* **1966**, *19*, 548-555. *Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis.*
- [111] D. Soll, D. S. Jones, E. Ohtsuka, R. D. Faulkner, R. Lohrmann, H. Hayatsu, H. G. Khorana, *J Mol Biol* **1966**, *19*, 556-573. *Specificity of sRNA for recognition of codons as studied by the ribosomal binding technique.*
- [112] F. H. Crick, *J Mol Biol* **1968**, *38*, 367-379. *The origin of the genetic code.*
- [113] D. Soll, U. L. RajBhandary, *J Biosci* **2006**, *31*, 459-463. *The genetic code - thawing the 'frozen accident'.*
- [114] I. Miranda, R. Silva, M. A. Santos, *Yeast* **2006**, *23*, 203-213. *Evolution of the genetic code in yeasts.*
- [115] D. W. Schultz, M. Yarus, *J Mol Biol* **1994**, *235*, 1377-1380. *Transfer RNA mutation and the malleability of the genetic code.*
- [116] S. Osawa, T. H. Jukes, *Journal of molecular evolution* **1989**, *28*, 271-278. *Codon reassignment (codon capture) in evolution.*
- [117] S. G. Andersson, C. G. Kurland, *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **1995**, *73*, 775-787. *Genomic evolution drives the evolution of the translation system.*
- [118] T. Suzuki, T. Ueda, K. Watanabe, *EMBO J* **1997**, *16*, 1122-1134. *The 'polysemous' codon--a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity.*
- [119] N. P. Lukashenko, *Genetika* **2010**, *46*, 1013-1032. *[Expanding genetic code: amino acids 21 and 22--selenocysteine and pyrrolysine].*
- [120] Y. Zhang, P. V. Baranov, J. F. Atkins, V. N. Gladyshev, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 20740-20751. *Pyrrolysine and selenocysteine use dissimilar decoding strategies.*
- [121] J. M. Kavran, S. Gundllapalli, P. O'Donoghue, M. Englert, D. Soll, T. A. Steitz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 11268-11273. *Structure of pyrrolysyl-tRNA synthetase, an archaeal enzyme for genetic code innovation.*
- [122] Y. Zhang, V. N. Gladyshev, *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, 4952-4963. *High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm *Olavius algarvensis*.*
- [123] L. Fowden, *Amino acids* **2001**, *20*, 217-224. *Plant amino acid research in retrospect: from Chinball to Singh.*
- [124] A. E. Johnson, W. R. Woodward, E. Herbert, J. R. Menninger, *Biochemistry* **1976**, *15*, 569-575. *Nepsilon-acetyllysine transfer ribonucleic acid: a biologically active analogue of aminoacyl transfer ribonucleic acids.*
- [125] T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel, *Annu Rev Biochem* **2004**, *73*, 147-176. *Incorporation of nonnatural amino acids into proteins.*
- [126] M. Ohuchi, H. Murakami, H. Suga, *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11*, 537-542. *The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus.*
- [127] Y. Goto, T. Katoh, H. Suga, *Nat Protoc* **2011**, *6*, 779-790. *Flexizymes for genetic code reprogramming.*
- [128] R. Giege, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 5017-5035. *Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity.*
- [129] T. S. Young, P. G. Schultz, *J Biol Chem* **2010**, *285*, 11039-11044. *Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon.*

- [130] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, 292, 498-500. *Expanding the genetic code of Escherichia coli.*
- [131] P. Fechter, J. Rudinger-Thirion, M. Tukalo, R. Giege, *European journal of biochemistry / FEBS* **2001**, 268, 761-767. *Major tyrosine identity determinants in Methanococcus jannaschii and Saccharomyces cerevisiae tRNA(Tyr) are conserved but expressed differently.*
- [132] L. Wang, T. J. Magliery, D. R. Liu, P. G. Schultz, *J Am Chem Soc* **2000**, 122, 5010-5011. *A New Functional Suppressor tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase Pair for the in Vivo Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins.*
- [133] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem Biol* **2001**, 8, 883-890. *A general approach for the generation of orthogonal tRNAs.*
- [134] L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2006**, 35, 225-249. *Expanding the genetic code.*
- [135] C. M. James, T. K. Ferguson, J. F. Leykam, J. A. Krzycki, *J Biol Chem* **2001**, 276, 34252-34258. *The amber codon in the gene encoding the monomethylamine methyltransferase isolated from Methanosarcina barkeri is translated as a sense codon.*
- [136] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, 296, 1462-1466. *A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase.*
- [137] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459-1462. *Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA.*
- [138] S. A. Burke, S. L. Lo, J. A. Krzycki, *Journal of bacteriology* **1998**, 180, 3432-3440. *Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine.*
- [139] L. Paul, D. J. Ferguson, Jr., J. A. Krzycki, *Journal of bacteriology* **2000**, 182, 2520-2529. *The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of Methanosarcina barkeri contain in-frame and read-through amber codons.*
- [140] M. Ibba, D. Soll, *Curr Biol* **2002**, 12, R464-466. *Genetic code: introducing pyrrolysine.*
- [141] C. Polycarpo, A. Ambrogelly, B. Ruan, D. Tumbula-Hansen, S. F. Ataide, R. Ishitani, S. Yokoyama, O. Nureki, M. Ibba, D. Soll, *Mol Cell* **2003**, 12, 287-294. *Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases.*
- [142] S. K. Blight, R. C. Larue, A. Mahapatra, D. G. Longstaff, E. Chang, G. Zhao, P. T. Kang, K. B. Green-Church, M. K. Chan, J. A. Krzycki, *Nature* **2004**, 431, 333-335. *Direct charging of tRNA(CUA) with pyrrolysine in vitro and in vivo.*
- [143] B. Hao, G. Zhao, P. T. Kang, J. A. Soares, T. K. Ferguson, J. Gallucci, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Chem Biol* **2004**, 11, 1317-1324. *Reactivity and chemical synthesis of L-pyrrolysine- the 22(nd) genetically encoded amino acid.*
- [144] D. G. Longstaff, R. C. Larue, J. E. Faust, A. Mahapatra, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, 1021-1026. *A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine.*
- [145] T. Fekner, M. K. Chan, *Curr Opin Chem Biol* **2011**, 15, 387-391. *The pyrrolysine translational machinery as a genetic-code expansion tool.*
- [146] C. R. Polycarpo, S. Herring, A. Berube, J. L. Wood, D. Soll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett* **2006**, 580, 6695-6700. *Pyrrolysine analogues as substrates for pyrrolysyl-tRNA synthetase.*

- [147] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, O. Nureki, S. Yokoyama, *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **2006**, 62, 1031-1033. *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the catalytic domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase from the methanogenic archaeon Methanosarcina mazei.*
- [148] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *J Mol Biol* **2008**, 378, 634-652. *Crystallographic studies on multiple conformational states of active-site loops in pyrrolysyl-tRNA synthetase.*
- [149] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem Biol* **2008**, 15, 1187-1197. *Multistep engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase to genetically encode N(epsilon)-(o-azidobenzyloxycarbonyl) lysine for site-specific protein modification.*
- [150] W. Wan, Y. Huang, Z. Wang, W. K. Russell, P. J. Pai, D. H. Russell, W. R. Liu, *Angew Chem Int Ed* **2010**, 49, 3211-3214. *A facile system for genetic incorporation of two different noncanonical amino acids into one protein in Escherichia coli.*
- [151] Y. Huang, W. K. Russell, W. Wan, P. J. Pai, D. H. Russell, W. Liu, *Mol Biosyst* **2010**, 6, 683-686. *A convenient method for genetic incorporation of multiple noncanonical amino acids into one protein in Escherichia coli.*
- [152] H. Neumann, K. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* **2010**, 464, 441-444. *Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome.*
- [153] T. Mukai, A. Hayashi, F. Iraha, A. Sato, K. Ohtake, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *Nucleic Acids Res* **2010**, 38, 8188-8195. *Codon reassignment in the Escherichia coli genetic code.*
- [154] T. Mukai, T. Yanagisawa, K. Ohtake, M. Wakamori, J. Adachi, N. Hino, A. Sato, T. Kobayashi, A. Hayashi, M. Shirouzu, T. Umehara, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, 411, 757-761. *Genetic-code evolution for protein synthesis with non-natural amino acids.*
- [155] A. Korostelev, J. Zhu, H. Asahara, H. F. Noller, *EMBO J* **2010**, 29, 2577-2585. *Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1.*
- [156] K. Ito, M. Uno, Y. Nakamura, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, 8165-8169. *Single amino acid substitution in prokaryote polypeptide release factor 2 permits it to terminate translation at all three stop codons.*
- [157] R. Huisgen, *Angewandte Chemie* **1963**, 75, 604-637. *1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick.*
- [158] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J Org Chem* **2002**, 67, 3057-3064. *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides.*
- [159] V. V. G. Rostovtsev, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., *Angew Chem Int Ed* **2002**, 41, 2596-2599. *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes.*
- [160] M. A. Gauthier, H. A. Klok, *Chem Commun (Camb)*. **2008**, 2591-2611. *Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts.*
- [161] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 1398-1399. *Directed DNA metallization.*
- [162] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Organic letters* **2006**, 8, 3639-3642. *Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA.*
- [163] G. H. Clever, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2007**, 46, 250-253. *Controlled stacking of 10 transition-metal ions inside a DNA duplex.*

- [164] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Chembiochem* **2007**, *8*, 1997-2002. *Transfer printing of DNA by "click" chemistry.*
- [165] P. M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 3442-3444. *Click-click-click: single to triple modification of DNA.*
- [166] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 17993-18001. *Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions.*
- [167] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem Biol* **2004**, *11*, 535-546. *Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods.*
- [168] F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5073-5080. *Viability study of HL60 cells in contact with commonly used microchip materials.*
- [169] C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 4900-4908. *Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition.*
- [170] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 16793-16797. *Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging.*
- [171] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 2686-2695. *Mechanistic investigation of the staudinger ligation.*
- [172] A. Padwa, S. Nahm, E. Sato, *J Org Chem* **1978**, *43*, 1664-1671. *Photochemical transformations of small ring heterocyclic compounds. 9. Intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition reactions of alkenyl-substituted nitrile imines.*
- [173] Y. Wang, C. I. Vera, Q. Lin, *Organic letters* **2007**, *9*, 4155-4158. *Convenient synthesis of highly functionalized pyrazolines via mild, photoactivated 1,3-dipolar cycloaddition.*
- [174] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 2832-2835. *A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins.*
- [175] T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 1633-1635. *A pyrrolysine analogue for protein click chemistry.*
- [176] X. Li, T. Fekner, M. K. Chan, *Chem Asian J* **2010**, *5*, 1765-1769. *N⁶-(2-(R)-propargylglycyl)lysine as a clickable pyrrolysine mimic.*
- [177] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 8720-8721. *Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry.*
- [178] J. W. Chin, *EMBO J* **2011**, *30*, 2312-2324. *Reprogramming the genetic code.*
- [179] T. Fekner, X. Li, M. K. Chan, *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 4171-4179. *Pyrrolysine Analogs for Translational Incorporation into Proteins.*
- [180] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50*, 3878-3881. *Genetically encoded copper-free click chemistry.*
- [181] X. Ning, R. P. Temming, J. Dommerholt, J. Guo, D. B. Ania, M. F. Debets, M. A. Wolfert, G. J. Boons, F. L. van Delft, *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 3065-3068. *Protein modification by strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition.*
- [182] E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51*, 4466-4469. *A genetically encoded norbornene amino acid for the mild and selective modification of proteins in a copper-free click reaction.*

- [183] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nature chemistry* **2012**, *4*, 298-304. *Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction.*
- [184] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymanski, R. Mueller, M. Wiessler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51*, 4166-4170. *Amino acids for Diels-Alder reactions in living cells.*
- [185] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13518-13519. *Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity.*
- [186] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate chemistry* **2008**, *19*, 2297-2299. *Tetrazine-based cycloadditions: application to pretargeted live cell imaging.*
- [187] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406. *Recent advances in the Staudinger reaction.*
- [188] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010. *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction.*
- [189] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Accounts of chemical research* **2011**, *44*, 666-676. *From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions.*
- [190] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. van Hest, *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50*, 8806-8827. *Staudinger ligation as a method for bioconjugation.*
- [191] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 9274-9275. *Regio- and chemoselective covalent immobilization of proteins through unnatural amino acids.*
- [192] S. J. Luchansky, S. Argade, B. K. Hayes, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12358-12366. *Metabolic functionalization of recombinant glycoproteins.*
- [193] J. G. Smith, *"The Diels-Alder Reaction."* *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, NY, **2011**.
- [194] J. T. Watson, O. D. Sparkman, *Introduction to mass spectrometry*, Wiley, Chichester (West Sussex, UK), **2007**.
- [195] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Analytical chemistry* **1985**, *57*, 675-679. *Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers.*
- [196] J. B. Fenn, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4*, 524-535. *Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time.*
- [197] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J Chem Phys* **1968**, *49*, 2240 - 2249. *Molecular Beams of Macroions*
- [198] B. H. Ham, *Even electron mass spectrometry with biomolecule applications*, Wiley-Interscience, Hoboken (NJ, USA), **2008**.
- [199] Y. P. Ho, P. C. Huang, K. H. Deng, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2003**, *17*, 114-121. *Metal ion complexes in the structural analysis of phospholipids by electrospray ionization tandem mass spectrometry.*
- [200] T. Kocher, G. Allmaier, M. Wilm, *Journal of mass spectrometry : JMS* **2003**, *38*, 131-137. *Nanoelectrospray-based detection and sequencing of substoichiometric amounts of phosphopeptides in complex mixtures.*
- [201] S. A. Lorenz, E. P. Maziarz, 3rd, T. D. Wood, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12*, 795-804. *Using solution phase hydrogen/deuterium (H/D) exchange to determine the origin of non-covalent complexes observed by electrospray ionization mass spectrometry: in solution or in vacuo?*

- [202] J. M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi, *Int J Mass Spectrom* **2002**, 216, 1-27. *Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry.*
- [203] M. S. Wilm, M. Mann, *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **1994**, 136, 167 - 180. *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?*
- [204] M. Wilm, M. Mann, *Analytical chemistry* **1996**, 68, 1-8. *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source.*
- [205] Y. Li, R. B. Cole, *Analytical chemistry* **2003**, 75, 5739-5746. *Shifts in peptide and protein charge state distributions with varying spray tip orifice diameter in nanoelectrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.*
- [206] A. El-Faramawy, K. W. Siu, B. A. Thomson, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16, 1702-1707. *Efficiency of nano-electrospray ionization.*
- [207] L. C. Short, S. S. Cai, J. A. Syage, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18, 589-599. *APPI-MS: effects of mobile phases and VUV lamps on the detection of PAH compounds.*
- [208] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, *Analytical chemistry* **2000**, 72, 3653-3659. *Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry.*
- [209] J. A. Syage, K. A. Hanold, T. C. Lynn, J. A. Horner, R. A. Thakur, *Journal of chromatography. A* **2004**, 1050, 137-149. *Atmospheric pressure photoionization. II. Dual source ionization.*
- [210] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int J M Spectrom Ion Processes* **1987**, 78, 53 - 68. *Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds.*
- [211] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **1988**, 2, 151 - 153. *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.*
- [212] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical chemistry* **1988**, 60, 2299-2301. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.*
- [213] F. Xiang, R. C. Beavis, *Org Mass Spectrom* **1993**, 28, 1424 - 1429. *Growing protein-doped sinapic acid crystals for laser desorption: An alternative preparation method for difficult samples.*
- [214] F. Xiang, R. C. Beavis, W. Ens, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **1994**, 8, 199 - 204. *A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films.*
- [215] D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. He, M. L. Gross, *Analytical chemistry* **2001**, 73, 3679-3686. *Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.*
- [216] B. M. Ham, J. T. Jacob, R. B. Cole, *Analytical chemistry* **2005**, 77, 4439-4447. *MALDI-TOF MS of phosphorylated lipids in biological fluids using immobilized metal affinity chromatography and a solid ionic crystal matrix.*
- [217] R. Lemaire, M. Wisztorski, A. Desmons, J. C. Tabet, R. Day, M. Salzet, I. Fournier, *Analytical chemistry* **2006**, 78, 7145-7153. *MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments.*
- [218] L. A. McDonnell, R. M. Heeren, *Mass spectrometry reviews* **2007**, 26, 606-643. *Imaging mass spectrometry.*
- [219] M. Mak, E. Francsics-Czinege, Z. Tuba, *Steroids* **2004**, 69, 831-840. *Steroid epimers studied by different mass spectrometric methods.*

- [220] F. Hillenkamp, E. Unsold, R. Kaufmann, R. Nitsche, *Appl Phys* **1975**, 341-348. *A High Sensitivity Laser Microprobe Mass Analyzer*.
- [221] R. B. Van Breemen, M. Snow, R. J. Cotter, *Int J Mass Spectrom Ion Phys* **1983**, 49, 35 - 50. *Time-resolved laser desorption mass spectrometry. I. Desorption of preformed ions*
- [222] M. Okamoto, K. Takahashi, T. Doi, Y. Takimoto, *Analytical chemistry* **1997**, 69, 2919-2926. *High-sensitivity detection and postsorce decay of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*.
- [223] E. Paul, *Angew Chem Int Ed* **1990**, 29, 739-748. *Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles (Nobel Lecture)*.
- [224] ThermoFisherScientific, **2008**. *LTQ Orbitrap Biotech Operations - Training course manual*.
- [225] J. C. Schwartz, M. W. Senko, J. E. Syka, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13, 659-669. *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*.
- [226] J. E. Syka, J. A. Marto, D. L. Bai, S. Horning, M. W. Senko, J. C. Schwartz, B. Ueberheide, B. Garcia, S. Busby, T. Muratore, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Journal of proteome research* **2004**, 3, 621-626. *Novel linear quadrupole ion trap/FT mass spectrometer: performance characterization and use in the comparative analysis of histone H3 post-translational modifications*.
- [227] A. Makarov, *Analytical chemistry* **2000**, 72, 1156-1162. *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*.
- [228] K. H. Kingdon, *Phys Rev* **1923**, 21, 408-418. *A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures*.
- [229] A. W. Hull, *Phys Rev* **1921**, 18, 31-57. *The effect of a uniform magnetic field on the motion of electrons between coaxial cylinders*.
- [230] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks, *Journal of mass spectrometry : JMS* **2005**, 40, 430-443. *The Orbitrap: a new mass spectrometer*.
- [231] H. H. Hsiao, H. Urlaub, *Proteomics* **2010**, 10, 3916-3921. *Pseudo-neutral-loss scan for selective detection of phosphopeptides and N-glycopeptides using liquid chromatography coupled with a hybrid linear ion-trap/orbitrap mass spectrometer*.
- [232] A. Irimia, R. L. Eoff, F. P. Guengerich, M. Egli, *J Biol Chem* **2009**, 284, supplementary information. *Structural and Functional Elucidation of the Mechanism Promoting Error-prone Synthesis by Human DNA Polymerase κ Opposite the 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine Adduct*.
- [233] R. Vasquez-Del Carpio, T. D. Silverstein, S. Lone, M. K. Swan, J. R. Choudhury, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *PLoS One* **2009**, 4, e5766. *Structure of human DNA polymerase kappa inserting dATP opposite an 8-OxoG DNA lesion*.
- [234] L. Lior-Hoffmann, L. Wang, S. Wang, N. E. Geacintov, S. Broyde, Y. Zhang, *Nucleic Acids Res* **2012**, 40, 9193-9205. *Preferred WMSA catalytic mechanism of the nucleotidyl transfer reaction in human DNA polymerase kappa elucidates error-free bypass of a bulky DNA lesion*.
- [235] R. Jain, D. T. Nair, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *Structure* **2009**, 17, 974-980. *Replication across template T/U by human DNA polymerase-iota*.
- [236] M. S. Bentle, E. A. Bey, Y. Dong, K. E. Reinicke, D. A. Boothman, *Journal of molecular histology* **2006**, 37, 203-218. *New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors*.

- [237] Y. Mizushina, H. Motoshima, Y. Yamaguchi, T. Takeuchi, K. Hirano, F. Sugawara, H. Yoshida, *Mar Drugs* **2009**, *7*, 624-639. *3-O-methylfunicone, a selective inhibitor of mammalian Y-family DNA polymerases from an Australian sea salt fungal strain.*
- [238] Y. Mizushina, J. Zhang, A. Pugliese, S. H. Kim, J. Lu, *Biochem Pharmacol* **2010**, *80*, 1125-1132. *Anti-cancer gallotannin penta-O-galloyl-beta-D-glucose is a nanomolar inhibitor of select mammalian DNA polymerases.*
- [239] S. Horie, C. Okuda, T. Yamashita, K. Watanabe, Y. Sato, Y. Yamaguchi, T. Takeuchi, F. Sugawara, H. Yoshida, Y. Mizushina, *Journal of oleo science* **2010**, *59*, 621-630. *beta-Sitosteryl (6'-O-linoleoyl)-glucoside of soybean (Glycine max L.) crude extract inhibits Y-family DNA polymerases.*
- [240] M. Münzel, *Synthesis of natural DNA modifications and their detection in DNA - Identification and total synthesis of a novel photolesion*, Culliver Verlag, Göttingen, **2011**.
- [241] T. H. Gehrke, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **2012**.
- [242] K. Yamanaka, D. Dorjsuren, R. L. Eoff, M. Egli, D. J. Maloney, A. Jadhav, A. Simeonov, R. S. Lloyd, *PLoS One* **2012**, *7*, e45032. *A Comprehensive Strategy to Discover Inhibitors of the Translesion Synthesis DNA Polymerase kappa.*
- [243] E. Kaya, K. Gutmiedl, M. Vrabel, M. Müller, P. Thumbs, T. Carell, *Chembiochem* **2009**, *10*, 2858-2861. *Synthesis of threefold glycosylated proteins using click chemistry and genetically encoded unnatural amino acids.*
- [244] K. Gutmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Organic letters* **2009**, *11*, 2405-2408. *Copper-free "click" modification of DNA via nitrile oxide-norbornene 1,3-dipolar cycloaddition.*
- [245] R. Huisgen, M. Seidel, G. Wallbillich, H. Knupfer, *Tetrahedron* **1962**, *17*, 3-29. *Diphenyl-nitrilimin und seine 1,3-dipolaren additionen an alkene und alkyne.*
- [246] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, J. Sanchis, *Mol Biosyst* **2009**, *5*, 115-122. *Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis.*
- [247] E. Kaya, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **2011**.
- [248] F. Yamao, H. Inokuchi, A. Cheung, H. Ozeki, D. Soll, *J Biol Chem* **1982**, *257*, 11639-11643. *Escherichia coli glutaminyl-tRNA synthetase. I. Isolation and DNA sequence of the glnS gene.*
- [249] A. Y. Cheung, D. Soll, *J Biol Chem* **1984**, *259*, 9953-9958. *In vivo and in vitro transcription of the Escherichia coli glutaminyl-tRNA synthetase gene.*
- [250] S. S. Lange, K. Takata, R. D. Wood, *Nature reviews. Cancer* **2011**, *11*, 96-110. *DNA polymerases and cancer.*
- [251] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chemische Berichte* **1967**, *100*, 60-70. *1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXV. Der Nachweis des freien Diphenylnitrilimins als Zwischenstufe bei Cycloadditionen.*
- [252] A. Padwa, S. Nahm, E. Sato, *J Org Chem* **1978**, *43*, 1664-1671. *Photochemical transformations of small ring heterocyclic compounds. 9. Intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition reactions of alkenyl-substituted nitrile imines.*
- [253] Z. Yu, L. Y. Ho, Z. Wang, Q. Lin, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21*, 5033-5036. *Discovery of new photoactivatable diaryltetrazoles for photoclick chemistry via 'scaffold hopping'.*
- [254] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. Lim, Q. Lin, *Organic letters* **2008**, *10*, 3725-3728. *Discovery of long-wavelength photoactivatable diaryltetrazoles for bioorthogonal 1,3-dipolar cycloaddition reactions.*
- [255] M. J. Schmidt, D. Summerer, *Chembiochem* **2012**, *13*, 1553-1557. *A need for speed: genetic encoding of rapid cycloaddition chemistries for protein labelling in living cells.*

- [256] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew Chem Int Ed* **2012**. *Genetically Encoded Cyclopropene Directs Rapid, Photoclick-Chemistry-Mediated Protein Labeling in Mammalian Cells.*
- [257] R. Hakem, P. Le Bouteiller, A. Jezo-Bremond, K. Harper, D. Campese, F. A. Lemonnier, *J Immunol* **1991**, *147*, 2384-2390. *Differential regulation of HLA-A3 and HLA-B7 MHC class I genes by IFN is due to two nucleotide differences in their IFN response sequences.*
- [258] K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 10317-10320. *Genetic Encoding of bicyclononynes and trans-cyclooctenes for site-specific protein labeling in vitro and in live mammalian cells via rapid fluorogenic Diels-Alder reactions.*
- [259] S. Virdee, P. B. Kapadnis, T. Elliott, K. Lang, J. Madrzak, D. P. Nguyen, L. Riechmann, J. W. Chin, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 10708-10711. *Traceless and site-specific ubiquitination of recombinant proteins.*
- [260] S. Eger, B. Castrec, U. Hubscher, M. Scheffner, M. Rubini, A. Marx, *Chembiochem* **2011**. *Generation of a Mono-ubiquitinated PCNA Mimic by Click Chemistry.*
- [261] W. Ou, T. Uno, H. P. Chiu, J. Grunewald, S. E. Cellitti, T. Crossgrove, X. Hao, Q. Fan, L. L. Quinn, P. Patterson, L. Okach, D. H. Jones, S. A. Lesley, A. Brock, B. H. Geierstanger, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 10437-10442. *Site-specific protein modifications through pyrroline-carboxy-lysine residues.*
- [262] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 6974-6998. *Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality.*
- [263] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 4686-4687. *Activity-based protein profiling in vivo using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition.*
- [264] D. C. Kennedy, R. K. Lyn, J. P. Pezacki, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 2444-2445. *Cellular lipid metabolism is influenced by the coordination environment of copper.*
- [265] R. K. Lim, Q. Lin, *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46*, 1589-1600. *Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions.*
- [266] S. Eger, M. Scheffner, A. Marx, M. Rubini, *Methods Mol Biol* **2012**, *832*, 589-596. *Formation of ubiquitin dimers via azide-alkyne click reaction.*
- [267] B. M. Hutchins, S. A. Kazane, K. Staflin, J. S. Forsyth, B. Felding-Habermann, V. V. Smider, P. G. Schultz, *Chem Biol* **2011**, *18*, 299-303. *Selective formation of covalent protein heterodimers with an unnatural amino acid.*
- [268] P. R. Chen, D. Groff, J. Guo, W. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 4052-4055. *A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells.*
- [269] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2002**, *1*, 376-386. *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.*
- [270] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nature biotechnology* **1999**, *17*, 994-999. *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.*
- [271] F. W. Studier, *Protein Expr Purif* **2005**, *41*, 207-234. *Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.*

