

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

**Reparatur und Replikation
des Sporen Photoproduktes sowie ortsspezifische
Generierung eines CPD- bzw. Sporen Photoproduktes in
DNA**

Jan Carsten Pieck

aus

Siegen

2007

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10.02.2007



(Jan Carsten Pieck)

Dissertation eingereicht am 13.02.2007

1. Gutachter Prof. Thomas Carell
 2. Gutachter Prof. Ralf-Peter Jansen
- Mündliche Prüfung am 30.03.2007

*Fahre nicht aus der Haut,
wenn du kein Rückgrat hast.*

Stanislaw Jerzy Lec (1909-1966)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom August 2003 bis Januar 2007 unter der Anleitung von Herrn *Prof. Dr. T. Carell* am Institut für Organische Chemie der Ludwig-Maximilans-Universität München.

Meinem Doktorvater, *Prof. Dr. Thomas Carell* danke ich ganz herzlich für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ein besonderer Dank gebührt auch seinem Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten und den mir stets gewährten Freiraum bei meiner experimentellen Tätigkeit, der es mir ermöglichte, den Verlauf und Inhalt dieser Arbeit weitgehend selbst zu bestimmen.

Herrn *Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen* danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Meinen Freunden und Kollegen im Arbeitskreis danke ich für die harmonische und erfolgreiche Zusammenarbeit und für das hervorragende Arbeitsklima in der Biochemie, welches es mir ermöglichte, auch nach „wissenschaftlichen Rückschlägen“ meine Arbeit mit Freude fortzusetzen. Insbesondere möchte ich mich bei *Dr. Marcus Friedel, Dr. Marcus Müller, Ulrich Hennecke, Ralf Strasser und Dr. David Hammond* für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Den Mitarbeitern *Claudia Gräf, Frau Voss, Dr. Werner Spahl, Helmut Hartl und Frau Gärtner* der LMU München sowie *Ina Pinnschmidt, Dr. Antonio Pierik und Dr. Thorsten Selmer* der Philipps-Universität Marburg danke ich für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und wissenschaftlichen Belangen.

Für die Kristallisationsversuche danke ich *Anna Scherer* und *Thomas Barends* vom MPI für medizinische Forschung in Heidelberg (AK *Prof. Dr. Schlichting*).

Meinen Diplomanden und Bachelor Studenten *Tessa Pascke, Steffen Gaali und Deborah-Ann Schuster* danke ich für ihre selbständige und engagierte Arbeitsweise, die zum raschen Fortschritt der experimentellen Arbeit beigetragen hat.

Mein größter Dank gilt *Sandra Bianca Müller* und meiner Familie, für ihre moralische Unterstützung und den stetigen Rückhalt in allen Lebenslagen, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder wurden auf Kongressen präsentiert:

Konferenzbeiträge:

1. Poster Präsentation: E. Bürckstümmer, M.G. Friedel, J.C. Pieck, T. Carell, *Response to DNA damage: Insight from chemical, biochemical, structural biology and cellular studies. Royal Society of Chemistry*, University of Sussex, Great Britain, 19-21. September **2005**. Synthesis and repair of the Spore Photoproduct.
2. Vortrag: J. C. Pieck, *Kolloquium Org. Chemie*, München, Germany, 4 Juli **2005**. Enzymatische Reparatur von UV induzierten DNA Schäden.
3. Poster Präsentation: J.C. Pieck, E. Bürckstümmer, U. Hennecke, M. Friedel, T. Carell, *Gordon Research Conference 2006: DNA Damage, Mutation and Cancer*, Ventura, USA, 5-10. März **2006**. Direct repair of the Spore Photoproduct and the (6-4) Photolesion.
4. Poster Präsentation: J.C. Pieck, E. Bürckstümmer, T. Carell, *9th Biennial Meeting of the German Society for Research on DNA Repair*, Hamburg, Germany, 12-15 September **2006**, Repair, mutagenic properties and generation of the spore photoproduct.
5. Poster Präsentation: J.C. Pieck, E. Bürckstümmer, T. Carell, *Münchner Industrietag 2006*, München, Germany, 5 Oktober **2006**, Repair, mutagenic properties and generation of the spore photoproduct.

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

6. 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 Formamido-pyrimidine-dG DNA Lesion
7. M. G. Friedel, O. Berteau, J.C. Pieck, M. Atta, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Fontecave, T. Carell, *Chem. Comm.*, **2006**, 4, (445-447). The spore photoproduct lyase repairs the 5S- and not the 5R- configured spore photoproduct DNA lesion
8. J.C. Pieck, D. Kuch, C.H. Haas, F. Grolle, T. Carell, *J. Am Chem. Soc.*, **2006**, (5), 128, (1404 – 1405). PNA-Based Reagents for the Direct and Site-Specific Synthesis of Thymine Dimer Lesions in Genomic DNA

-
9. M.G. Friedel, J.C. Pieck, J. Klages, C. Dauth, H. Kessler, T. Carell, *Chem. Eur. J.*, **2006**; (12), 23, (6081-6094). Synthesis and Stereochemical Assignment of DNA Spore Photoproduct Analogs.
 10. J.C. Pieck, M.G. Friedel, T. Carell, *J. Biol. Chem.*, **2006**; 281, (36317-36326). Characterization of a New Thermophilic Spore Photoproduct Lyase from *Geobacillus stearothermophilus* (SplG) with Defined Nucleotide and Lesion containing ssDNA Substrates.
 11. A. Alt, K. Lammens, J.C. Pieck, A. Lammens, C. Chiocchini, K.-P. Hopfner, T. Carell, *Science*, **2007** submitted. Structural mechanism of replicative bypass of a cisplatin DNA adduct by yeast DNA polymerase η .

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
I. ZUSAMMENFASSUNG	VI
II. SUMMARY	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1 UV Licht induzierte DNA Schäden	1
1.1.1 Cyclobutan Pyrimidin Dimer (CPD)	3
1.1.2 (6-4) Photoprodukt	6
1.1.3 Dewar Photoprodukt	7
1.1.4. Sporen Photoprodukt	8
1.1.4.1 Sporen- Morphologie und Aufbau	9
1.1.4.2 DNA im Sporenkern	12
1.1.4.3 Sporen- Resistenz	16
1.2 Prokaryotische Reparatur von Photodimeren	21
1.2.1 Direkte Reparatur	21
1.2.1.1 CPD Photolyase	21
1.2.1.2 (6-4)-Photolyase	21
1.2.1.3 DASH-Cryptochrom	22
1.2.1.4 Sporenphotoproduktlyase	22
1.2.2 Nukleotidexcisionsreparatur (NER)	25
1.2.3 UVDE	27
1.2.4 Basenexcisionsreparatur (BER)	28
1.2.4.1 Pyrimidin Dimer Glykosylase	28
1.2.5 Fehlpaarungsreparatur (MMR)	30
1.2.6 Homologe Rekombination	31
1.4 Selektive Schadensgenerierung in DNA	32

1.4.1 PNA	33
1.4.2 Biologische Relevanz von PNA	34
1.4.3 Tripletphotosensibilisatoren	34
2. AUFGABENSTELLUNG	36
3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 Materialien	37
3.1.1 Allgemeine Materialien	37
3.1.2 Geräte	37
3.1.3 Spezielle Systeme	38
3.1.4 Enzyme	39
3.1.5 Häufig verwendete Puffer und Medien	39
3.1.6 Bakterien- und Hefestämme	41
3.1.7 Plasmide ohne Insert	42
3.1.8 DNA- und Proteinstandards	43
3.1.9 Datenbanken und Computerprogramme	44
3.2 Mikrobiologische Methoden	45
3.2.1 Bakterien- und Hefekulturen	45
3.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	45
3.2.2.2 Transformation von elektrokompetenten Bakterien	45
3.2.2.3 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien	46
3.2.3 Induktion zur Proteinexpression	46
3.2.4 Bakterien-Aufschluss	47
3.2.4.1 Lysozym-Aufschluss	47
3.2.4.2 Durchflußhomogenisator-Aufschluss	47
3.2.4.3 French Press-Aufschluss	47
3.3 Molekularbiologische Methoden	48
3.3.1 DNA-Isolierung	48
3.3.1.1 Mini-Plasmid-Präparation	48
3.3.1.2 Isolierung von genomischer DNA	49

3.3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	50
3.3.2 DNA-Reinigung	50
3.3.2.1 QIAquick PCR Purifikation Kit	50
3.3.2.2 Phenol- Extraktion.....	51
3.3.2.3 Ethanol und Isopropanolfällung von langen DNA Fragmenten.....	51
3.3.2.4 Ethanolfällung von Oligonukleotiden	52
3.3.3 Agarosegelelektrophorese	52
3.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	54
3.3.6 Restriktion von DNA	54
3.3.7 Klenow-Fill-In Reaktion	55
3.3.8 Dephosphorylierung von DNA	55
3.3.9 Ligation von Plasmid DNA.....	56
3.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	56
3.3.10.1 Bakterien-PCR	57
3.3.11 Ortsspezifische Mutagenese.....	58
3.3.11 Gateway Technologie.....	59
3.3.11.1 BP-Reaktion	60
3.3.11.2 LR-Reaktion	61
3.3.12.3 Herstellung von neuen Destinations Plasmiden	62
3.3.13 TOPO-Technologie	63
3.3.14 M13-Phagenmethoden	64
3.3.14.1 M13-Phagenamplifikation in <i>E. coli</i>	64
3.3.14.2 Bestimmung des Phagentiters/ Gesamtphagenzahl.....	64
3.3.14.3 M13-ssDNA Isolierung	65
3.4 Proteinchemische Methoden.....	66
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
3.4.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose Membranen	68
3.4.3.1 Western-Blot-Analyse nach Khyse-Anderson (1984).....	68
3.4.3.2 Dot-Immunoassay	69
3.4.4 Immunchemische Färbung für Proteine auf Nitrocellulose- Membranen.....	69
3.4.5 Proteinquantifizierung	71
3.4.7 Proteinreinigung	72
3.4.7.1 His ₆ -Affinitätschromatographie	72

3.4.7.1 Strep-tagII-Affinitätschromatographie	73
3.4.7.2 Hitzefällung von <i>E. coli</i> Proteinen	74
3.4.7.3 Gelpermeationschromatographie	74
3.4.8 Rekonstitution der Sporenphotoproduktlyase	75
3.4.9 Reparaturassay mit Sporenphotoproduktlyase	76
3.5 Chemische Synthese	77
3.5.1 Synthese von AzaSAM	77
3.5.1 Photochemische Herstellung des Sporen Photoschadens.....	83
3.5.2 Nachweis des Sporenphotoproduktes.....	83
3.6 Analytische Methoden.....	84
3.6.1 Maldi-MS	84
3.6.2 HPL-Chromatographie	86
3.6.3 HPLC-MS/MS.....	86
3.6.4 UV/VIS-Spektroskopie	86
3.6.5 EPR-Spektroskopie	87
3.6.6 Quantitative Fe und S Bestimmung	87
3.6.7 Dünnschichtchromatographie.....	88
3.7 Biochemische Methoden	88
3.7.1 Inkorporationskinetik gegenüber des synthetischen Sporenphotoschadens.....	88
3.7.2 <i>In vivo</i> Replikationsassay	91
3.7.3 Isolierung und Detektion eines CPD Schadens in kurzen DNA Doppelsträngen.....	92
3.7.4 Isolierung und Detektion eines CPD Schadens im M13-Phagengenom	93
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	95
4.1 Charakterisierung der Sporenphotoproduktlyase.....	95
4.1.1 Sequenzanalysen zur Sporenphotoproduktlyase	95
4.1.2 Expression und Reinigung von SplG aus <i>G. stearothermophilus</i>	102
4.1.3 Homodimeruntersuchungen zur SplG	106
4.1.4 Rekonstitution des [4Fe-4S] Clusters in der Sporenphotoproduktlyase	110
4.1.5 Spektroskopische Eigenschaften der Sporenphotoproduktlyase.....	112

4.1.6 Kristallisationsversuche mit apo-SplG Homodimer	115
4.1.6 Zusammenfassung und Ausblick	116
4.2 Reparatur des Sporenphotoproduktes	117
4.2.1 Photochemische Herstellung und Reinigung des Sporenphotoproduktes in DNA ...	117
4.2.2 Synthese von AzaSAM	123
4.2.3 Reparatur des synthetischen 5S- und 5R- Sporenphotoproduktes durch SplG	127
4.2.4 Reparatur des natürlichen Sporenphotoproduktes in DNA durch SplG	131
4.2.5 AzaSAM Inhibierung der SP Reparatur durch SplG	133
4.2.6 Zusammenfassung und Ausblick	134
4.3 Mutagene Eigenschaften des Sporenphotoproduktes	136
4.3.1 Theoretischer Hintergrund	136
4.3.2 Expression und Reinigung der DinB Polymerase aus <i>G. stearothermophilus</i>	142
4.3.3 Expression und Reinigung von Pol η aus <i>S. cerevisiae</i>	144
4.3.4 Inkorporation gegenüber des synthetischen Sporenphotoschadens	146
4.3.5 <i>In vivo</i> Replikation des Sporenphotoproduktes.....	150
4.3.6 Zusammenfassung und Ausblick	153
4.4 Ortsspezifische Generierung eines CPD Schadens.....	154
4.4.1 Einleitung zum Verfahren	154
4.4.2 Generierung eines CPD Schadens in langen Oligonukleotiden.....	155
4.4.3 Generierung eines CPD Schadens im M13-Genom	158
4.4.2 Zusammenfassung und Ausblick	160
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	161
6. LITERATURVERZEICHNIS	164
7. ANHANG	183

I. Zusammenfassung

Die Erhaltung von genomischen Informationen ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben eines jeden Organismus und damit für den Fortbestand der jeweiligen Art. Die DNA wird jedoch ständig durch exogene und endogene Prozesse geschädigt. Mit diesen Schädigungen sind Prozesse der Mutagenese und Apoptose verbunden. Das Verständnis der DNA-Schädigung, Schadenserkennung, Schadensreparatur und deren fehlerfreie Replikation ist daher von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu dem UV-induzierten Sporenphotoprodukt und dem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer durchgeführt.

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines DNA Einzelstranges, welcher an einer definierten Stelle das Sporenphotoprodukt enthält. Dieser durch UV-Licht in Anwesenheit von Pyridin-2,6-dicarbonsäure induzierbare Photoschaden wurde bisher ausschließlich in den Sporen der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* nachgewiesen, wohingegen die „klassischen“ UV induzierten DNA Schäden wie das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer und der (6-4)-Photoschaden in den Sporen dieser Gattungen fast nicht vorkommen. Die Limitierung auf die Bildung von nur einem Licht induzierbaren DNA Schaden trägt damit entscheidend zur hohen UV-Licht Unempfindlichkeit dieser ruhenden Lebensform bei. Zusätzlich gibt es ein Reparaturenzym, welches hochspezialisiert diesen Sporenphotoschaden, zum Zeitpunkt der Germination, effektiv repariert, die Sporenphotoproduktlyase.

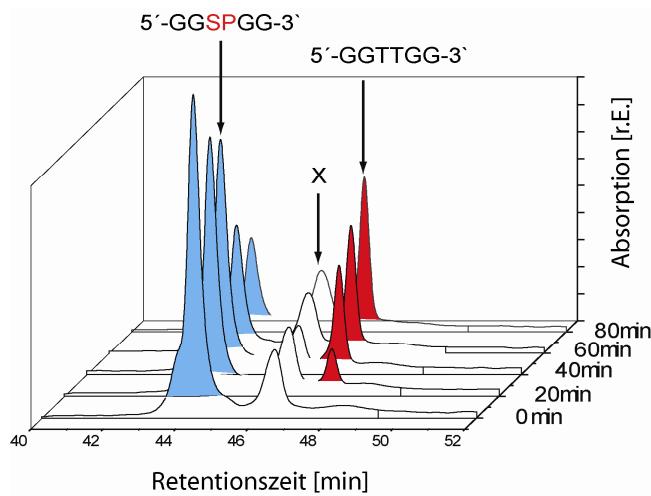


Abbildung I-1: HPL-Chromatogramm zur zeitabhängigen Reparatur des Sporenphotoproduktes in DNA durch die Sporenphotoproduktlyase aus *Geobacillus stearothermophilus* (SplG); X= Pufferpeak; SP= Sporenphotoprodukt.

In dieser Arbeit wurde die erste thermophile Sporenphotoproduktlyase aus *Geobacillus stearothermophilus* (SplG) in *E. coli* überexprimiert, gereinigt und rekonstituiert. Die durch Belichtungsexperimente hergestellten Sporenphotoprodukte in DNA wurden in einem

Reparaturassay von der thermophilen SplG effektiv repariert, und es konnte eine katalytische Aktivität von 2,6 μmol Sporenphotoprodukt Reparatur pro min und mg SplG bestimmt werden (Abbildung I-I). Die isolierte SplG enthält einen extrem O_2 labilen [4Fe-4S] Cluster und gehört zur *Radical SAM dependent Superfamily*. Diese Enzymfamilie benutzt S-Adenosylmethionin, zur Bildung des Adenosylradikals, als Kofaktor. In dieser Arbeit wurde ein Analog dieses Kofaktors synthetisiert und der Einfluss auf die Enzymaktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das synthetisierte aza-Adenosylmethionin zur vollkommenen Inhibierung der Enzymaktivität führt, was den postulierten Reparaturmechanismus bestätigt. Des Weiteren führten erste Kristallisationsexperimente zu Kristallen, die eine Auflösung von bis zu 7,5 Å ergaben. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die *in vitro* und *in vivo* Replikation des natürlichen und synthetischen Sporenphotoproduktes untersucht. Für die *in vitro* Replikationsassays wurden eine Polymerase mit hoher Genauigkeit der A Familie und zwei Polymerasen mit geringer Genauigkeit der Y Familie überexprimiert. Dabei zeigte sich, dass die *Bst*Pol1 (Familie A) aus *G. stearothermophilus* nicht über den Sporenphotoschaden replizieren kann, d.h die Polymerase stoppte. Das gleiche wurde bei der, bisher unbekannten Polymerase DinB aus *G. stearothermophilus*, beobachtet. Diese Polymerase ist ein prokaryotisches Analog der eukaryotischen Polymerase κ aus der Familie Y. Die einzige, in dieser Arbeit verwendete Polymerase, die eine fehlerfreie Replikation über den Sporenphotoschaden durchführt, ist die Polymerase η aus *S. cerevisiae*. Von dieser Polymerase ist bekannt, dass sie auch über die anderen UV induzierten Schäden, CPD und (6-4)-Photoschaden, fehlerfrei repliziert. Diese Ergebnisse wurden in einem neu entwickelten *in vivo* Replikationsassay, basierend auf dem *TOPO-Cloning* Systems, verifiziert.

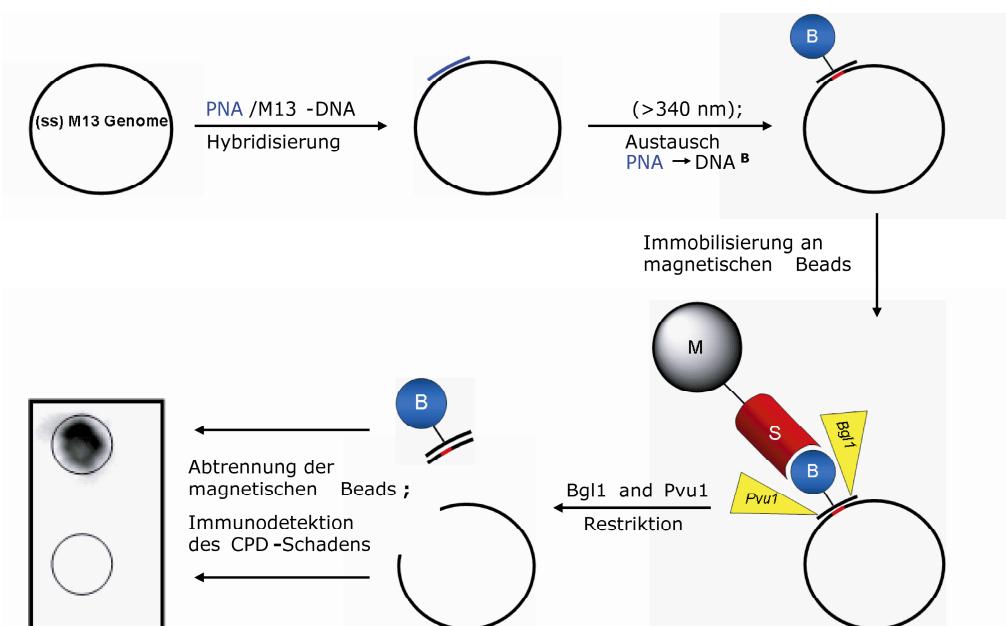


Abbildung I-2: Prinzip der orstspezifischen CPD Generierung und Detektion im M13 Phagengenom.

Die Sporenphotoproduct enthaltende DNA wurde via *TOPO-Cloning* in einen Vektor kloniert und in einen Nukleotid-Excisions-Reparatur defizienten *E. coli* Stamm transformiert. Die Plasmide wurden sequenziert und auch hier zeigte sich kein Fehlbaseneinbau gegenüber dem Sporenphotoproduct.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die ortsspezifische Generierung eines CPD Schadens in DNA untersucht. Um im nativen Zustand der Zelle einen definierten Schaden studieren zu können, bedarf es geeigneter Reagenzien, die diese selektiv und sequenzspezifisch *in vitro* und *in vivo* generieren. In vorausgegangenen Studien konnte ein neuartiges System entwickelt werden, welches durch Verwendung eines an PNA (*peptide nucleic acid*) gebundenen Acetophenon-Tripletsensibilisators erfolgreich zur selektiven Erzeugung von *cis-syn* CPD-Schäden befähigt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses System erweitert werden und damit eine Generierung von *cis-syn* CPD-Schäden in langen DNA Fragmenten etabliert werden. In langen Oligonucleotiden, die an zwei Stellen benachbarte Thymidine besitzen, konnte nach Belichtung ($\lambda = 340$ nm) selektiv und sequenzspezifisch in hohen Ausbeuten ein *cis-syn* CPD-Schaden erzeugt werden. Es war sogar möglich mit diesen innovativen Sonden einen einzigen CPD Schaden ortsspezifisch im Genom des Bakteriophagen M13 zu erzeugen und nachzuweisen (Abbildung I-II). Der Nachweis des CPD Schadens erfolgte mit Hilfe von magnetischen *Beads* und Antikörpern gegen das CPD Epitop. Diese innovative Technologie erlaubt es also an beliebiger Stelle im Genom, den für enzymatische Studien und Signalkaskaden so wichtigen CPD Schaden zu generieren.

II. Summary

Since DNA is continuously damaged by many exogenous and endogenous processes, the conservation of genomic information is an essential precondition for the survival of each organism and therefore for the continuance of the whole species. Damaged DNA leads to biological processes such as mutagenesis and apoptosis. Deeper knowledge about DNA lesions, DNA lesion recognition and lesion repair or error-free DNA replication is essential to understand and to prevent these processes.

This thesis describes investigations of the UV-light inducible spore photoproduct (SP) and the cyclobutane-pyrimidine-dimer (CPD). In the first part of this work the preparation and purification of a single stranded DNA containing a site-specific defined spore photoproduct is described. This DNA lesion is inducible upon UV-light irradiation of DNA in the presence of pyridinedicarboxylic acid. This SP lesion is the only detectable UV light inducible DNA lesion in the spores of *Bacillus* and *Clostridium* species. The “classical” UV light inducible lesions such as CPD and the (6-4) photoproduct exist only in minor amounts in spores of these species. The limitation to only one UV light lesion is one of the major reasons for the UV resistance of spores, since only one enzyme is necessary for the lesion repair. This repair enzyme is called spore photoproduct lyase.

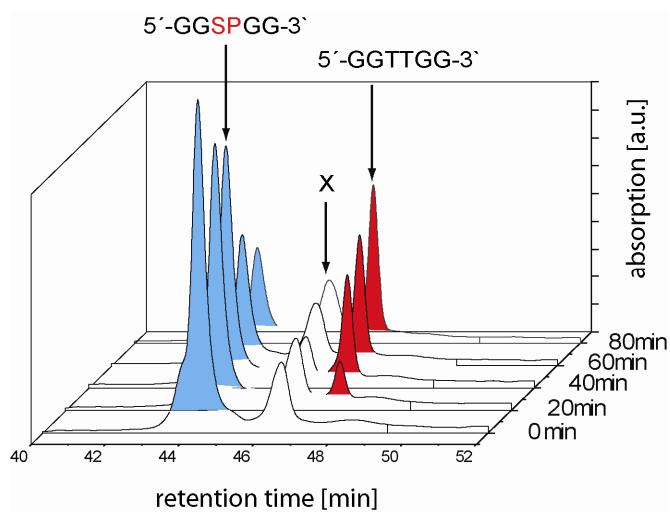


Figure II-1: *rp*-HPL chromatogram for the time dependent repair of the spore photoproduct in DNA by the repair enzyme spore photoproduct lyase of *G. stearothermophilus* (SplG); X= buffer peaks, SP= spore-photoproduct.

For enzymatic repair studies of the spore photoproduct, the first thermophilic spore-photoproduct lyase of *G. stearothermophilus* (SplG) was cloned, over-expressed, purified and successfully reconstituted. The single stranded DNA containing a spore photoproduct lesion is efficiently repaired by the spore photoproduct lyase. The catalytic activity is 2,6 μ mol spore

photoproduct repaired per minute and mg SplG, which results in a calculated *turnover* of ~100 (Figure II-1). The SplG protein contains a very oxygen-sensitive [4Fe-4S] iron-sulfur-cluster which rapidly degrades to an inactive [2Fe-2S] cluster. The enzyme belongs to a novel class of enzymes known as the *radical SAM dependent superfamily*. This enzyme class uses S-adenosylmethionine, for the formation of a 5'-adenosyl radical, as a cofactor. A SAM analog was synthesized and used for enzyme assays together with SplG to confirm the proposed repair mechanism. The synthesized Aza-SAM shows full inhibition of the enzyme activity, which gives strong support to the proposed mechanism. Initial crystallisation experiments with SplG resulted in the formation of crystals with a resolution of 7,5 Å.

In the second part of this work, the *in vivo* and *in vitro* replication of the spore photoproduct was investigated. For the *in vitro* assays one high fidelity polymerase of the family A, BstPol1, and two members of the low fidelity family Y, DinB and pol η, were used. The low fidelity polymerases DinB of *G. stearothermophilus*, which is a prokaryotic homolog of the eukaryotic pol κ, and the high fidelity polymerase BstPol1 are not able to perform translesion synthesis (=TLS) across the spore photoproduct. The only polymerase capable of TLS was the low fidelity polymerases pol η. Pol η incorporates two dATP opposite the SP lesion which represents in an error free replication of the sp lesion. It is known that pol η replicates also through other UV-light induced lesions, like CPD and (6-4) photoproduct as well. These *in vitro* results were confirmed by a newly established *in vivo* assay. The assay is based on the TOPO-Cloning System, which allows rapid and easy integration of small DNA oligonucleotides containing a defined lesion into a plasmid.

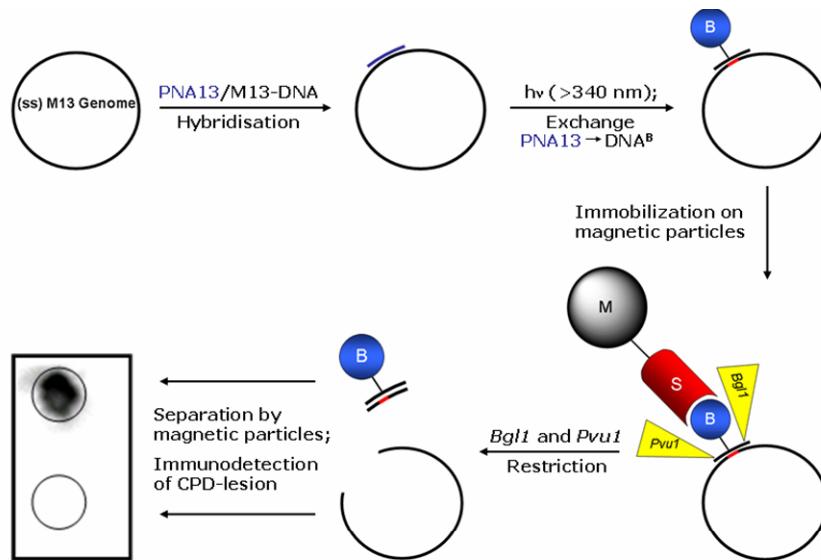


Figure II-2: System for site directed generation of one CPD lesion in the genome of bacteriophage M13.

A DNA oligonucleotide containing the spore photoproduct was integrated into a plasmid and subsequently transformed into a photolyase (*phr*⁻), nucleotide-excision-repair (*uvrA*⁻) and homolog recombination (*recA*⁻) deficient *E. coli* strain.

The growing colonies were counted and the plasmids were sequenced, confirming the results from the *in vitro* assay. Two dATPs were incorporated opposite the SP lesion.

In the third part of this work, the possibility of a site-specific generation of one defined CPD lesion in genomic DNA was investigated. For the study of *in vivo* DNA lesions it is necessary to develop probes which can generate a site-specific CPD lesion. PNA (*peptide nucleic acid*) with an acetophenone building block can achieve this. Acetophenone acts in this system as a triplet sensitizer for the CPD generation. The PNA binds strongly to the DNA and after irradiation at 340 nm the CPD lesion is formed opposite the acetophenone. These probes were used to generate a single *cis-syn* CPD lesion in a 51 bp oligonucleotide in good yield. It was also possible to generate one defined CPD lesion in the genome of the bacteriophage M13 (Figure II-II). The detection of the *cis-syn* CPD lesion was performed through DNA separation with magnetic beads and immunologic detection of the CPD epitope. This novel and innovative technology enables the generation of a CPD lesion in the whole genome and subsequent studies of this lesion concerning repair process and signal cascades.

1. Einleitung

Viele Lebewesen der Erde sind während ihres Lebenszyklus für eine längere Zeitspanne dem Sonnenlicht ausgesetzt. In allen dieser Lebensformen wird der Informationsgehalt durch DNA bzw. RNA gespeichert und an die nächste Generation weitergegeben. Diese Biomoleküle weisen jedoch eine hohe Absorption im Bereich des UV-Lichtes der Sonne auf^[1], was durch chemische Reaktionen zu starken Schäden der DNA bzw. RNA führen kann. Da bei höheren Organismen ausschließlich eine Sonnenlicht Exposition in den äußereren Hautschichten stattfindet, korrelieren diese UV Licht induzierten DNA Schäden direkt mit der Entstehung von Hautkrebs.^[2-4] In Prokaryoten hat die UV Licht Bestrahlung einen unmittelbareren Einfluss auf das Überleben und die Teilungsfähigkeit, da hier das komplette Genom der Lebewesen beeinträchtigt wird.^[5] Deshalb führt bei Prokaryoten eine ungeschützte hohe UV Licht Dosis zum schnellen Tod.^[6] Für alle Prokaryoten ist es deshalb besonders wichtig, dass die DNA Reparatur schnell und effektiv abläuft, bevor es zur DNA Replikation kommt. Aus diesem Grund ist die Reparatur von UV Schäden in Prokaryonten durch besondere Enzyme, wie den Photolyasen, unterstützt.^[7] Im Jahre 2002 zeigten *van der Horst et al.*, dass transgene Mäuse die mit diesen CPD-Photolyasen ausgetattet wurden eine extreme Reduktion der UV Licht induzierten Effekte, wie Sonnenbrand und Apoptosis, aufweisen.^[8] Die Notwendigkeit sich vor diesen UV Schäden zu schützen führte zusätzlich zur Ausbildung von einzigartigen Schutzsystemen. Die DNA in Sporen ist z.B. so gut geschützt, dass Sporen eine 5- 50 mal höhere UV Resistenz als normale Zellen haben.^[9, 10] Das Verständnis von prokaryontischen DNA Reparatur- und Protektionssystemen trägt also unmittelbar zur Wissenserweiterung, und in Zukunft vielleicht zum verbesserten Schutz vor Hautkrebs beim Menschen bei.

1.1 UV Licht induzierte DNA Schäden

Die UV-Licht induzierten DNA Schäden sind nachweislich an der Photocanzerogenese und dem Zelltod beteiligt. Da die jeweiligen DNA Schäden nur bei bestimmten Wellenlängen auftreten, lässt sich eine Klassifizierung dieser Schäden durch eine Einteilung des UV-Lichtes in UVC (180nm bis 280nm), UVB (280nm bis 320 nm) und UVA (320nm bis 400nm) durchführen. Dabei ist zwischen den klassischen UV induzierten DNA Schäden wie, Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD), (6-4) Photoprodukt, Dewar Photoprodukt, Sporen Photoprodukt, und den durch Oxidation hervorgerufenen DNA Schäden zu unterscheiden. Die klassischen Pyrimidindimere entstehen überwiegend im UVC, UVB und UVA

Wellenlängenbereich, wohingegen die oxidativen Schäden (z.B. 8oxo-G) durch reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) entstehen, welche ihrerseits hauptsächlich durch UVA Licht erzeugt werden.^[11] Die Bildung von letzterem setzt jedoch eine vorherige Anregung von endogenen Photosensitzern wie, Porphorine, Riboflavine oder 3-Carbethoxypsoralen voraus (Abbildung 1-1).

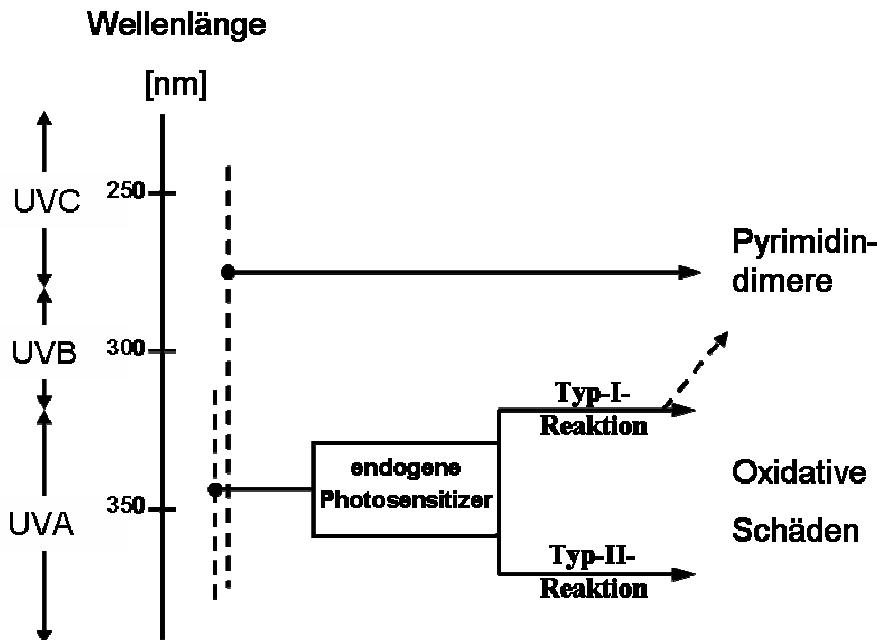
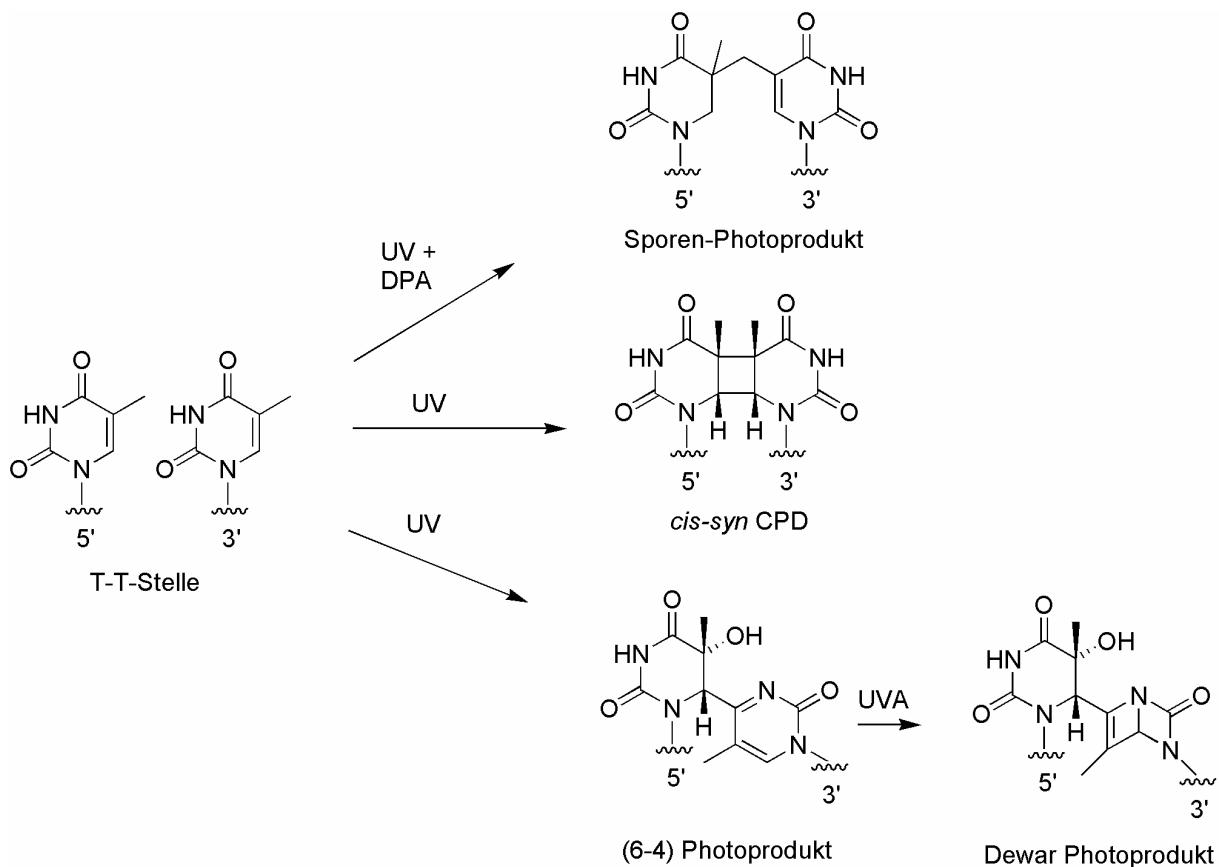


Abbildung 1-1: Direkte und indirekte Bildung vom Pyrimidindimeren und Oxidativen DNA Schäden durch UV Licht Bestrahlung.

Diese Photosensitizer können nun direkt mit der DNA reagieren (TypI) oder durch die Erzeugung von Singulett Sauerstoff (${}^1\text{O}_2$) die DNA Nucleobasen oxidieren (TypII). Durch TypI können sich sowohl oxidative Schäden und auch Pyrimidindimere bilden (indirekte Bildung). Alternativ können auch Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), welche durch Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in der Fenton Reaktion gebildet wurden, der Grund für die oxidativen Schäden sein.^[12, 13] Die Beschreibung der UV Licht induzierten DNA Schäden beschränkt sich im Folgenden allerdings ausschließlich auf die Pyrimidindimere und deren Reparatur, da sie die häufigeren durch UV Licht induzierten DNA Schäden darstellen.^[14]

Die eigentliche Photoreaktion der Basen kann entweder aus angeregten Singulett- oder Tripletzuständen erfolgen.^[15] Dabei werden alle UV-Schäden zwischen benachbarten Pyrimidinbasen gebildet.^[14] Addukte zwischen Purinbasen bzw. Pyrimidin- und Purinbasen sind kaum bekannt und wenig untersucht. Die Anzahl an Pyrimidinmonoaddukten ist ebenfalls sehr gering.^[16] Die Photoreaktionen im Allgemeinen sind extrem vom umgebenden Milieu^[17, 18] (pH Wert, Trockenheit, Photosensitizern, Salzen usw.) abhängig, so dass die Anzahl und Art der entstehenden Pyrimidindimere sich weiterhin im Fokus der Wissenschaft 2

befinden. Die wichtigsten Photoproducte zwischen zwei Thymidinen sind in Schema 1-1 dargestellt.



Schema 1-1: Entstehung der häufigsten Photodimere zwischen zwei benachbarten Thymidinen. Das Sporenphotoprodukt entsteht jedoch nur in Gegenwart von Dipicolinsäure und in der Trockenheit.

1.1.1 Cyclobutan Pyrimidin Dimer (CPD)

Das häufigste und am besten charakterisierte Photoprodukt ist der *cis-syn* Cyclobutan Pyrimidin Dimer (CPD) Schaden. Der CPD Schaden enthält zwei kovalente Bindungen zwischen den beiden 5- und 6 Kohlenstoffen der jeweils benachbarten Pyrimidinbasen. Das Dimer entsteht durch eine $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition aus dem angeregten Triplettzustand. Da Thymin die niedrigste Triplettenergie aufweist, stellt es den besten Akzeptor beim Energietransfer innerhalb der DNA dar.^[19] Diese chemische Eigenschaft führt theoretisch zu einer häufigeren Bildung von Thymindimeren als Cytosindimeren, was auch durch experimentelle Untersuchungen bestätigt wurde. Dabei kam es zur folgenden statistischen Häufigkeitsverteilung der Photodimer: T=T > T=C > C=T > C=C (Abbildung 2). Die alleinige Häufigkeitsverteilung sagt jedoch nichts über die biologische Relevanz aus. Die Mutagenität der einzelnen Schäden wurde durch zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Versuche

untersucht.^[20-23] Dabei zeigte sich, dass die C → T Transition die häufigste Mutation bei der Replikation von Photodimeren ist.

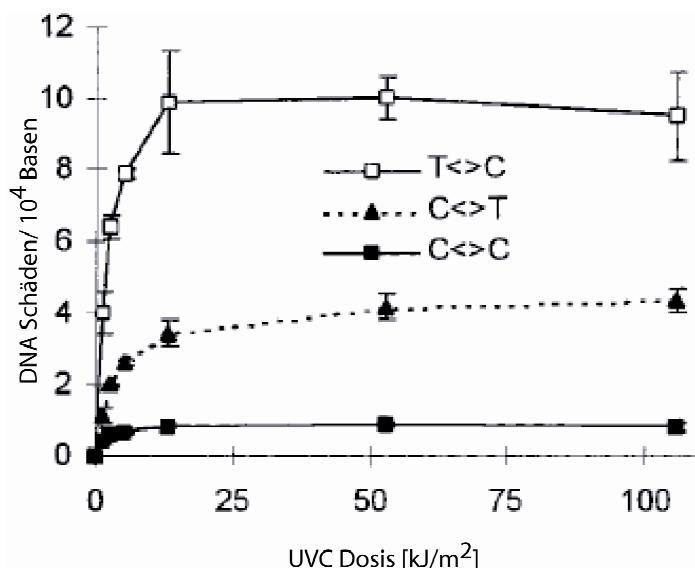
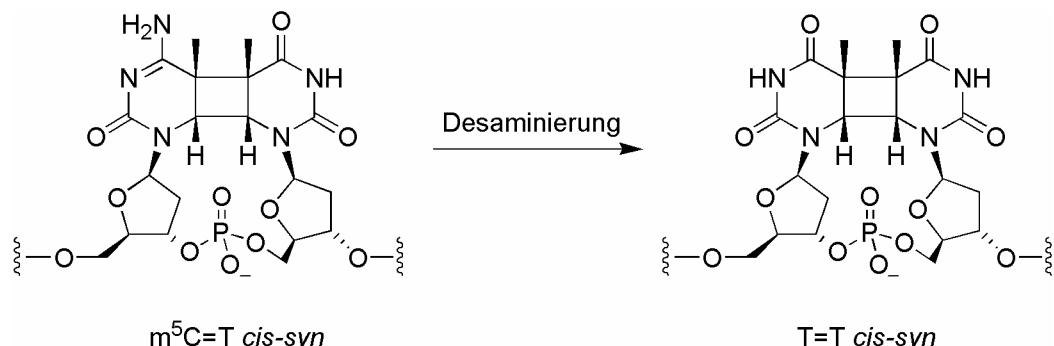


Abbildung 1-2: Bildung von T=C, C=T, C=C Cyclobutan Pyrimidin Dimere in isolierter DNA durch UVC Bestrahlung.^[24]

Für diesen beobachteten Effekt gibt es zwei mögliche Gründe. Zum einen findet die Desaminierung von C zu U im Photodimer viel schneller statt, als die Desaminierung eines normalen C oder m⁵C, was auf den Verlust der Ringaromatizität zurückzuführen ist. Diese Desaminierung findet *in vivo* innerhalb eines Tages statt,^[25, 26] und steht somit in zeitlicher Konkurrenz zur *in vivo* Reparatur von Photodimeren und der Zellteilungsrate. Die entstandenen Uracil haltigen Dimere verursachen nun eine Inkorporation von Adenosin als Gegenbase während der Replikation. Eine anschließende Replikation des Gegenstranges führt zu einem Einbau von Thymidin gegenüber dem Adenosin und somit zur beobachteten C → T Transition. Dieses kann selbstverständlich auch bei einem C=C CPD stattfinden, so dass es hier zu zwei hintereinander folgenden Mutationen (=*tandem mutation*) kommt, bei der zwei Cytosine in zwei Thymidine mutiert werden.^[27] Der zweite Grund für die häufig stattfindende C → T Transition ist der „*Tautomer Bypass*“ Mechanismus.^[21, 28] Die Destabilisierung des aromatischen Ringes durch die Sättigung der C(5)=C(6) Doppelbindung führt ebenfalls zu einem vermehrten Auftauchen von Cytosin Tautomeren.^[29] Dieses (E)- Iminio Tautomer von C im Photodimer hat die gleichen Basenpaarungseigenschaften wie ein Thymidin bzw. Uracil. Während der Replikation wird also gegenüber dem (E)- Iminio Tautomer von C ein A eingebaut und in der anschließenden Replikation des Gegenstranges kommt es wieder zu einem Einbau von Thymidin gegenüber dem Adenosin.

Der TT-CPD-Schaden führt, unter der durch UV-Licht induzierbaren SOS Antwort von Zellen, ebenfalls zu Mutationen. Hier werden vor allem am 3'-Thymidin T → C Transitionen und T → A Transversionen, also der Austausch einer Pyrimidinbase gegen eine Purinbase, beobachtet.^[30] Seit kurzer Zeit ist bekannt, dass die Beteiligung von 5-Methyl Cytosin (m^5C) an einem T= m^5C Cyclobutanpyrimidindimer die Mutationsrate und auch die Anzahl an CPD-Schäden um das 10 fache erhöht.^[31-34] Diese methylierten Cytosine gibt es ausschließlich in Säugetierzellen DNA als CpG Dinukleotid. Auch diese zusätzlich erhöhte Mutationsrate ist durch drei Mechanismen zu erklären. Ein Grund für die hohe Mutationsrate von $m^5C=T$ Cyclobutanpyrimidindimeren ist auch hier die Desaminierung von m^5C zu Thymidin, die schneller als die Desaminierung von C=T zu U=T abläuft (Schema 1-2).^[35]



Schema 1-2: Die Desaminierung von m^5C im $m^5C=T$ CPD führt zur Bildung von $T=T$ CPD. Diese Reaktion läuft innerhalb von wenigen Studen ab. [33]

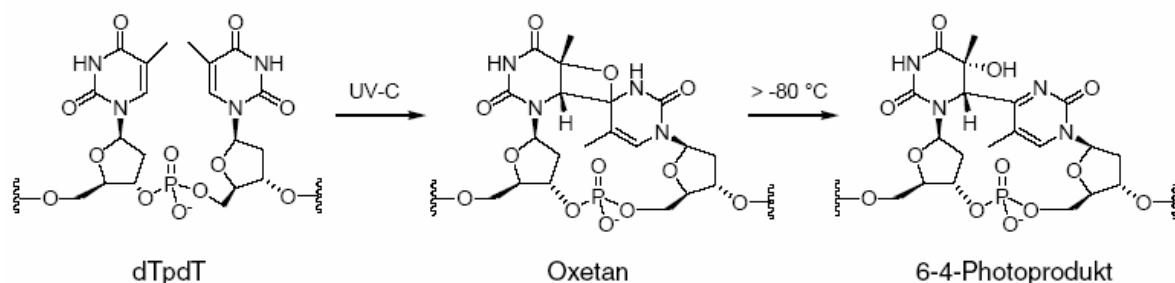
Als Resultat ergibt sich eine T=T CPD, bei dem während der Replikation gegenüber zwei Adenosine eingebaut werden. Es kommt also wieder zur $m^5C \rightarrow T$ Transition. Durch die dauerhafte Änderung im Methylierungsmuster kann es in der Folge zu schweren Fehlern im Transkripton kommen. Der zweite Grund für die erhöhte Mutationsrate in m^5CpG Dinukleotid ist die hohe Schädigungsrate durch Carzinogene wie Benzo-[α]-pyren.

Drittens weist m^5C eine prinzipiell höhere UV Absorption auf, was auch zu mehr photochemischen Reaktionen führt.

Die generelle Bildung von Mutationen aus Cyclopurimidindimere durch die enzymatische Replikation wird zurzeit kontrovers diskutiert und ist im Ergebnisteil genauer beschrieben. Sicher ist jedoch, dass dabei der Differenzierung nach Polymerasen und der *in vivo* Zusammenhänge, bei den bisher durchgeföhrten Studien auf atomarer Ebene, zu wenig Beachtung geschenkt wurde. [36]

1.1.2 (6-4) Photoprodukt

Der zweithäufigste, und folgerichtig ebenfalls sehr gut untersuchte Photodimerschaden, ist das (6-4) Photoprodukt. Dieses Photoprodukt entsteht durch eine Paternó- Büchi- Reaktion, bei der die C5-C6 Kohlenstoffe der ersten Pyrimidinbase mit der C4 Carbonylgruppe der benachbarten Pyrimidinbase zwei kovalente Bindungen eingeht (Schema 1-3). Es entsteht ein Oxetan. Auch dieser Schaden existiert als Heterodimer zwischen Cytosin und Thymidin und auch als Homodimer der jeweils gleichen Pyrimidinbasen. Bei den Cytosin (6-4) Photoprodukten ein Cytosins mit der Iminogruppe am C4 des benachbarten Pyrimidin eine Bindung aus. Diese Azetidin-Zwischenstufe ist oberhalb von -80°C nicht stabil und zerfällt unter Ringöffnung in das jeweilige (6-4) Photoprodukt. Das entstandene (6-4) Photoprodukt hat nun ein weiteres Absorptionsmaximum bei 326 nm, was die Detektion dieses Photodimerschadens sehr erleichtert.



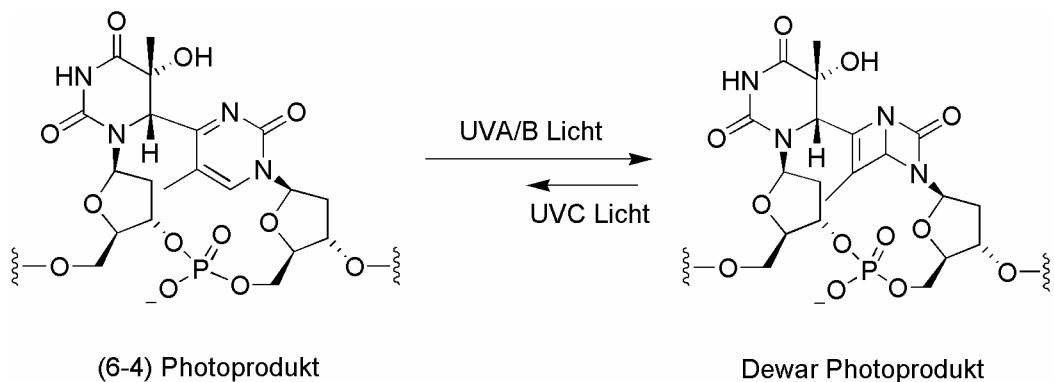
Schema 1-3: Bildung des T=T (6-4) Photoschadens über die Zwischstufe des Oxetans.

Die Häufigkeitsverteilung des (6-4) Photoproduktes in *in vivo* belichteter DNA unterscheidet sich von der des Cyclopyrimidindimers: $\text{T(6-4)C} > \text{T(6-4)T} > \text{C(6-4)C} > \text{C(6-4)T}$.^[24, 37] Jedoch sagt auch hier die Quantität der entstandenen Schäden wenig über das Mutationspotential aus. Hier ist der T(6-4)T Schaden der Photoschaden mit der höchsten Mutationsrate.^[38] Am häufigsten ist hier die $3'\text{T} \rightarrow \text{C}$ Transition.^[39, 40] Das $3'$ -Thymin scheint also bevorzugt mit Guanin zu paaren, was auch durch thermodynamische Messungen und Berechnungen bestätigt wird.^[41, 42] Die Desaminierung findet beim (6-4) Photoprodukt 100-mal langsamer statt, als bei *cis-syn* Cyclobutanpyrimidindimeren.^[37] Doch auch hier kommt es bei C(6-4)T und C(6-4)C zur Desaminierung des Cytosin, was dann wieder zu $\text{C} \rightarrow \text{T}$ Transitionen führt.^[40] Dieses passiert jedoch viel seltener, als die oben beschriebene $3'\text{T} \rightarrow \text{C}$ Transition. Zurzeit ist noch nicht endgültig erforscht, ob das (6-4) Photoprodukte oder das Cyclopyrimidindimer zu einer höheren Anzahl an Mutationen führt.^[27]

1.1.3 Dewar Photoprodukt

Die Bildung des Dewar Photoproduktes kann durch die Umwandlung vom (6-4) Photoprodukt durch Belichtung mit UV Licht photochemisch bei einer Wellenlänge von 312 nm hervorgerufen werden (Schema 1-4).^[43] Die Umkehrung dieser Reaktion ist durch UVC Licht Belichtung möglich, läuft jedoch sehr viel langsamer ab.^[44] Das Dewar Photoprodukt wurde in DNA von Säugetierzellkulturen nach Belichtungen im Sonnenlichtspektrum nachgewiesen.^[45, 46] Hier wurden ausschließlich CC, TT und TC Schäden durch HPLC-MS/MS identifiziert.^[47] Ob diese Bildung direkt, oder nur über die Umwandlung des (6-4) Photoprodukts geschieht, ist unklar. Die Anzahl an Dewar Photoprodukten nach Belichtung im Sonnenlichtspektrum ist sehr viel höher, als bei Belichtungen mit UVA/B oder C Licht, so dass die biologische Bedeutung des Dewar Photoproduktes wahrscheinlich größer ist als bisher angenommen.^[46]

Die Konstitution des Dewar Photoproducts wurde durch NMR, spektroskopische Messungen und Molecular Modelling untersucht. Es besteht eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum (6-4) Photoprodukt.^[48] Jedoch ist die 3'-Base des Dewar Photoproductes im Gegensatz zur 3'-Base des (6-4) Photoproductes nicht planar.^[49]

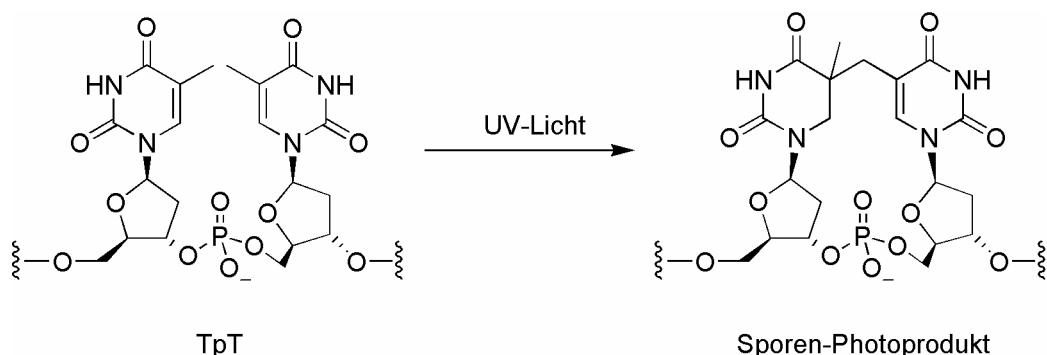


Schema 1-4: Bildung des Dewar Photoprodukt aus dem (6-4)Photoprodukt durch UVA /UVB Belichtung.

Die thermodynamische günstige Paarung des 3`Tymidin zum Guanin beim (6-4) Photoprodukt existiert beim Dewar Photoprodukt also nicht. Die häufige $3`T \rightarrow C$ Transition findet hier somit ebenfalls nicht statt, und damit ist die experimentell bestimmte geringe Mutationsrate des Dewar Photoprodukts auch theoretisch zu erklären. [30, 40]

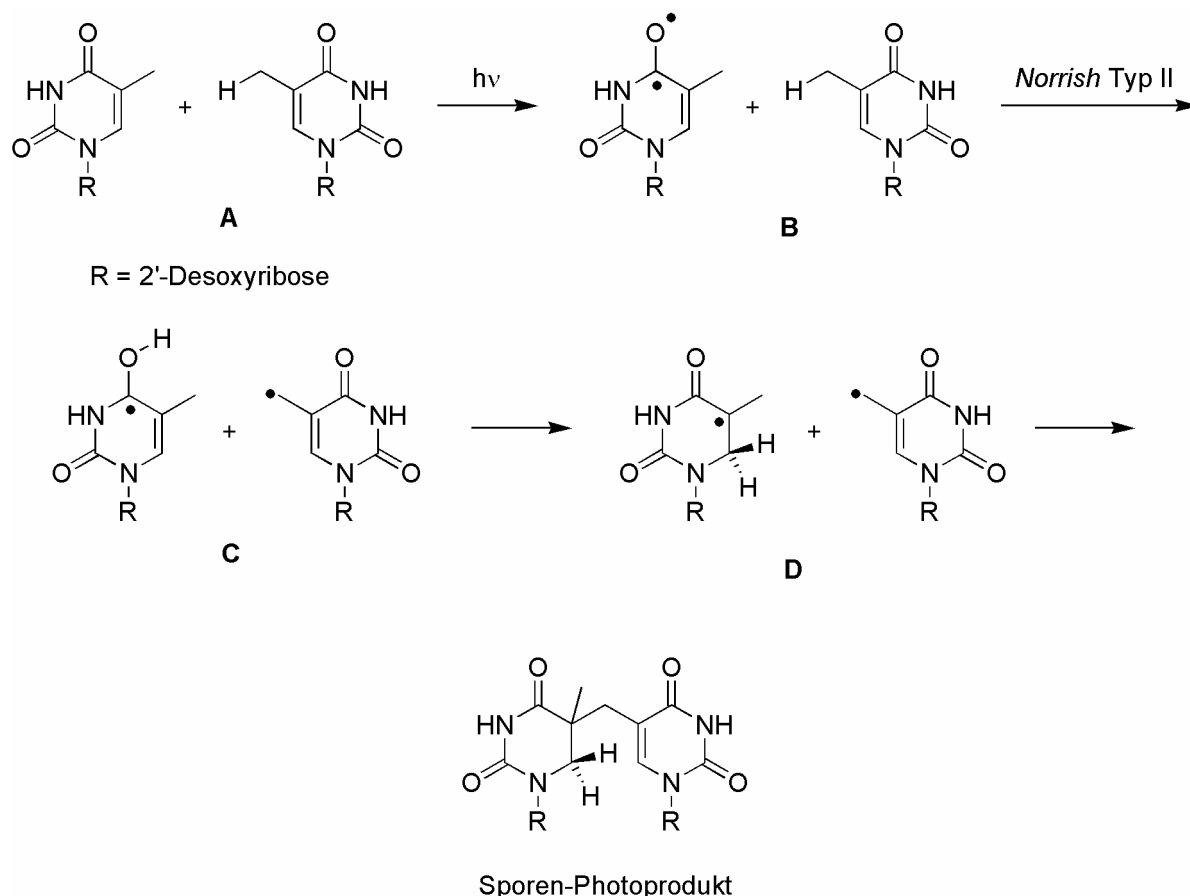
1.1.4. Sporen Photoprodukt

Das bereits unter 1.1 erwähnte Sporenphotoprodukt ist ein Photodimerschaden, der *in vivo* bisher ausschließlich in Sporen nachgewiesen werden konnte. Das Sporenphotoprodukt entsteht, identisch zum CPD und (6-4) Photoprodukt, durch die UV Belichtung von zwei benachbarten Thymidinen (Schema 1-5) und wurde 1965 von *Donellan et al.* entdeckt.^[50]



Schema 1-5: Bildung des Sporenphotoschadens durch UV Belichtung zweier intrastrang Thymidine.

Dieses Photodimer kann aus zwei Thymidinen im gleichen Strang (intrastrang), oder aus zwei Thymidinen die im Doppelstrang gegenüber liegen (interstrang; *cross-link*) entstehen. Der interstrang Sporenphotoschaden entsteht jedoch viel seltener als der intrastrang Sporenphotoschaden.^[51] Ein Sporenphotoschaden aus zwei benachbarten, oder gegenüberliegenden Cytosinen ist bislang noch nicht gefunden worden, ein heterodimeres Sporenphotoprodukt aus Cytosinen und Thymidinen ebenfalls noch nicht. Zur Mutagenität des Sporenphotoschadens sind, bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit, noch keine Daten publiziert. Zur Bildung des Sporenphotoschadens postulierte 1999 Begley *et al.* den im Schema 1-6 dargestellten Mechanismus.^[52] Im ersten Reaktionsschritt kommt es zur Photoanregung des ersten Thymidins (1-6 B). Im zweiten Reaktionsschritt vermutet er eine *Norrish Typ-II* Wasserstoff Abstraktion von der Methylgruppe des zweiten beteiligten Thymidins. Daraus resultiert das im Schema 1-6 C dargestellte Radikalpaar. Im Anschluss kommt es zur Tautomerisierung des ersten Thymidins (1-6 D). Das C-6 protonierte Tautomer kuppelt nun mit dem zweiten Radikal, und als Produkt würde man das Sporenphotoprodukt erhalten.



Schema 1-6 (A-D): Postulierter Bildungsmechanismus für das Sporen-Photoprodukt.^[52]

Studien zur qualitativen und quantitativen Bildung des Sporenphotoschadens bei verschiedenen UV Wellenlängen fehlen zurzeit. Die ersten Daten zur *in vitro* Generierung des Sporenphotoschadens wurden 2005 von *Douki et al.* publiziert.^[18, 51] Das Sporenphotoprodukt lässt sich in Gegenwart von Dipicolinsäure (DPA), *small acid soluble proteins* SASP'S und unter stark dehydrierten Bedingungen relativ selektiv *in vitro* generieren. Diese selektive Bildung des Sporenphotoproduktes findet ebenfalls in der Spore statt. Das für die Reparatur nötige Reparaturenzym ist die Sporenphotoproduktlyase. Das Sporenphotoprodukt wird hauptsächlich durch dieses Enzym, und nur zu einem geringen Teil, durch die *Nukleotide Excisions Reparatur* (NER) Enzyme repariert.

1.1.4.1 Sporen- Morphologie und Aufbau

Manche Organismen bilden Dauerstadien um extreme Umweltbedingungen auszuhalten. Diese Dauerstadien, in denen kein messbarer Stoffwechsel vorhanden ist^[53], nennt man Sporen. Die bakteriellen Sporen wurden erstmals in den 70-iger Jahren des 19. Jahrhunderts entdeckt.^[54-56] Sporenbildende Organismen sind sowohl bei eukaryotischen als auch bei

prokaryotischen Organismen bekannt. Die Fähigkeit der Sporulation ist jedoch im Bakterienreich weiter verbreitet, und hier vor allem bei dem gram positiven *Bacillus subtilis* Stamm sehr gut untersucht^[57, 58].

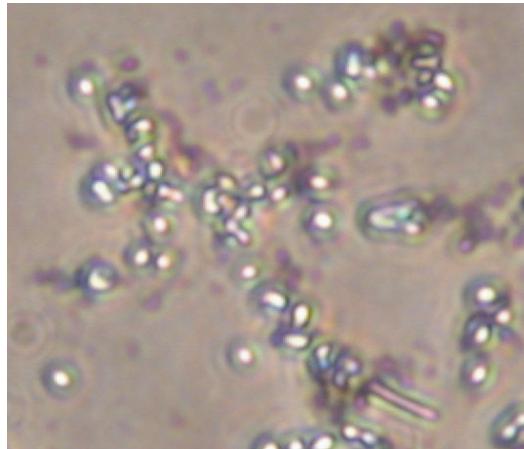


Abbildung 1-3 Lichtmikroskopische Aufnahme von *Bacillus subtilis* Sporen (MnCl₂ induzierte Sporulation).

Bei Bakterien wird die Sporulation durch eine extreme Verschlechterung der Lebens- und Wachstumsbedingungen ausgelöst. Dieses kann zum einen der Mangel an Nährstoffen wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff sein, zum anderen können auch Zytotoxine, z.B. zu hohe Konzentrationen an Schwermetallen zur Sporulation führen. Bei den Eukaryoten sind die Sporulationsauslöser sehr ähnlich. Hefen vermehren sich rein vegetativ, solange genügend Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphat vorhanden ist. Bei Nährstoffmangel wird eine geschlechtliche Fortpflanzung eingeleitet, die in die Bildung von Sporen endet. Die folgenden Beschreibungen beschränken sich jedoch auf die prokaryotischen Sporen, da bei Hefesporen bisher das Sporenphotoprodukt nicht identifiziert werden konnten. Dieses hängt sicherlich mit dem vollkommen unterschiedlichen Aufbau der Sporen zusammen (Abbildung 1-4).

Die Morphologie von prokaryontische Sporen der Gattung *Bacillus* und *Clostridium* ist sehr ähnlich und gut untersucht.^[59-63] Die Spore ist hauptsächlich durch eine zweischichtige Hülle, einer äußeren und inneren, vor Umwelteinflüssen geschützt. Der innere *Sporencocat* hat eine dünne lamellenartige Struktur, die normalerweise aus vier Schichten besteht und in der Summe eine Dicke von 75 nm ergibt. Der äußere *Sporencocat* hat eine Stärke von 100-200 nm und ummantelt den inneren *Sporencocat*. Biochemische Charakterisierungen zeigten, dass der *Sporencocat* zu einem Großteil aus Proteinen und zu einem geringeren Anteil aus Lipiden besteht. Nähere Untersuchungen ergaben, dass in *Bacillus subtilis* mehr als 50 verschiedene Proteine mit einem hohen Anteil an Cystein und Thyrosin den *Sporencocat* bilden.^[64] Bei einigen *Bacillus* Arten wurde zusätzlich noch ein sogenanntes Exosporium gefunden, welches

noch über der äußeren Hülle liegt. Dieses Exosporium besteht aus Glykoproteinen und dient vermutlich, im Falle von pathogenen Arten, zur Interaktion mit Zielorganismen. [65, 66]

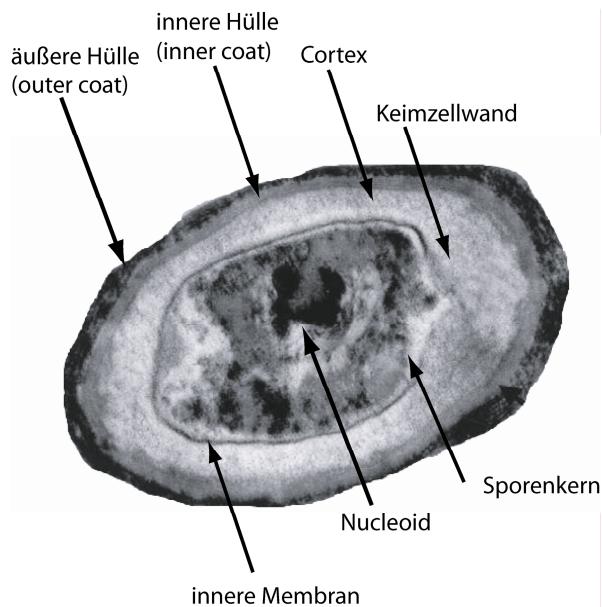


Abbildung 1-4: Kryoschnitt einer Spore. Aufnahme im Elektronenmikroskop nach Uranylacetat Färbung. [67]

Die äußere Membran, welche in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu sehen ist, liegt am inneren *Sporencocat* sehr dicht an. Darauf folgt die sehr breite Cortexschicht bestehend aus einer Peptidoglykanschicht, die wiederum hohe Konzentrationen an Mureinsäure δ -Laktam enthält. Die anschließende Keimzellwand besteht ebenfalls aus Peptido-glycanen, und schützt die neue vegetative Zelle nach der Sporengeneration als erste Zellwand. Keimzellwand und Cortex sind im elektronenmikroskopischen Bild leider nicht voneinander zu unterscheiden.

Der Sporenkern ist von einer inneren Membran ummantelt, welche aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Der Sporenkern selbst, enthält die komplette Erbinformation in Form von DNA, sowie tRNA's, Ribosomen und Enzyme des Zellmetabolismus, die für die Sporengeneration notwendig sind. Der Sporenkern ist also das Analog eines Protoplasten einer vegetativen Zelle.

Trotz des ruhenden Stoffwechsels ist die Spore fähig, die Nährstoffkonzentration in der lokalen Umgebung kontinuierlich zu verfolgen. Steigt der Nährstoffgehalt an, löst das den Keimungsprozess aus und die Spore wird wieder in eine wachsende Bakterienzelle transformiert [68]. Die älteste wieder germinierende Spore gehörte zu der *Bacillus* Spezies 2-9-3, die von Powers et al. aus einem 250 Millionen Jahre alten Salzkristall aus der *Permian Salado* Formation in New Mexico isoliert wurde. [69] Die Sporulation einer vegetativen Zelle

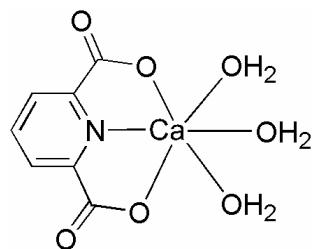
zur Spore ist ausführlich in einem Übersichtsartikel von *Seltow*^[63] beschrieben, auf die an dieser Stelle verwiesen wird.

1.1.4.2 DNA im Sporenkern

Da die DNA im Inneren der Spore, also im Sporenkern vorliegt, ist das Milieu des Sporenkerns die unmittelbare Umgebung der DNA. Hier sind der Gehalt an zwei niedermolekularen Substanzen und einem Protein von entscheidender Bedeutung. Die erste niedermolekulare Substanz ist Wasser. In protoplastierten vegetativen *Bacillus* und *Clostridium* Zellen liegt der H₂O Gehalt zwischen 75 und 80 Gewichtsprozent, wohingegen im Sporenkern lediglich 27 bis 55 Gewichtsprozent Wasser vorhanden sind.^[70] Der Wasseranteil im Sporenkern ist also extrem gering, so dass die Bewegung von Makromolekülen, auch die der DNA, stark eingeschränkt wird.^[71] Der geringe Wassergehalt ist sicherlich der Hauptgrund für die Beendigung jeglicher enzymatischen Aktivität, und auch der wichtigste Faktor für die Resistenz der Sporen gegen feuchte Hitze.^[70] Der Mechanismus um den Wassergehalt während der Sporulation in der Spore und im Sporenkern so stark zu reduzieren ist jedoch weiterhin unbekannt. Während der Sporengermination findet die Rehydratisierung des Sporenkerns sehr schnell, innerhalb der ersten 5 min statt. Die Sporenhülle bricht auf und makromolekulare Bewegung und Enzymaktivität sind wieder vorhanden.^[71, 72]

Die zweite niedermolekulare Verbindung ist die Pyridin-2,6-dicarbonsäure (Dipicolinsäure, DPA) (Schema 1-7). Dieses Molekül ist zu einem Anteil von 5-15% des Trockengewichts in den Sporen der Gattung *Bacillus* bzw. *Clostridium* vorhanden. In den Sporen ist diese Substanz ausschließlich im Sporenkern lokalisiert, und dort mit zweiwertig positiven Kationen wie Ca²⁺ im Verhältnis 1:1 chelatiert.^[70, 73-75]

Die Menge an DPA oder DPA-Ca²⁺ Komplexen im Sporenkern liegt weit über der Löslichkeitsgrenze. Es wird angenommen, dass DPA im Sporenkern eine glasähnliche Struktur ausbildet, was bisher aber noch nicht eindeutig belegt werden konnte.^[76, 77] DPA wird zum Zeitpunkt der Sporulation in der Mutterzelle synthetisiert, danach im Sporenkern der Vorspore akkumuliert und innerhalb der ersten Minuten, während der Sporengermination, wieder ausgeschieden. Der Mechanismus des DPA Exozytose ist bislang unbekannt.



Schema 1-7: Komplex aus Pyridine-2,6-dicarboxylsäure mit Ca^{2+} im Verhältnis 1:1.

Die Anhäufung von DPA im Sporenkern und die Komplexierung mit Wasser führen zu einer zusätzlichen Verringerung an freien Wassermolekülen im Sporenkern. Gentechnisch veränderte Zellen, deren DPA Synthese nicht mehr funktioniert, weisen einen erhöhten Wassergehalt im Sporenkern auf.^[78]

Die letzte der drei wichtigen Komponenten im Sporenkern ist das Vorkommen der *small acid soluble proteins* (SASP).^[79, 80] Diese Proteine haben eine extrem hohe DNA Affinität und komplexieren auch mit dieser. Die Bindung ist dabei unabhängig von der DNA Sequenz. Die SASP's werden nur in der Vorspore im letzten Abschnitt der Sporulation, kurz vor der Aufnahme der DPA und der Dehydratisierung, synthetisiert. Diese nur 60 -75 Aminosäure langen Proteine sind in hohen Konzentrationen in den Sporen vorhanden, und machen 3-6 % des Totalproteinangehalts der Sporen aus. Die α/β - Typ SASP's sind das Produkt einer Multigenfamilie von 4-7 Genen, die über das gesamte Genom von *Bacillus* Arten verteilt sind. Die Aminosäuresequenz ist hochgradig konserviert, und das auch zwischen der *Bacillus* und *Clostridium* Gattung. Es gibt einige unterschiedliche SASP Typen, wobei der α/β -Typ 80 % des gesamten SASP Pools ausmacht. Die SASP's werden in der frühen Phase der Sporengeneration von speziellen Proteasen proteolytisch abgebaut und dienen dann als Aminosäurequelle für die Proteinbiosynthese der vegetativen Zelle.^[81] Bis auf Cystein und Tryptophan sind alle Aminosäuren in den SASP's vorhanden. Die DNA ist nun zugänglich für die anschließende Reparatur und Transkription. Werden die SASP's nicht quantitativ von der DNA entfernt, wird eine starke Verschlechterung der DNA Transkription, und damit verbunden der Sporengeneration, festgestellt.^[81, 82] Die Überexpression dieser Proteine in *E. coli* ist deshalb nur mit ausgewählten *engineerten* SASP Varianten möglich, da auch hier durch DNA Bindung die Transkription blockiert wird.

Die Komplexierung der DNA mit diesen Proteinen spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz der DNA vor Hitze, Trockenheit, Oxidationsmitteln und UV-Strahlung. Es konnte gezeigt werden, dass SASP Deletionsmutanten (α/β^-) gegenüber den oben aufgeführten Umwelteinflüssen weitaus weniger resistent sind, als der Wildtyp.^[83-85] Aus diesem Grund wird im Folgenden die DNA/SASP Komplexstruktur genauer beschrieben. Erst im Jahr 2005

konnten Wolf *et al.* die ersten guten elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer DNA-SASP Struktur erhalten.^[86] Dazu wurde ein DNA Plasmid zusammen mit einer *engineerten* SASP Variante (SspC) *in vitro* inkubiert und danach im Elektronenmikroskop visualisiert (Abbildung 1-5). Die SspC Variante wurde gewählt, da diese sich am Besten in *E. coli* überexprimieren lässt, und somit in großen Mengen zur Verfügung steht.^[87]

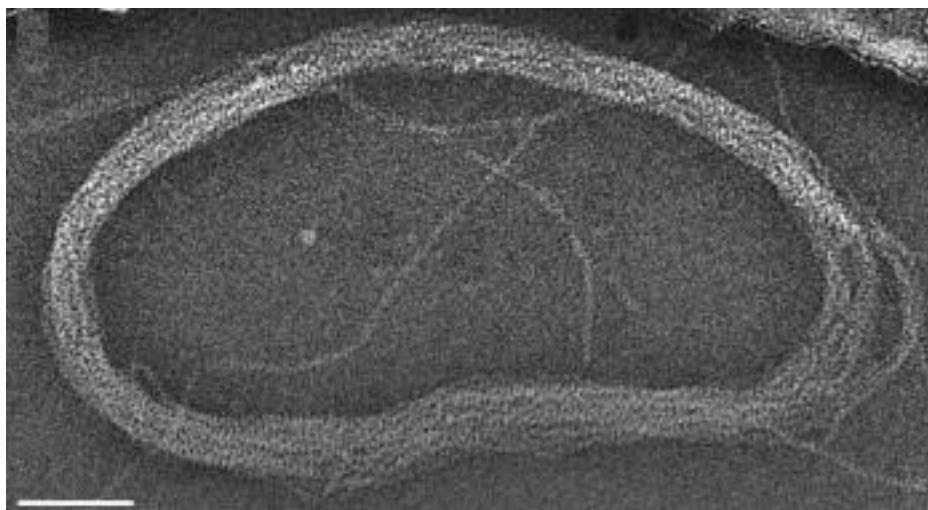


Abbildung 1-5: Elektronenmikroskopie-Aufnahme eines DNA-SspC-Komplexes *in vitro* bestehend aus Plasmid DNA und SspC-Filamenten.^[86]

Die aufgenommenen Bilder zeigten, dass das Protein die DNA vollständig umgibt und eine 5,5 nm breite helikale Struktur bildet. Die über die DNA herausstehenden SspC Einheiten ermöglichen eine Verzahnung der benachbarten DNA-Protein-Filamente zu einer dicht gepackten Anordnung von Nucleoproteinhelices. Die Struktur der DNA verändert sich bei der Bindung durch SspC nur geringfügig. Der Abstand zweier Nucleobasen von 0,317 nm (Abbildung 1-6) unterscheidet sich kaum von normaler B-DNA (0,34 nm). Durch die Simulation einer 3D Strukturanalyse vermuten die Autoren, dass die quaternäre Organisation der DNA-SspC-Filamente entscheidend für den Schutz und die erhöhte Superhelicität der DNA ist. Innerhalb dieser quaternären DNA-Protein Bündel, welche nahezu perfekt verzahnte Filamente aufweisen, ist der Wassergehalt stark reduziert (Abbildung 1-7). Es liegen zwischen benachbarten DNA-SspC-Filamenten sowohl antiparallele wie parallele Kontakte vor, da die DNA in einer geschlossenen Ringform vorliegt. Die kryoelektronenmikroskopische Studie zeigte, dass die parallelen Wechselwirkungen schwächer sind, da parallele, benachbarte Filamente eine geringere Komplementarität aufweisen. Die dichteren, antiparallelen Kontakte stabilisieren die dreidimensionale Anordnung der Filamente und kompensieren die

schwächeren parallelen Kontakte. Es kommt also zu der bereits beschriebenen dichten Verzahnung. Zusammen mit dem ohnehin schon geringen Wassergehalt im Sporenkern, könnte dieser Effekt, zu einer weiteren Reduktion des Angriffs von reaktiven Sauerstoff Radikalen an der DNA führen. Es kommt also in der Folge zu weniger oxidativen DNA Schäden.

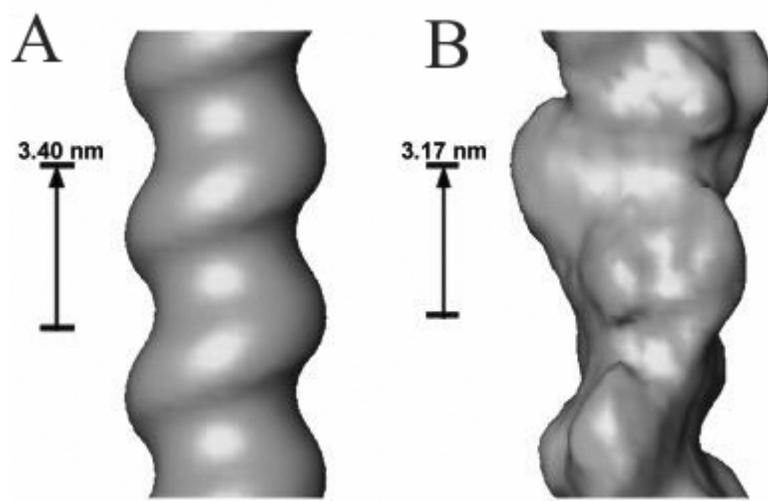


Abbildung 1-6: Vergleich der Ganghöhe in B-DNA (A) mit der DNA im SspC-Komplex (B).

In der Studie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass mit SspC gesättigte DNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine dicht gepackte toroidale Struktur bildet. Diese ungewöhnliche toroidale Morphologie wurde auch im Bakterium *Deinococcus radiodurans* gefunden.^[88, 89] Dieses Bakterium besitzt eine erstaunlich hohe Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung und Trockenheit. Es ist in der Lage eine Strahlendosis von 15.000 Gy zu überleben, für normale Organismen ist schon eine Dosis von 10 Gy lethal. Diese hohe Resistenz wird auf die toroidale Struktur der DNA in diesem Bakterium zurückgeführt. Allerdings zeigte sich in anderen Studien, dass die SASP's für die γ -Strahlenresistenz der Sporen keine Rolle spielen.^[90, 91] Es ist also anzunehmen, dass diese Gemeinsamkeit eher mit der reduzierten Wasserkonzentration in Gegenwart der DNA zusammenhängt, denn auch bei *Deinococcus radiodurans* ist die DNA so dicht gepackt, dass sogar die Diffusion der DNA Enden unterdrückt wird.

In Hefesporen gibt es weder hohe Konzentrationen an Dipicolinsäure, noch ist die DNA von SASP (*small acid soluble proteins*) ummantelt. Die Photochemie der DNA ist also eher entsprechend einer vegetativen Zelle.

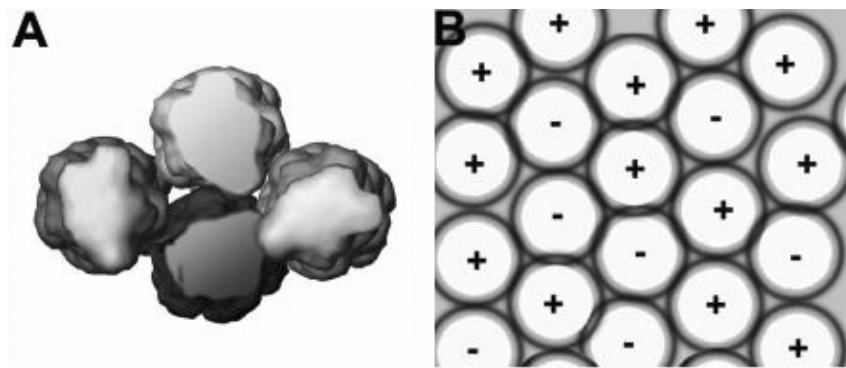


Abbildung 1-7: Dreidimensionale Anordnung von vier benachbarten Filamenten. A) Aufsicht auf die Filamente. Das dunkelgrau eingefärbte Filament bildet antiparallele Kontakte mit den anderen drei Filamenten aus. B) Schematische Aufsicht, der Anordnung von parallelen (+) und antiparallelen Filamenten (-) in einer hexagonalen Überstruktur.

1.1.4.3 Sporen- Resistenz

Sporen weisen eine extreme Resistenz gegenüber Strahlung, Hitze und Chemikalien auf. ^[10, 70, 77, 92-94] Die zugehörigen Schutzmechanismen werden im Folgenden genauer beschreiben.

Sporen Resistenz gegenüber Strahlung

Sporen sind signifikant resistenter gegenüber ionisierender γ - Strahlung als normale Zellen.^[95, 96] Ein Grund für diese Resistenz ist vermutlich der geringe Wassergehalt im Sporenkern. Damit verbunden ist die Abnahme an schädigenden Hydroxylradikalen, welche durch γ -Bestrahlung entstehen. Die hohe DPA Konzentration im Sporenkern hat keinen Einfluss auf eine erhöhte γ - Strahlenresistenz. Das gleiche gilt für die SASP's (vgl.1.1.4.1).

Sporen weisen zudem eine 10-50 fach erhöhte Resistenz gegenüber UV-Strahlung auf.^[10, 97] Ein bisher wenig untersuchter Grund könnte die Einlagerung von UV-Licht absorbierenden Pigmenten in den *Sporencat* sein.^[98] Diese Pigmente sind allerdings nicht in allen *Sporencats* von *Bacillus* Arten verbreitet, so dass Untersuchungen zum Pigmentvorkommen in Abhängigkeit zur UV-Licht Resistenz noch durchgeführt werden müssen. Der Hauptgrund für die erhöhte UV-Licht Resistenz liegt jedoch in der Änderung der DNA Photochemie. Die daran beteiligten Hauptfaktoren sind die bereits erwähnte dichte Packung von SASP's und DNA^[51, 99], die hohe Konzentration an Dipicolinsäure^[73, 100, 101] und der geringe Wassergehalt im Sporenkern^[93]. Diese drei Faktoren führen dazu, dass durch UV-Licht Bestrahlung nicht die üblichen UV-Photodimere, wie CPD und (6-4)- Photoschaden entstehen, sondern ein nur in Sporen vorkommender Schaden, das Sporenphotoprodukt (SP). Durch die Verwendung von Deletionsmutanten bzgl. SASP's (α^-/β^-) und des Operons der Dipicolinsäure Synthetase (*spoVF*) konnte die Relevanz der einzelnen Faktoren genauer untersucht werden.^[18, 51] Dabei zeigte sich, dass die *Bacillus subtilis* Stämme ohne SASP's nach einer UV-Belichtung eine

sehr viel höhere Anzahl an Cyclobutanpyrimidindimeren und (6-4) Photoprodukten aufweisen (Tabelle 1-1). Die Summe der entstehenden UV-Licht Photodimeren ist allerdings, im Vergleich zu den Wildtyp Sporen fast, gleich geblieben. Alle drei Photodimere kommen annähernd gleich häufig vor. Bei den Wildtyp Sporen hingegen, kommen fast ausschließlich Sporenphotoprodukte vor. Hier liegt die Anzahl an CPD und (6-4) Photoprodukten nur gering über der Nachweisgrenze. Sporen die kein, oder sehr wenig DPA im Sporenkern enthalten, haben interessanterweise weniger UV-Licht erzeugte Photodimere als der Wildtyp. DPA scheint also die UV-Sensibilität eher zu erhöhen als zu verringern. Die entstandenen Schäden sind hier in abnehmender Reihenfolge SP, CPD und dann das (6-4) Photoprodukt, alle aber auf sehr niedrigen Niveau. Bei der Untersuchung von Doppeldeletionsmutanten, hier liegen also sehr viel weniger SASP's und DPA im Sporenkern vor, zeigte sich eine annähernd gleich starke Bildung von CPD's und (6-4) Photoprodukten und eine extrem reduzierte Anzahl an Sporenphotoprodukten. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt, dass die Quantität der Photodimere durch DPA am stärksten beeinflusst wird. Die Schadensart, eher von den SASP. Allerdings zeigt erst die Kombination aus beiden, dass durch die Veränderung der DNA Photochemie in den Sporen, sehr selektiv nur das Sporenphotoprodukt entsteht.

Tabelle 1-1: Gebildete DNA-Photoprodukte in verschiedenen *Bacillus subtilis* Sporen durch UV-Licht Bestrahlung. [18, 51]

Sporen Genotyp	Photoprodukte (Schäden pro 10^4 bases pro $J \text{ cm}^2$)		
	CPD	64PP	SP
Wildtyp	1	0,1	252
α - β -	102,9	78,9	108
weniger DPA	8,7	1,2	23,1
α - β - weniger DPA	108,1	95,3	4

Sporen Resistenz gegenüber feuchter Hitze

Eine weitere erstaunliche Resistenz zeigen Sporen gegen feuchte Hitze. Dabei werden die Sporen in einem flüssigen Medium resuspendiert, und weisen eine durchschnittlich um 40°C erhöhte Temperaturverträglichkeit als vegetative Zellen auf.^[70, 93] Der Hauptgrund für diese Resistenz gegenüber hohen Temperaturen, liegt sicherlich an der geringen Wasserkonzentration im Sporenkern. Dabei korreliert der Wassergehalt in den Sporen exakt mit der Resistenz gegenüber feuchter Hitze. Je weniger Wasser im Sporenkern, desto höher die Temperaturverträglichkeit.^[70, 102] Dabei kann man den Wassergehalt im Sporenkern durch die Temperatur im umgebenden Medium, die während der Sporulation vorhanden ist,

beeinflussen. Je höher die Temperatur während der Sporulation, desto geringer ist der Wassergehalt im Sporenkern, und desto höher ist die Temperaturresistenz der Spore. Das gleiche ist bei Sporen zu beobachten, deren DPA Biosynthese ausgeschaltet wurde. Da diese Sporen einen erhöhten Wassergehalt im Sporenkern aufweisen, haben diese Varianten eine geringere Temperaturverträglichkeit gegen feuchte Hitze als die Wildtypsporen der gleichen Art. Der kausale Zusammenhang zwischen Wassergehalt im Sporenkern und der Resistenz gegenüber feuchter Hitze steht also fest. Unklar ist allerdings, durch welchen Mechanismus die Spore bei geringen Wasserkonzentrationen im Sporenkern geschützt ist. Wenig hydratisierte Proteine sind im Allgemeinen stabiler gegenüber hohen Temperaturen als Proteine in Lösung. Dieses ist vermutlich auf die Immobilisierung von DPA und Proteinen im Sporenkern zurückzuführen.^[71] Ein weitere Faktor der zur Sporenresistenz gegenüber feuchter Hitze beiträgt, sind divalente Kationen. Studien von Marquis *et al.* zeigten, dass mit hohen Konzentrationen an divalente Kationen die Hitzeresistenz ansteigt. Dieser Effekt ist nicht allein durch Verringerung des Wassergehalts im Sporenkern durch Komplexierung mit DPA zu erklären, da die erhöhte Resistenz nur in Gegenwart von Ca^{2+} Ionen existiert. Hohe Mg^{2+} und Mn^{2+} Konzentrationen führten zu einer geringeren Resistenz gegenüber feuchter Hitze. Wurden Na^+ und K^+ Kationen vollständig gegen Ca^{2+} Ionen ausgetauscht, zeigten diese Sporen die geringste Resistenz gegen feuchte Hitze.^[103] Ein möglicher Grund hierfür sind beobachtete Interaktionen von Markomolekülen mit DPA-Metallionen, die in der Lage sind, aus dem Sporenkern auszutreten.^[104] Hier fehlen allerdings detaillierte Daten.

Warum die Sporen bei zu großer feuchter Hitze jedoch irgendwann doch absterben, ist ebenfalls nicht vollkommen geklärt. Durch Analysen zeigte sich, dass DNA Schäden nicht der Grund sind, sondern eher die Inaktivierung von Sporenkernproteinen und die Zerstörung der inneren Membran.^[105] *Bacillus* Stämme in denen SASP's (α/β^-) fehlen, weisen interesserweise eine verringerte Resistenz gegen feuchte Hitze auf.^[83, 90] Hier ist die verringerte Resistenz wiederum durch DNA Schäden zu erklären. Die häufigsten DNA Schäden, die in SASP defizienten Sporen auftreten sind durch Depurinierung entstandene *abasic sites*. Des weiteren wurden auch desaminierte Cytosine in großer Anzahl gefunden.^[106]

Sporen Resistenz gegenüber trockener Hitze

Zu der hohen Resistenz gegenüber feuchter Hitze, weisen Sporen außerdem eine erhöhte Resistenz gegenüber trockener Hitze auf. Sporen überleben, im Vergleich zu vegetativen Zellen, eine Temperaturerhöhung um 30°C ohne Verringerung der Germinationsaktivität.^[90] Dabei ist kein Unterschied zwischen Sporen von thermophilen und mesophilen *Bacillus* Arten

festzustellen.^[107] Zurzeit fehlen Untersuchungen, ob DPA, die Mineralisierung des Sporenkerns und die Temperatur zum Zeitpunkt der Sporulation, Einflüsse auf die Resistenz gegenüber trockener Hitze haben. Bekannt ist allerdings, dass auch hier α/β - Typ SASP defiziente Stämme eine geringere Toleranz gegenüber trockener Hitze haben. Diese Stämme weisen die gleiche Temperaturtoleranz, wie die wachsenden vegetativen Zellen der gleichen *Bacillus* Art auf. Hier ist der vermutete Grund, der für das Abtöten der Sporen verantwortlich ist, wieder die Anhäufung von DNA Schäden. Dieses wurde bei *in vitro* Experimenten, in denen DNA mit SASP's komplexiert wurde, auch bestätigt. Die DNA Schadensarten wurden bis jetzt allerdings noch nicht identifiziert. Das Mutationsspektrum unterscheidet sich jedoch von den mit trockener Hitze behandelten Wildtyp Zellen sehr stark.^[108] Dass die Vielzahl an DNA Schäden, induziert durch trockene Hitze, einen Haupgrund für den Sporentot darstellt, zeigte sich des Weiteren durch Untersuchungen an reparaturdefizienten Stämmen.^[109] *recA* defiziente *Bacillus subtilis* Sporen zeigen z.B. eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber trockener Hitze auf.

Tabelle 1-2: Zusammenfassung der Sporenresistenzen im Wildtyp mit zugehörigen Schutzmechanismen und Inaktivierungsgrund.

Resistenz	Resistenzfaktoren	Grund für Sporentot
UV-Strahlung	DNA Photochemie, DPA, α/β SASP's, geringer H ₂ O Gehalt in Sporenkern, DNA Reparatur	DNA Schäden
γ - Strahlung	?	DNA Schäden
feuchte Hitze	DPA, α/β SASP's, Mineralisierung und geringer H ₂ O Gehalt im Sporenkern thermophile Enzyme in thermophilen Stämmen	? (Keine DNA Schäden)
trocken Hitze	α/β SASP's, DNA Reparatur	DNA Schäden
Chemikalien	Sporencouts, Impermeabilität der inneren Membran, α/β SASP's, DNA Reparatur	DNA Schäden, Schädigung der inneren Membran

Sporen Resistenz gegenüber Chemikalien

Sporen zeigen ebenfalls eine extreme Toleranz gegenüber einer breiten Palette an Chemikalien. Dazu gehören, Säuren, Basen, oxidierende-, alkylierende Agenzien, Aldehyde

und organische Lösungsmittel. Der Hauptgrund für diese Chemikalentoleranz ist der *Sporencat*. Der *Sporencat* schützt die wichtigeren inneren Bereiche der Sporen vor fast allen stark oxidierenden Substanzen, wie Chlordioxid, Hypochlorid, Ozon und Peroxynitrit.^[110-112] Zurzeit wird vermutet, dass im *Sporencat* eingelagerte detoxifizierende Enzyme, zusätzlich zur Impermeabilität des *Sporencats*, diesen Schutz erklären. Bislang wurde jedoch erst ein Enzym, die Superoxiddismutase, im *Sporencat* bzw. Exosporium mit dieser Funktion identifiziert.^[65, 113, 114] Es gibt auch Enzyme, die in vegetativen Zellen Funktionen der Detoxifizierung von Chemikalien übernehmen, wie die Katalase und die Alkylhydroperoxidreduktase. Obwohl diese auch im *Sporencat* vorhanden sind, zeigte sich, dass diese Enzyme keinen Einfluss auf die Chemikalienresistenz von Sporen haben.^[115] Der zweite wichtige Faktor ist die innere Membran der Spore, welche den *Sporencat* umschließt. Diese Membran ist extrem undurchlässig für kleine hydrophile und hydrophobe Moleküle.^[116] Selbst ein sehr kleines Molekül, wie Methylamin, penetriert durch die Membran nur sehr langsam. Es wurde eine Zeit für die maximale Methylaminaufnahme von 2 Stunden gemessen.^[117] Die Durchlässigkeit der inneren Membran ist durch die Temperatur oder die Behandlung mit Oxidationsmitteln während der Sporulation zu beeinflussen. Niedrige Sporulationstemperaturen und geringe Oxidationsmittelkonzentrationen führen zu einer erhöhten Permeabilität der inneren Membran. Die anschließende Behandlung mit Chemikalien führt dann zu einer Vielzahl von DNA Schäden im Sporenkern, und schließlich zum Sporentod.^[118] Bekannt ist also, dass die innere Membran einen starken Schutz gegen Chemikalien bewirkt, unklar ist jedoch wiederum wodurch. Zurzeit vermutet man, dass die Lipiddoppelschicht der inneren Membran einen großen Einfluss auf die Permeabilität hat. Durch eine sehr intensive Behandlung mit H_2O_2 lassen sich selbst in Wildtyp Sporen so viele DNA Schäden akkumulieren, dass diese schließlich sterben. Der DNA Schutz durch SASP's im Sporenkern hat also vermutlich einen großen Einfluss auf die Chemikalien Toleranz. Dieser Sachverhalt konnte durch die Verwendung von α^-/β^- -*Bacillus subtilis* Stämmen erneut bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass diese Deletionsmutanten eine viel höhere Sensitivität gegenüber H_2O_2 haben, als der Wildtyp. Das gleiche Phänomen, ist bei der Sporenbehandlung mit Salpetersäure und Formaldehyd zu beobachten. Auch hier, ist kein ausreichender Schutz vor DNA Schäden in den α^-/β^- -Stämmen mehr vorhanden.^[119] SASP's scheinen die DNA jedoch nicht vor allen Chemikalien ausreichend zu schützen. Die Behandlung mit der alkylierenden Agenz Ethylmethansulfonat tötet Wildtyp- und α^-/β^- -Sporen gleich effektiv ab. Die SASP's schützen hier die DNA nicht ausreichend vor Alkylierung.^[120]

Zusammengefasst, weisen Sporen eine enorme Resistenz gegenüber den genannten Umwelteinflüssen auf (Tabelle 1-2). Die Gründe hierfür sind zu weiten Teilen erforscht, die zugehörigen Mechanismen sind jedoch größtenteils unbekannt und werden weiterhin intensiv untersucht.

1.2 Prokaryotische Reparatur von Photodimeren

1.2.1 Direkte Reparatur

Bei der direkten Reparatur wird der jeweilige Photodimerschaden unmittelbar wieder in zwei ungeschädigte Monopyrimidine umgewandelt. Es kommt also nicht zum Austauch der geschädigten Basen.

1.2.1.1 CPD Photolyase

CPD-, (6-4)-Photolyasen und Cryptochrome nutzen Lichtenergie im Wellenlängenbereich von 350-450 nm um die jeweiligen Photodimere zu reparieren. Die CPD Photolyasen werden aufgrund von Sequenzhomologien in zwei Klassen eingeteilt. Die prokaryotischen und einige Pilz bzw Hefe Photolyasen gehören überwiegend zur Klasse I.^[121] Alle anderen CPD Photolyasen, überwiegend eukaryotischen Ursprungs, gehören zur Klasse II. Alle bekannten CPD Photolyasen enthalten FAD in stöchiometrischen Mengen als Kofaktor.^[122] Der zweite Kofaktor kann 8-HDF ((-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-desazaniboflavin oder das Pterin MTHF (5,10-Methenyl-tetrahydrofolat) sein. Der Reparaturmechanismus ist weitgehend biochemisch untersucht worden. Im Jahre 2004 wurde von der AG Carell und der AG Essen eine Kokristallstruktur der Klasse I *Anacystis nidulans* CPD Photolyase zusammen mit einem CPD-DNA Strang erfolgreich gelöst.^[123] Des Weiteren wurden einige Übersichtsartikel angefertigt, auf die an dieser Stelle verwiesen wird.^[124-126]

1.2.1.2 (6-4)-Photolyase

In Prokaryonten wurden bisher keine Enzyme gefunden, die durch Photoreaktivierung den (6-4) Photoschaden direkt reparieren.^[124] Allerdings ist bei einigen Cyanobakterien, wie *Gloeobacter violaceus*, anzunehmen, dass diese dem Sonnenlicht extrem ausgesetzten Organismen mit einer (6-4)-Photolyase ausgestattet sind. Dieses konnte bereits durch erste Experimente und einer hohen DNA bzw. Protein Sequenzhomologie zu (6-4)-Photolyasen bestätigt werden.^[127, 128]

1.2.1.3 DASH-Cryptochrome

Erst im Jahre 2006 wurde von Sancar *et al.* herausgefunden, dass die Cryptochrome der Cry-DASH Unterfamilie eine Photolyase Aktivität für CPD enthaltende Einzelstrang DNA haben.^[129] Kurze Zeit später wurde eine Kristallstruktur des Cryptochroms Cry-3 aus *Arabidopsis thaliana* veröffentlicht, welche aus der gleichen Unterfamilie stammt.^[130] Dieses Enzym enthält die beiden Kofaktoren MTHF und FAD im gleichen Abstand wie die Klasse I Photolyasen, so dass ein identischer Mechanismus vermutet werden darf. Der Unterschied liegt also ausschließlich an der DNA Bindung. Hier zeigten Studien, dass im Bereich des aktiven Zentrums die Hydrophobizität der Cry-3 Photolyasen geringer ist als in den Klasse I Photolyasen. Die Konsequenz daraus ist, dass das Herausdrehen des Dinucleotids aus einer Doppelhelix durch den erhöhten Bedarf an freier Energie bei den Cryptochromen nicht stattfindet. Die Bindung des CPD innerhalb des Doppelstranges ist also so stark, dass es nicht zum „*flipp out*“ Mechanismus kommen kann. Diese vorläufigen Ergebnisse lassen sich jedoch erst durch eine Kokristallstruktur mit DNA bestätigen.

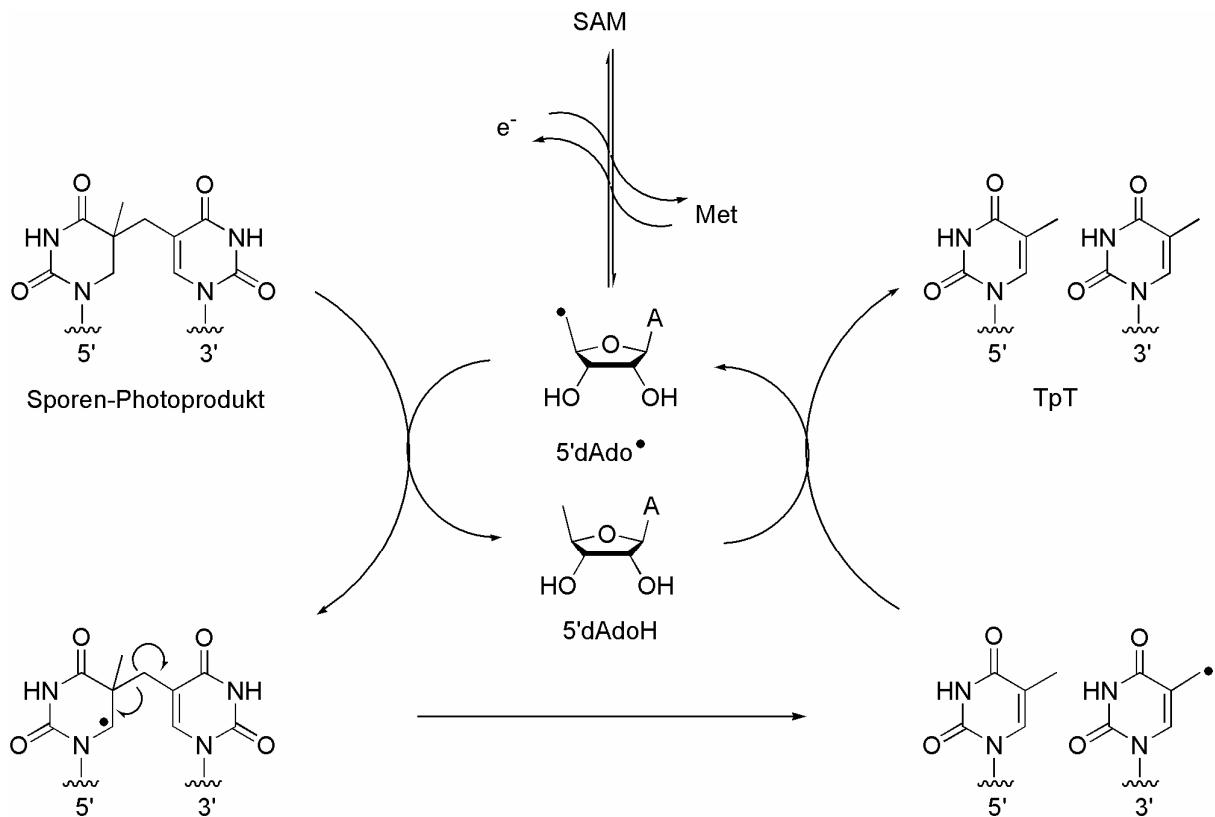
1.2.1.4 Sporenphotoproduktlyase

Die Existenz eines speziellen Enzyms zur Reparatur des Sporenphotoproduktes, wurde erstmalig 1972 von *Munakata* und *Rupert* 1972 beschrieben.^[131] In weiteren Studien konnte *Rupert* zeigen, dass die Reparatur des Schadens zu den ursprünglichen Thymidinen führt und im Gegensatz zu den Photolyasen auch unter Lichtausschluss stattfindet.^[132] Die Sporenphotoproduktlyase ist nachweislich das wichtigste Enzym zur Reparatur des Sporenphotoproduktes. Die NER spielt im Vergleich nur eine untergeordnete Rolle.^[133] Im Jahr 1993 gelang die Klonierung der Sporenphotoproduktlyase in *E. coli* und mit dieser rekombinanten Variante die weitere Charakterisierung des Enzyms aus *Bacillus subtilis*.^[134] Das *spl*-Operon ist bicistronisch aufgebaut,^[135] d.h., der Promotor reguliert die Expression von zwei Genen. In *Bacillus subtilis* besteht das *spl*-Operon aus dem *splA*-Gen, das ein 9.2 kDa großes Enzym kodiert, und dem *splB*-Gen, das ein 40 kDa großes Protein kodiert. Das *splB*-Protein bildet vermutlich als Homodimer die aktive SP-Lyase.^[136, 137] Das Gen wird nur in der dritten Phase der Sporenbildung in der Vorspore abgelesen, und wird hier durch die DNA abhängige sigma-G RNA Polymerase transkribiert. Die Sporenphotoproduktlyase wird also zum gleichen Zeitpunkt exprimiert wie die SASP's.^[135] Da die Reparatur des Sporenphotoproduktes unmittelbar zum Anfang der Sporulation stattfindet, ist eine SOS vermittelte Transkriptionserhöhung durch DNA Schäden nicht zu erwarten. Dieses konnte auch bisher,

im Gegensatz zu anderen DNA-Reparaturgenen wie *uvrABC* und *recA*, bei der Sporenphotoproduktlyase nicht nachgewiesen werden.^[135] Ob sich die Molekülanzahl durch UV Belichtung während der Sporulation, wie bei den SASP's erhöhen lässt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Das *splA* Protein aus *B.subtilis* hat vermutlich Regulationsfunktion in der Expression der *splB*. Der zugehörige Mechanismus ist nicht bekannt, aber das Protein weist Homologien in der Aminosäuresequenz zum *trp RNA-binding attenuation protein* (TRAP)^[138] auf, was auf eine ähnliche Regulation hindeutet. Ein Protein mit Sequenzhomologien zur *splA* ist in anderen *Bacillus* Arten bisher jedoch nicht identifiziert worden, so dass eine generelle Regulation von *splB* durch *splA* eher unwahrscheinlich ist. Die Sporenphotoproduktlyase enthält vier Cysteinreste, wobei drei (C91, C95, C98) eng benachbart vorliegen. Diese konservierte Abfolge der Cysteinreste findet sich auch allen anderen SAM-abhängigen Radikalenzymen.^[139] Zu dieser Familie gehören unter anderem die anaerobe Ribonukleotid-Reduktase (Typ III), die Pyruvat-Formiat-Lyase, die Lysin-2,3-Aminomutase und die Biotin-Synthase.^[140] Alle Enzyme dieser Klasse haben gemeinsam, dass sie einen sauerstofflabilen [4Fe-4S]-Cluster besitzen und anaerobe Bedingungen für ihre enzymatische Aktivität benötigen. Zusätzlich nutzen sie *S*-Adenosylmethionin (SAM), welches ein Desoxyadenosylradikal generieren kann, das dann direkt oder indirekt die Katalyse initiiert. Die SP-Lyase besitzt ebenfalls je einen sauerstoffempfindlichen [4Fe-4S]-Cluster pro Monomer und benötigt SAM als Kofaktor für die Reparatur. Eine im Jahre 2005 veröffentlichte Studie zeigte, dass das vierte Cystein in der *SplB* ebenfalls essentiell für die *in vivo* Aktivität ist. Des Weiteren zeigten Sequenzvergleiche, dass dieses Cystein hoch konserviert in *Bacillus* Arten ist.^[141] Die Verknüpfung der beiden *SplB*-Untereinheiten im homodimeren Enzym erfolgt vermutlich über eine Disulfidbrücke, welche durch diese Cysteinreste zustande kommen könnte.

Die SP-Lyase bindet und repariert nur das Sporenphotoprodukt, nicht jedoch das (6-4) Photoprodukt bzw. das CPD.^[142, 143] Die Sporenphotoproduktlyase weist dabei im C-terminalen Ende angeblich geringe Sequenzhomologien zu den Photolyasen auf.^[134] Allerdings zeigte sich durch die Veröffentlichung der CPD-Photolyase Kokristallstruktur, dass diese AS nicht an der DNA Bindung oder dem *base-flipping* Mechanismus beteiligt sind.^[123] Die Bindung an der Sporenphotoproduktlyase verursacht jedoch eine zusätzliche Verzerrung der DNA-Doppelhelix in der Umgebung des Schadens.^[142] Dieses lässt wiederum auf einen *base-flipping*-Mechanismus schließen, wie er für die CPD Photolyase gezeigt werden konnte. Basierend auf Untersuchungen an Modellverbindungen postulierten *Mehl* und *Begley* den in Schema 1-8 gezeigten Reparaturmechanismus.^[52] Das 5'-

Desoxyadenosylradikal, welches aus SAM durch Elektronenübertragung vom Fe-S-Cluster generiert wurde, abstrahiert eines der beiden Wasserstoffatome an C6 des 5,6-Dihydrothymidins. Die C-C-Bindung zwischen den beiden Thymidinen wird dadurch geschwächt und geht eine β -Fragmentierung ein. Im letzten Schritt wird das zuvor abstrahierte Wasserstoffatom vom 5'-dAdoH auf das verbliebene Thyminradikal übertragen, unter Regenerierung des 5'-Desoxyadenosylradikals. *Rebeil* und *Nicholson* konnten mittels ESI-Massenspektrometrie und HPLC die kurzzeitige Existenz des 5'-Desoxyadenosylradikals weiter untermauern.^[137] Das Isotopenmarkierungsexperiment von *Cheek* und *Broderick* stützt den postulierten Mechanismus ebenfalls.^[144] Sie verwendeten für die Herstellung des Sporenphotoproductes mit Tritium an C6[·] oder der Methylgruppe markierte Thymidine. Im Reparaturassay konnten sie zeigen, dass nur im Fall der Markierung an C6 ein Transfer des Tritiums auf SAM erfolgt. Quantenchemische DFT-Rechnungen konnten den Mechanismus weiter stützen.^[145] Hier wird jedoch davon ausgegangen, dass vor dem Rücktransfer des Wasserstoffatoms vom Cofaktor ein intermolekularer H-Transfer zwischen den Thyminen erfolgt. Den Rechnungen zufolge wäre dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend in der Reaktionsfolge. Die SP-Lyase ist mit diesem radikalischen Reparaturmechanismus einzigartig unter den DNA-Reparaturenzymen.^[146]



Schema 1-8: Postulierter Mechanismus der Reparatur des Spore-Photoproduktes durch die SP-Lyase.

1.2.2 Nukleotidexcisionsreparatur (NER)

Im Jahre 1964 wurde zum ersten mal entdeckt, dass UV Licht induzierte DNA Schäden aus der DNA ausgeschnitten werden.^[147, 148] Parallel wurde beobachtet, dass eine Neusynthese von kurzen DNA Fragmenten an diesen Stellen stattfindet.^[149] Kurze Zeit darauf wurden die für dieses Phänomen notwendigen Gene uvrA, uvrB und uvrC identifiziert.^[150] Die UvrABC Proteine erkennen und schneiden die geschädigte DNA in einer Mehrstufenreaktion aus der DNA heraus (Abbildung 1-8). Unter normalen Wachstumsbedingungen sind lediglich ~25 Moleküle UvrA und ~250 Moleküle UvrB in *E. coli* Zellen vorhanden. Die Expressionsrate von UvrA und UvrB ist unmittelbar an die SOS Antwort der Zellen gekoppelt.^[150] Nach der SOS Induktion erhöht sich die Anzahl der Moleküle um den Faktor 10 bei UvrA, so dass dann 250 Moleküle in der Zelle vorhanden sind. Bei UvrB erhöht sich die Anzahl um den Faktor 4, so dass dann sogar 1000 Moleküle pro Zelle vorliegen. Die Anzahl an UvrC ist nicht SOS Antwort gekoppelt, und beläuft sich im Durchschnitt auf weniger als 10 Moleküle pro *E. coli* Zelle.^[151]

Als erster Reparatursschritt, findet eine ATP abhängige Dimerisierung von UvrA statt (= A₂).^[152] Danach bildet dieses Dimer einen heterotrimeren Komplex mit einem UvrB Molekül (=A₂B).^[153] Die Diskriminierung zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA kann prinzipiell auch durch UvrA alleine geschehen, jedoch bindet der Komplex aus UvrA₂B viel besser an der geschädigten DNA als UvrA alleine.^[154] UvrA beginnt im Komplex (A₂B) mit der Schadenserkennung und führt damit zum Transfer der DNA an das UvrB Molekül.^[155] Ein UvrA Dimerkomplex kann viele UvrB Moleküle auf verschiedene Schäden in der DNA laden, so dass die höhere Konzentration an UvrB Molekülen dadurch erklärbar werden. UvrB weist in Gegenwart von UvrA und der geschädigten DNA ebenfalls eine ATPase Aktivität auf, die ebenso notwendig für die Schadenserkennung ist. Der Transfer der geschädigten DNA zu UvrB, und die Erkennung des DNA Schadens führen zu weiterem ATP Verbrauch und zur Spaltung des UvrA Dimerkomplexes. Es bleibt ein stabiler Komplex aus UvrB und der geschädigten DNA zurück.^[156] Anschließend bindet UvrC an DNA und UvrB (=BC·DNA). Vor dem Schneiden der DNA an der 3` Seite zum Schaden, muss UvrB ATP gebunden haben.^[157] Die Phosphordiester Spaltung erfolgt an der vierten oder fünften Stelle 3`-seitig vom Schaden entfernt. Der zweite Schnitt findet an der 5` Seite im Abstand von 8 Nukleotiden vom Schaden statt.^[158, 159] Nach dem herausschneiden des Schadens dissoziert UvrC von der DNA. UvrD (DNA Helikase II) ist notwendig um den ausgeschnittenen DNA Einzelstrang aus der DNA zu entfernen. Im nächsten Schritt füllt die DNA Polymerase I die Lücke wieder auf, während UvrB von der nun ungeschädigten DNA abfällt.

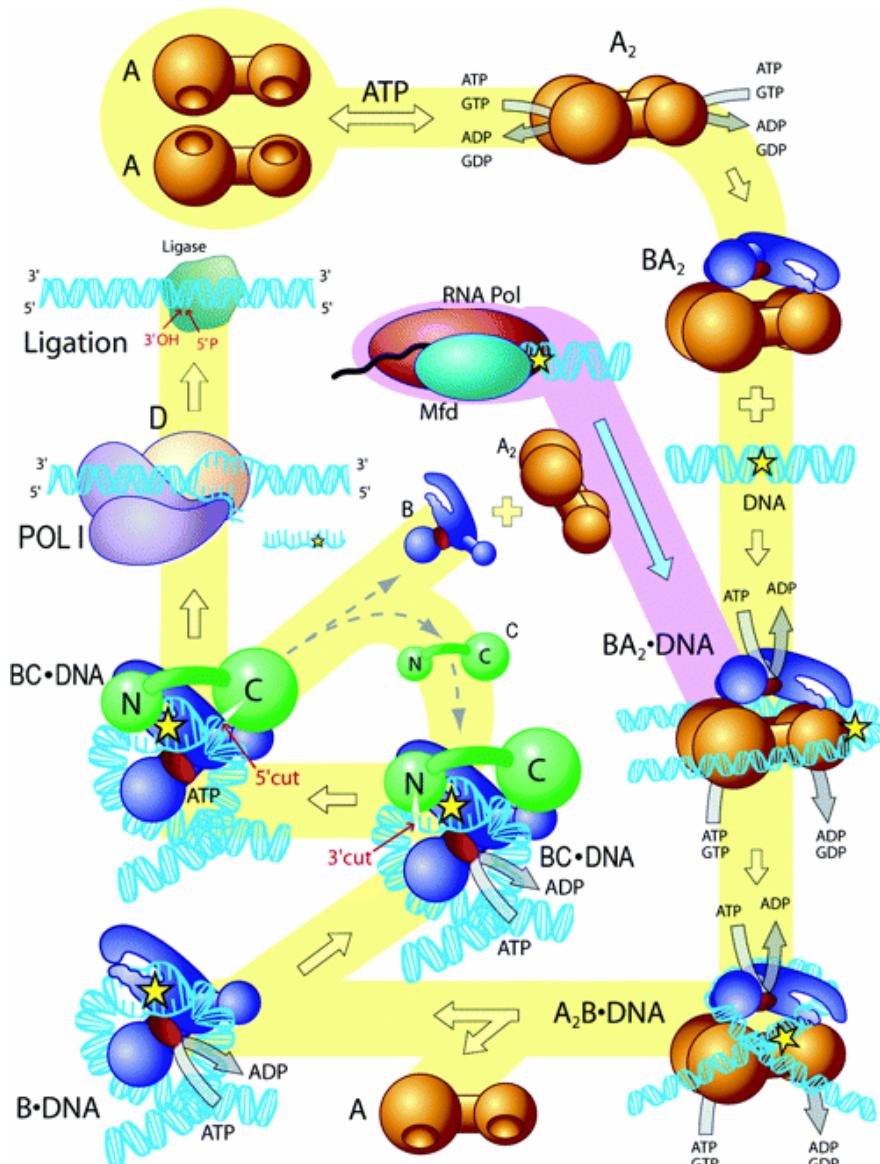


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der NER in *E. coli*. Sowohl die transkriptionell gekoppelte Reparatur (TCR) als auch der globale Reparaturweg gehen von einem A_nB-Komplex aus. [160]

Der Unterschied zwischen der *transkriptionell gekoppelten Reparatur* (TCR) und der *globalen DNA Reparatur* ist bei Prokaryonten eher gering. Bei der TCR rekrutiert Mfd das UvrA Protein an die Stelle, an der die RNA Polymerase gestoppt hat, zum DNA Schaden. Während der *globalen DNA Reparatur* läuft UvrA kontinuierlich über die DNA und überprüft die DNA auf Schäden.

Die Erkennung von DNA Schäden erfolgt über die Änderung der DNA Helixstruktur. Je verzerrter die DNA Helix durch den jeweiligen Schaden ist, desto besser wird dieser durch die NER erkannt und beseitigt.^[154] Hierbei gibt es natürlich auch sterische Grenzen, so dass DNA-Protein *Crosslinks* nur bis zu einer gewissen Größe repariert werden können.^[161] Alle Photodimere werden durch NER erkannt und repariert, wobei zurzeit der Kenntnistanstand zur

Reparatur vom CPD, (6-4) Photoproducts und dem Dewar Photoprodukt, im Vergleich zum Sporenphotoprodukt, sehr weitreichend ist.^[162-164] Die Reparatur von UV-Licht induzierten DNA Schäden ist in Prokaryoten als Reparatur *back up* für die direkte Reparatur durch CPD Photolyasen zu sehen. Der Hauptanteil der Photodimer, also die CPD's, werden durch die in fast allen Prokaryoten vorkommenden CPD Photolyasen repariert. Die (6-4)-Photolyasen wurden bisher nur in höheren Organismen identifiziert. Die erhöhte NER Reparatureffizienz von (6-4)-Photoproducten im Vergleich zum CPD ist also wichtig, und durch die stärkere Verzerrung des DNA Rückgrats auch zu erklären.^[165] Die NER in *E. coli* und *Bacillus* Arten ist sehr homolog.^[166] Die Bedeutung der NER für die Reparatur des Sporenphotoproduktes wurde bisher allerdings nur *in vivo* untersucht.^[133, 134, 167] Die Gene der NER in *Bacillus subtilis* wurden 1969 von *Munakata* entdeckt, und 1977 genauer kartiert.^[168, 169] Nach einer UV-C Belichtung weisen NER defiziente *Bacillus subtilis* Sporen eine um 50% reduzierte Überlebenrate auf. Der gleiche Stamm als Sporenphotoproduktlyase defiziente (*spl*) Variante weist eine um ca. 70 % verringerte Überlebensrate auf.^[133] Dieses Ergebnis zeigt, dass die DNA Reparatur durch NER für die Sporenresistenz gegen UV-Licht wichtig ist, die Sporenphotoproduktlyase jedoch bedeutsamer.

1.2.3 UVDE

Dieses erst in den neunziger Jahren von Bowman und Yajima *et al.* entdeckte Enzym^[170, 171] ist eine Endonuclease, welche UV-induzierte DNA Schäden, nicht UV-Schäden und auch falschgepaarte Basen erkennt. Zu den UV-Schäden wurden bisher ausschließlich Untersuchungen zum CPD und (6-4)-Photoprodukt durchgeführt.^[172] Diese biochemische Untersuchungen zeigten, dass UVDE unmittelbar an der 5`-Seite des CPD bzw. (6-4) Photoproducts, in einer Mg²⁺ abhängigen Reaktion, die DNA hydrolysiert. Nach der Reaktion bleibt eine 3`- Hydroxyl und eine 5`- Phosphorylgruppe an der Schnittstelle zurück.^[173] Die UVDE wurde bisher nur in 3 Organismen gefunden: *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Bacillus subtilis*. Das Enzym kommt also bei Prokaryoten und Eukaryoten vor.^[174] Das Protein hat eine Größe von 68 kDa und ist *in vitro* sehr instabil. Die *Bacillus subtilis* UVDE Variante wurde durch vergleichende Genomanalysen in einer Datenbank gefunden. Die klonierte Version dieser potentiellen *Bacillus subtilis* UVDE Variante wurde in NER und Photolyase defiziente *E. coli* Zellen kloniert. Hier zeigte sich eine verbesserte UV-Licht Resistenz.^[175] Eine Überexpression von UVDE gelang bisher nicht, da alle UVDE Varianten sehr schlecht in *E. coli* und auch Säugetierzellkulturen exprimiert werden.^[171, 173, 175] UVDE wird mittlerweile einem alternativen NER Reparaturweg in

Kombination mit anderen Proteinen, wie Rad2 in *S. pombe* (Rad 23 Analog in *S. cerevisiae*) zugeschrieben. [176, 177] Rad2 weist eine Endonucleaseaktivität auf, die zum vollständigen Abbau des Einzelstranges mit der 5'- Phosphorylgruppe führt. Studien zur Erkennung des Sporenphotoproductes sind bisher nicht verfügbar. Zurzeit arbeitet *Dr. Nora Goosen* in Kooperation mit dem AK Carell an diesem Projekt, und wird hoffentlich bald die ersten Daten publizieren können. Da das UVDE Protein auch in *Bacillus subtilis* gefunden wurde, ist die Relevanz für die UV Resistenz von Sporen durch *in vivo* Studien zu ergänzen.

1.2.4 Basenexcisionsreparatur (BER)

Bei der Basenexcisionsreparatur werden überwiegend DNA Schäden, welche durch Oxidation, Desaminierung oder Alkylierung entstanden sind, entfernt. [178] Man unterscheidet bei den BER Enzymen zwischen *monofunktionalen* und *bifunktionalen* Glykosylasen. Bei den *monofunktionalen* Glykosylasen wird lediglich die Base entfernt und die Phosphordiesterbindung wird durch AP-Lyasen hydrolysiert. Bei den *bifunktionalen* Glykosylasen findet das Entfernen des DNA Schadens durch einen zweitgeteilten Mechanismus statt. Im ersten Schritt wird der DNA Schaden durch das jeweilige Enzym erkannt und dann durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung durch eine *N*-Glykosylase-Aktivität katalysiert. Die abasische Stelle wird dann mit einer apurinische/apyrimidinische (AP) Lyase Aktivität durch eine β -Eliminierung oder eine β , δ - Eliminierung entfernt. Die nun entstandene Lücke wird durch die Polymerasen I, II oder III wieder aufgefüllt, und durch die *E. coli* Ligase wieder geschlossen. Das bisher einzige BER Enzym welches einen UV Dimerschaden erkennt ist die *bifunktionale* Pyrimidin Dimer Glykosylase.

1.2.4.1 Pyrimidin Dimer Glykosylase

Bereits 1947 wurde von *Luria et al.* entdeckt, dass der Bakteriophage T4 ungefähr zweimal so resistent gegenüber UV-Strahlung ist, wie alle anderen Bakteriophagen der gleichen Familie. [179] Erst 20 Jahre später, wurde das zugehörige Gen identifiziert, und als *denV* bezeichnet. [180, 181] Als nächstes wurde eine Pyrimidin Dimer Glykosylase (PDG) in *Micrococcus luteus* gefunden und charakterisiert. [182, 183] Mittlerweile sind ca. 120 Mikroorganismen identifiziert, bei denen durch Sequenzvergleiche eine PD-Glykosylase vermutet wird. Erfolgreich kloniert und charakterisiert wurde die PD-Glykosylase in *Bacillus sphaericus* [184] *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca* [185], *Haemophilus galinarium*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Morexella bovis* und im *Chlorella virus* Stamm PBCV1 [186]. Alle diese Enzyme reparieren ausschließlich den durch UV Licht induzierten CPD Schaden und

nicht das (6-4)-Photoprodukt. Dabei unterscheiden sich die Enzyme bzgl. ihrer Aktivität und Substratspezifität. Die PD-Glykosylase aus dem *Chlorella virus* hat zusätzlich zur *cis-syn* CPD, AP, und FapyG eine *trans-syn* CPD und eine FapyA Erkennungs- und Schneideaktivität. Zudem weist dieses Enzym eine 10-fach erhöhte katalytische Aktivität, als die T4-PDG, auf.^[187] Da die PDG auch in einem *Bacillus* Stamm gefunden wurde, sollten Studien zur Erkennung des Sporenphotoproduktes in naher Zukunft durchgeführt werden. Der katalytische Mechanismus zur Beseitigung des Schadens ist ausführlich untersucht worden. Als erstes wird das C1` Atom der Zielbase durch die α -Aminogruppe des N-terminalen Thr2 nukleophil angegriffen.^[188, 189] Die N-glykosidische Bindung wird gespalten und es entsteht eine Schiffsche Base zwischen der Aminogruppe und dem C1` Atom. Diese wird im Anschluss durch eine β, δ - Eliminierung von der Phosphatgruppe am C3` befreit.^[190, 191] Die T4 PDG ist das erste DNA Reparaturenzym von dem eine Kristallstruktur publiziert wurde.^[192] Dabei zeigte sich, dass die T4 PDG ein Monomer ist, welches nur aus α - Helices besteht und keinen Kofaktor enthält. T4-PDG wurde ebenfalls als erstes DNA Reparaturprotein mit einem DNA Strang mit Schaden kokristallisiert (Abbildung: 1-9).^[193]

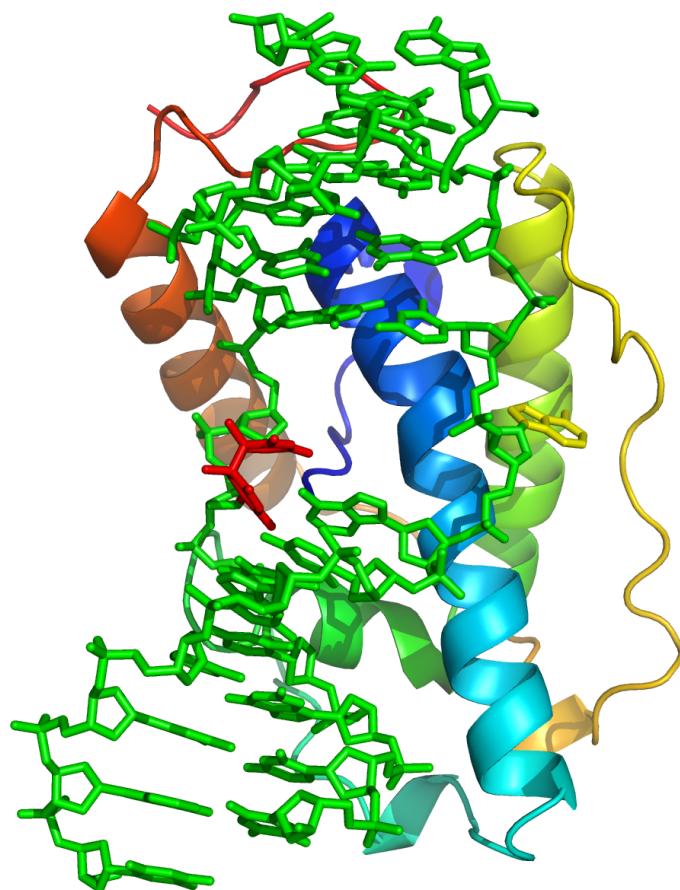


Abbildung 1-9: Kokristallstruktur der T4-PDG und DNA mit einem CPD- Photoschaden. Der Photoschaden (rot) bleibt in der DNA Helix. Das gegenüberliegende 5'Adenin (gelb) klappt in die aktive Tasche des Proteins.

Diese vorkatalytische Stufe konnte durch die Verwendung einer PDG Mutante (Glu23Gln) stabilisiert werden. Dabei zeigt sich die DNA in der hydrophoben Tasche in einem Winkel von 60° an der Stelle des CPD Schadens. Des Weiteren ist zu sehen, dass das Adenin gegenüber des 5'-seitigen CPD Thymidins aus der DNA Helix herausgedreht vorliegt, das CPD verbleibt dagegen in der DNA Helix. Kürzlich ist eine weitere Kristallstruktur veröffentlicht worden, welche eine AP-Stelle in der DNA der Kokristallstruktur aufweist. Auch hier dreht sich die der AP Stelle gegenüberliegende Base aus der DNA heraus.^[194] Zurzeit ist jedoch weiterhin unklar, warum dieses passiert und ob es für die katalytische Aktivität der PDG notwendig ist. Eine Kopplung zwischen PDG Aktivität mit der NER Aktivität konnte durch entsprechende Experimente belegt werden. Dabei zeigt sich, dass die NER Aktivität größer als bei jeder zuvor durchgeführten Messung wird, wenn PDG noch am DNA Strang assoziiert ist.^[195, 196]

1.2.5 Fehlpaarungsreparatur (MMR)

Da Photodimere nachweislich zu Mutationen führen, ist eine vollständige Beseitigung der DNA Schäden durch die oben beschriebenen Reparaturprozesse nicht wahrscheinlich. Diese Mutationen entstehen zum Zeitpunkt der DNA Replikation und werden hier unmittelbar danach von den Fehlpaarungsreparaturproteinen erkannt und beseitigt. Diese Enzyme erkennen chemisch unveränderte, aber fehlgepaarte Basen und Leserasterverschiebungen in der DNA. Die Diskriminierung des DNA Doppelstranges in Parenteralstrang und Tochterstrang erfolgt dabei über den Methylierungsstatus der DNA. Unmittelbar nach der Replikation sind lediglich die Adenine im Parenteralstrang methyliert nicht jedoch die Adenine im Tochterstrang. Im Falle eines *mismatches* wird ausschließlich der Tochterstrang durch MMR Proteine abgebaut.^[197] Die daran beteiligten Enzyme sind MutS, MutH und MutL. Der initiale Schritt der MMR ist die Erkennung von fehlgepaarten Basen bzw. Insertions-/Deletionsschleifen durch das MutS-Homodimer. Danach kommt es zur ATP abhängigen Rekrutierung von einem MutL Homodimer. Während dieser Rekrutierung fällt MutS von der falsch gepaarten DNA ab. MutH bindet nun an MutL und bildet damit das sogenannte *Repairosom*.^[198] MutH schneidet nun an der 5'-Seite einer unmethylierten GATC Sequenz. An dieser Stelle binden die Helicase II (UvrD) und verschiedene Endonukleasen (ExoVIII, RecJ oder ExoI), welche den Strang dann über die ungepaarte Stelle hinaus abbauen. Der entstandene Einzelstrang wird durch SSB Proteinen stabilisiert und durch die Polymerase III wieder aufgefüllt. Der entstandene *nick* wird durch die DNA Ligase wieder geschlossen.^[199]

1.2.6 Homologe Rekombination

Bereits 1940 wurde die homologe Rekombination in Bakterien beobachtet^[200], erst später wurde jedoch die Verbindung zur DNA Reparatur erkannt.^[201] Die homologe Rekombination zur Photodimerentfernung findet immer in Verbindung mit der DNA Replikation statt.^[202] Man geht davon aus, dass während der DNA Replikationsinhibierung durch Photodimere zwei mögliche Szenarien stattfinden können.^[203] Zum einen kann es zur *translesion synthesis* (TLS) kommen, welche durch *low fidelity* Polymerasen der Familie Y katalysiert wird, oder es kommt zur Reparatur durch den RecF^[204, 205] bzw. den RecBC^[206] Reparaturweg. Diese Reparaturwege lassen sich anhand des vorliegenden Schadensmusters unterscheiden. Die beiden Schadensmuster werden durch eine transient inhibierte DNA Replikation^[207] ausgelöst und als Tochterstranglücke und Doppelstrangenden Reparatur bezeichnet.^[208] Die Tochterstranglücke entsteht durch die Replikationsblockierung auf einem der beiden Parenteralstränge, gefolgt von einer Wiederaufnahme des Replikationsprozesses einige Basen hinter dem Photodimer. Zur Bildung von Doppelstrangenden kommt es durch eine vollständigen Zusammenbruch der Replikationsblase an einem der beiden Parenteralstränge (Abbildung 1-10).

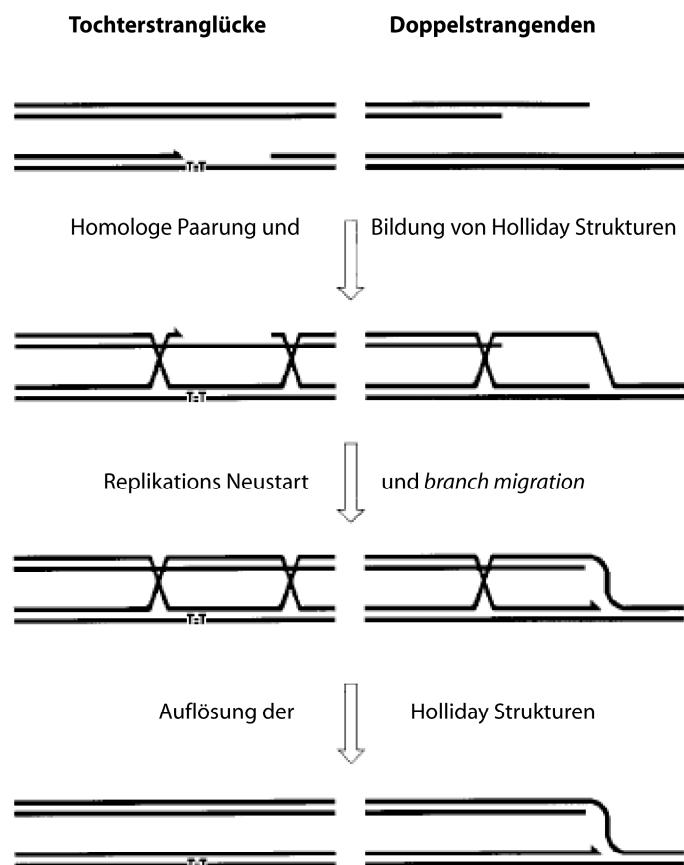


Abbildung 1-10: Darstellung der beiden rekombinatorischen Reparaturwege in *E. coli*. Links ist der RecF Reparaturweg von Tochterstranglücken dargestellt. Rechts der RecBC Reparaturweg von Doppelstrangenden.

Die Reparatur der Tochterstranglücken wird initiiert durch das Polymerisieren von RecA in Gegenwart von RecO und dem recFOR Komplex an der mit SSB Proteinen abgesättigten Tochterstranglücke. RecA assoziierte den zur Tochterstranglücke homologen DNA Abschnitt mit dem Einzelstrang, während DNA Gyrase 1 und Topoisomerase 1 positive bzw. negative Supercoils beseitigen. Durch diese homologe Paarung entstehen Hollidaystrukturen an der DNA. Die komplementäre Bindung des geschädigten an den ungeschädigten Strang ermöglicht nun einen Neustart der Replikation (*replication restart*) und damit ein Auffüllen der Lücke durch DNA Polymerasen (*branch migration*) und das Schließen der Lücke durch DNA Ligase. Danach entfernen RuvABC Resolvase und RecG Helikase die Hollidaystrukturen und die immer noch gebundenen RecA Proteine von der DNA. Bei der Reparatur von Doppelstranglücken wird zuerst der überhängende Doppelstrang durch die Exonuclease ExoV bis zu einer *chi* Stelle (Hotspot für DNA Rekombination) abgebaut.

An dieser Stelle bindet die RecBCD Rekombinase und führt zu einem verlangsamten Abbau der DNA, die dann nur noch am 5'-seitigen Strang abgebaut wird. Der entstandene 3' Überhang ist mit SSB Proteinen komplexiert und führt zusammen mit dem RecBCD Komplex zu einer DNA Bindung von RecA. RecA assoziiert die homologen Stränge zusammen und es entsteht ein D-Loop mit einer Einzel-Dreistrang Struktur. An der freien 3' Seite kommt es dann unter Vergrößerung des D-Loops zur Neusynthese der DNA durch Polymerase 1. Pri 1 bindet am ungebundenen Strang und führt zu einer Bindung des Primosoms, welches die Replikationsblase wieder herstellt und damit wieder zu einer Hollidaystruktur führt. Danach ist der Reparaturweg identisch zum RecF.

1.4 Selektive Schadensgenerierung in DNA

Der Zugang zu definierten DNA Schäden ist durch zwei unterschiedliche Ansätze möglich:

1. Synthese des jeweiligen Phosphoramidits mit anschließender DNA Synthese
2. Behandlung von DNA Strängen durch physikalische bzw. chemische Prozesse

Eine Limitierung der erstgenannten Möglichkeit besteht darin, dass ein DNA Strang von 1000 bp nicht durch eine Einmalsynthese herzustellen ist, und diese Methode nicht zur *in vivo* Schadensgenerierung genutzt werden kann. Des Weiteren ist die Synthese von einigen DNA Schäden, wenn überhaupt, nur mit sehr niedrigen Syntheseausbeuten durchführbar. Es ist also in einigen Fällen unumgänglich, eine möglichst sequenzspezifische Herstellung von DNA Schäden durch postsynthetische Behandlungen durchzuführen.

1.4.1 PNA

1991 wurde von *Nielsen et al.* ein vollsynthetisches Oligomer vorgestellt, welches als DNA Analog das Repertoire aller vier DNA Basen enthält, jedoch anstelle des Phosphordiester-Rückgrats mit einem achiralen *N*-(2Aminoethyl)glycin-Rückgrat ausgestattet ist.^[209] Da die Basen der Peptidnukleinsäuren (PNA) den gleichen Abstand von 0,34 nm wie die normalen DNA Basen haben, ist die Duplexbildung mit DNA und RNA sehr gut. Die Duplexstabilität nimmt bei einem homologen Strang in folgender Reihenfolge ab: PNA:PNA>PNA:RNA>PNA:DNA>> DNA:DNA.^[210] Diese veränderte Bindungseigenschaft ist auf den Austausch des Ribose-Phosphat-Rückgrats zurückzuführen. Das PNA Rückgrat ist ungeladen und bindet aufgrund der damit fehlenden elektrostatischen Abstoßung stärker an die komplementäre DNA als DNA selbst. Die bessere Bindung von PNA an DNA, als das natürliche DNA Homolog, ermöglicht das Deplazieren des ursprünglichen homologen DNA Strangs durch einen PNA Strang.^[211]

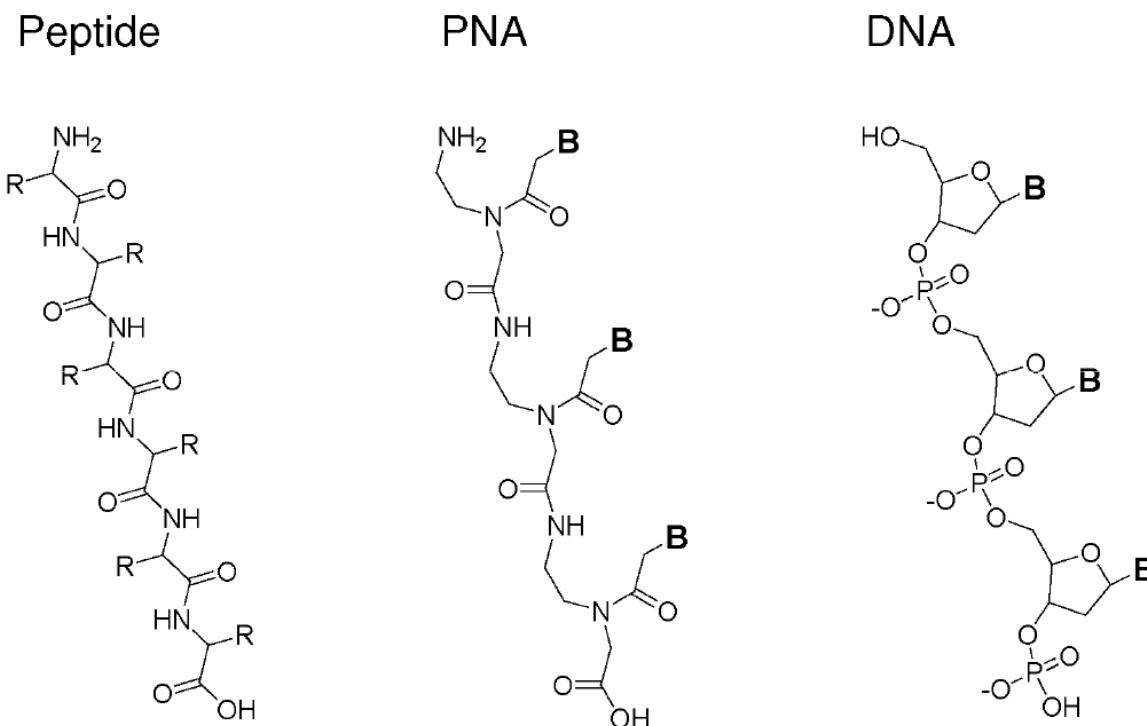


Abbildung 1-11: Vergleich von Desoxyribonukleotidsequenzen DNA, Peptidnukleinsäuren PNA und Peptidstrukturen. B= Base, R= Seitenkettenrest

Durch die fehlende Ladung ist die Abstoßung und damit die Schmelztemperatur der Duplexstrukturen sehr wenig von der Salzkonzentration im umgebenden Medium abhängig, auch Mg^{2+} hat keinen negativen Bindungseinfluß. Diese weitgehende Neutralität der PNA führt jedoch zu sehr schlechten Lösungseigenschaften in Wasser. Dieses Phänomen nimmt

mit zunehmender Länge der PNA und steigendem Puringehalt zu. Aus diesem Grund wird PNA häufig mit Lysinen am C und N- Terminus versehen, um die Löslichkeit zu verbessern.^[212]

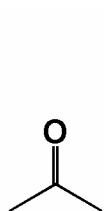
1.4.2 Biologische Relevanz von PNA

Im Vergleich zu DNA ist PNA in einer biologischen Umgebung stabil, da es keine zugehörigen Enzyme für den PNA Abbau in der Zelle gibt. Dieser Vorteil wird jedoch durch den Umstand getrübt, dass PNA sehr schlecht von eukaryotischen Zellen aufgenommen wird.^[213, 214] Man hat jedoch versucht, durch Modifikationen des Rückgrats oder durch die Verknüpfung mit biologischen oder chemischen Liganden die Zellaufnahme zu verbessern. Dabei konnte gezeigt werden, dass biotinylierte PNA in einem *in vivo* Experiment in humane Mitochondrien eingeschleust werden konnte. Die kovalente Verknüpfung von PNA an Lactose ermöglicht eine effiziente Endozytose in Leberzellen. Modifizierte PNA kann sogar in Neuronenzellen aufgenommen werden, nachdem die Blut-Hirn-Schranke überquert worden ist.^[215, 216] Doch trotz dieser Limitierung findet unmodifizierte PNA vielfältige Anwendungen in biotechnologischen Applikationen. So konnte bislang gezeigt werden, dass PNA zur Aktivierung der Transkription^[217] benutzt werden kann, für Antigen und Antisens Anwendungen^[218, 219], zur Blockierung von Restriktionsenzymen^[220] und zum Screenen nach SNP.^[221]

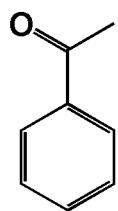
1.4.3 Tripletphotosensibilisatoren

Durch die Absorption von Photonen werden Nucleobasen aus dem S_0 Grundzustand in den angeregten S_1 Zustand versetzt. Die Rückkehr in den Grundzustand kann durch eine strahlungslose oder strahlende Deaktivierung stattfinden. Die strahlenden Deaktivierungswege sind Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz wird von dem angeregten Molekül ein Photon emittiert, und es gelangt dadurch wieder in den Grundzustand S_0 . Bei der Phosphoreszenz ändert sich durch eine Spin-Bahn-Kopplung die Spinmultiplizität (*intersystem crossing*, ISC), woraufhin das Molekül in einen energieärmeren Tripletzustand T_1 übergeht. Aus diesem, immer noch angeregten, T_1 -Zustand kommt das Molekül durch die Emission eines Photons wieder in den Grundzustand S_0 . Dieser Übergang ist spinverboten, was zu langen Halbwertszeiten des T_1 -Zustandes führt. Aus diesem langlebigen Tripletzustand finden viele der DNA Photoreaktionen statt. Die Quantenausbeute des ISC ist jedoch sehr gering, so dass durch die Verwendung von Tripletphotosensibilisatoren, die eine Quantenausbeute von fast eins haben, die Anzahl der DNA Photoreaktionen stark erhöht werden kann.^[222] Bei einem idealen Energietransfer liegt

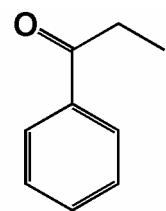
der erste angeregte Singulettzustand S_1 des Sensibilisators (Schema 12) unterhalb, der erste angeregte Triplettzustand jedoch oberhalb der jeweiligen Nucleobase. Die Nucleobase wird dann direkt in den Triplettzustand angehoben, von dem aus dann die Photoreaktionen mit anderen Nucleobasen stattfinden können. Bei diesem Vorgang wird selektiv die Bildung von CPD DNA Photodimeren beobachtet.



Aceton



Acetophenon



Propiophenon

Schema 1-9: Die am häufigsten zur Tripletsensibilisation eingesetzten Ketone.

2. Aufgabenstellung

In der Einleitung wurde aufgezeigt, welche essentielle Bedeutung der Reparatur und Replikation von DNA Schäden in der Natur zukommt. Für alle Lebensformen spielen hierbei eine schnelle Schadensentfernung und fehlerfreie DNA Duplikation die entscheidende Schlüsselrolle. Um mehr Details über diese Vorgänge zu erhalten, sind in der vorliegenden Arbeit die folgenden zwei Hauptthemen genauer untersucht worden: (i) Reparatur, Replikation und Generierung des Sporenphotoproduktes und (ii) die Erzeugung von ortspezifischen Cyclobutan-Pyrimidin Dimer Schäden im Genom.

Zum ersten Teil der Arbeit gibt es die begrenzte Information, dass die Sporenphotoproduktlyase das Sporenphotoprodukt repariert. Ob es dabei eine Substratdiskriminierung gibt und in welcher Effizienz bzw. wie diese Reparatur abläuft, ist jedoch nicht geklärt. Zur Beantwortung dieser offenen Fragen sollten Enzymstudien mit einer stabilen Sporenphotoproduktlyase Variante durchgeführt werden. Das Substrat, das Sporenphotoprodukt, musste hierzu als definiertes Substrat zuerst hergestellt und dann mit der überexprimierten Sporenphotoproduktlyase in die jeweiligen Assays eingesetzt werden, um kinetische Parameter bestimmen zu können. Zum Erhalt von Informationen zum Reparaturmechanismus sollten chemische Verbindungen hergestellt werden, welche gezielt die Enzymaktivität beeinflussen.

Ein vollkommenes „Wissensvakuum“ herrscht auch bzgl. der Replikation über das Sporenphotoprodukt hinweg. Da es bislang keinen Zugang zu definierten Substraten gibt, sollten definierte Substrate hergestellt und ein Repertoire an unterschiedlichen Polymerasen kloniert, heterolog exprimiert und gereinigt werden, um diese *in vitro* Studien durchzuführen. Parallel zu diesen *in vitro* Versuchen, sollte ein schneller, funktioneller *in vivo* Assay aufgebaut werden, welcher auch für andere DNA Schäden eine Vergleichsbasis zwischen *in vitro* und *in vivo* Replikationsstudien zur Verfügung stellen sollte.

Die Herstellung eines definierten CPD Schadens in großen DNA Molekülen ist bislang nur durch aufwendige Schadens-Synthese und Schadens-Integration möglich. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb ein Verfahren etabliert werden, welches die sequenzspezifische und selektive CPD Erzeugung in einem M13 Phagengenom ermöglicht. Hiermit würden bedeutende Untersuchungen zu *in vivo* Genom-Reparaturprozessen zugänglich.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Materialien

Laborchemikalien und Lösungsmittel in BioChemika.- Qualität	AppliChem, Darmstadt Boehringer, Mannheim Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma/Aldrich/ Fluka, Deisenhofen
--	--

3.1.2 Geräte

Tabelle 3- 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Firma
Äkta Purifier Chromatographie System	GE, München
Agarose Gelelektrophoresekammer	Biorad, München
Autoklav Vakulab S3000	Systec, Gießen
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
French Pressure Cell press	Thermo, Dreieich
Elektrotransformator, Micropuls	Biorad, München
Elisa Reader, FP Spektrometer	Tecan, Crailsheim
Gelscanner IDA	Raytest, Straubenhardt
Geldokumentationsgerät LAS3000	Raytest, Straubenhardt
Geltrockner 583	Biorad, München
Inkubator 1S	Noctua, Wiesloch
Inkubator 44R	New Brunswick,
Mastercycler Personal	Eppendorf, München
Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Multicaster	Biorad, München

Nanotrop UV-Spektrometer	Peqlab, Erlangen
pH Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
PCR Realplex	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	Biorad, München
Sorvall Zentrifuge, Evolution RC	Kendro, Dreieich
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhen	Sanyo, Bad Nenndorf
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blotter, Semi-Dry	Biorad, München
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vortexer	VWR, Darmstadt
Wasserbad	Labora, Mannheim
Waters Millipore System	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Spezielle Systeme

Tabelle 3- 2: Verwendete Isolations- und Präparationskits

Name	Verwendung	Firma
DNeasy Kit	Präparation von genomischer DNA	Qiagen, Hilden
MinElute PCR Purification Kit	Reinigung der PCR-Reaktion	Qiagen, Hilden
MinElute Gel Extraction Kit	Isolation von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
MinElute Reaction Clean up Kit	Reingung enzymatischer Reaktionen	Qiagen, Hilden
QIAquick Miniprep Kit	Präparation kleiner Plasmidmengen aus <i>E. coli</i>	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung der PCR-Reaktion	Qiagen, Hilden
TOPO- Kit	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway-System	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden, wenn nicht anders beschrieben, von New England Biolabs bezogen (Frankfurt). Polymerasen wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) bzw. NEB gekauft. Taq-Polymerase wurde selbst hergestellt. Ligase und andere DNA modifizierenden Enzyme wurden ebenfalls von NEB bezogen.

3.1.5 Häufig verwendete Puffer und Medien

PBS-Puffer:	pH 7,2
	140 mM Natriumchlorid
	8,0 mM Dinatriumhydrogenphosphat
	1,5 mM Natriumdihydrogenphosphat

10 x TBST- Puffer:	pH 8,0
	100 mM Tris
	1,5 M Natriumchlorid
	0,5 % (v/v) Tween 20

Agarosegel- Auftragspuffer: in TAE- Puffer

50,0 % (v/v)	Glycerin
0,2 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
0,05 % (w/v)	Xylencyanol FF

2x PAA- Auftragspuffer:	in TBE- Puffer
	12,0 % (v/v) Ficoll
	0,01 % (w/v) Bromphenolblau
	0,02% (w/v) Xylencyanol FF
	7,0 M Harnstoff

SDS- Auftragspuffer: pH 6,8
62,5 mM Tris
4,0 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
20,0 % (w/v) Glycerin
5,0 % (w/v) β -Mercaptoethanol

TE- Puffer: pH 8,0
10,0 mM Tris- HCl
1,0 mM EDTA

LB- Medium: pH 7,5
1,0 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) Natriumchlorid

2xYT- Medium: pH 7,0
0,5 % (w/v) Natriumchlorid
1,6 % (w/v) Trypton
1,0 % (w/v) Hefeextrakt

SOC-Medium: pH 7,2
2,0 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
10,0 mM NaCl
2,5 mM KCl

nach Autoklavierung:
5,0 mM $MgCl_2$
5,0 mM $MgSO_4$

Medium- Agar : jeweiliges Medium mit 1,5% (w/v) Agar

3.1.6 Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 3- 3: Verwendete *E. coli* und *S. cerevisiae* Substämme.

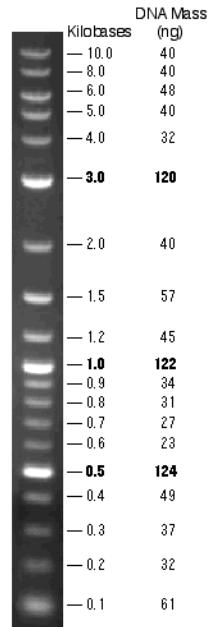
<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
Bl21 (DE3) pLys	hsdS gal (λ c I ts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Novagen, Schwalbach
CSR-603	F ⁻ lambda ⁻ thr leu pro arg thi lac ara gal xyl mtl recA rpsL supE tsx gyrA uvr phr	DSMZ, Braunschweig
JM101	F ⁻ traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15/ Δ (lac-proAB) glnV thi	NEB, Frankfurt
NEB-Turbo	F ⁻ proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ lacZM15/fhuA2 Δ (lac-proAB) glnV zgb-210::Tn10 (Tet ^R) endA1 thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5	NEB, Frankfurt
DH5 α	F ⁻ , endA1, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA1, gyrA (Nal _r), relA1, Δ (lacIZYA-argF), U169 deoR (Φ dlacD(lacZ))	Stratagene, Amsterdam
TOP10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
XL10Gold	Tet ^R Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F ⁻ proAB lacI ^q Z Δ M15Tn10(Tet ^r)Amy Cam ^r]	Stratagene, Amsterdam
Rosetta (DE3)pLysS	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁺), gal, dcm, lacY1, pRARE, (argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL) (CmR)	Novagene, Schwalbach
Tuner (DE3) pLysS	F ⁻ ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁺) gal dcm lacY1, pLysS (CMR)	Novagene, Schwalbach
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genotyp	Herkunft
YPH499	MATA ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-delta63 his3-delta200 leu2-delta1	ATCC, Wesel

3.1.7 Plasmide ohne Insert

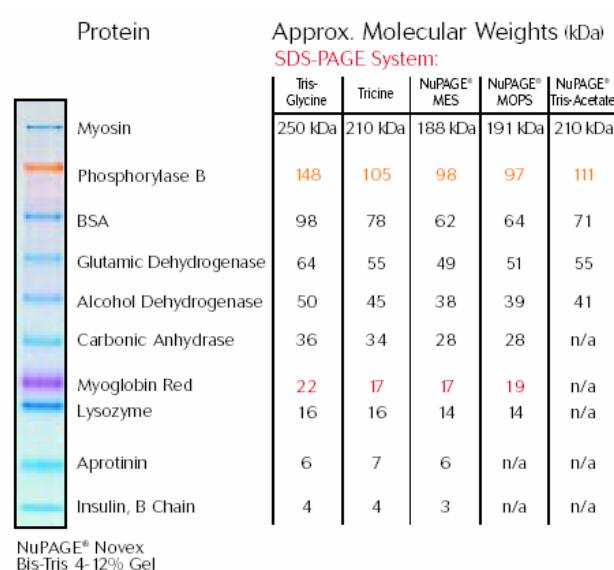
pDest 007	selbst hergestellt
pDest 008	selbst hergestellt
pDest 17	Invitrogen
pDest 14	Invitrogen
pDest 15	Invitrogen
pTOPO-D/SD	Invitrogen
pET101-D	Invitrogen
pDONR201	Invitrogen

3.1.8 DNA- und Proteinstandards

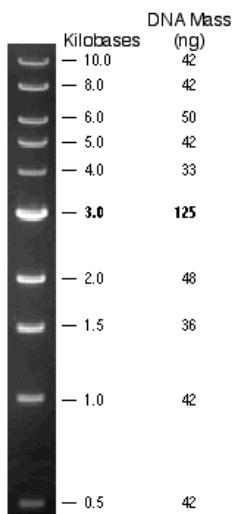
2-Log DNA Ladder (0,1–10,0 kb)
(NEB)



SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard
(Invitrogen)



DNA Ladder 1 kb
(NEB)



3.1.9 Datenbanken und Computerprogramme

Swiss-Prot: Department de Biochemie Medicale
Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz
<http://www.swissprot.com>

NCBI: National Center for Biotechnology Information USA
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

EMBL : European Molecular Biology Laboratory
Data Library Nucleotide Sequence Database Heidelberg
<http://www.embl-heidelberg.de>
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

Lasergene: Seqman, Editseq, Seqbuilder, Protean, PrimerSelect
(DNA-Star 5.0)

CloneManager: Sci Ed Central

ELISA-FP-Reader: X Fluoro4 Genius Pro

ÄKTA: UNICORN 6.0

HPLC: Merk D-7000 HPLC Systemmanager

1D-Gel Auswertesoftware: Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.10

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Bakterien- und Hefekulturen

Nutrient broth Medium: pH 7,0
0,5 % (w/v) Pepton
0,3 % (w/v) Fleischextrakt

YPD Medium: 2% (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefeextrakt
2 % (w/v) Glukose

Zur *Saccharomyces cerevisiae* Anzucht wurden die verwendeten Hefestämme in 5 mL YPD-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum in einem Schüttelinkubator bei 30°C unter aeroben Bedingungen gezüchtet. Alle verwendeten *Bacillus subtilis* Stämme wurden im Nutrient broth Medium bei 37°C, dem entsprechenden Antibiotika und 250 rpm geschüttelt. *Geobacillus stearothermophilus* wurde bei 55°C für mindestens 20 h im Inkubator inkubiert.

3.2.2 Transformation von *E. coli*

3.2.2.2 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Die Elektroporationsküvette wurde auf Eis vorgekühlt und pro Transformation 1 mL SOC-Medium in einem 13 mL *Snap-Cap* auf 37°C erwärmt. Die elektrokompetenten Zellen wurden aus dem -80°C Schrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde ebenfalls auf Eis vorgekühlt und im Anschluss 2-6 ng DNA zu den aufgetauten Zellen gegeben und gut gemischt. Diese Reaktion wurde für 1 min auf Eis inkubiert. Nach der Überführung der Zellen in die Elektroporationsküvette erfolgte der Spannungsimpuls von 2,5 kV. Nur bei Spannungen die länger als 3 ms gehalten wurden, ist die Transformation als erfolgreich zu beurteilen. Sofort nach dem Puls wurde die Küvette aus dem Transformator genommen und 1 mL SOC-Medium auf die transformierten Bakterien gegeben. Die Zellsuspension wurde wieder in das *Snap-Cap* überführt und 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge mit 4000 x g für 2 min sedimentiert und das verbleibende Sediment auf Agar-Platten mit dem entsprechenden

Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Inkubator. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

3.2.2.3 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Transformationspuffer: 70 mM Calciumchlorid
 35 mM Magnesiumchlorid

Die bei –80°C gelagerten chemisch-kompetenten auf 50 µL aliquotierten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 µL Transformationspuffer und 4 µL zu transformierender DNA versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Die Bakterien wurden im Anschluss für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach einer erneuten 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden die transformierten Bakterien mit 1 mL SOC-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge mit 4000 x g für 2 min sedimentiert und das verbleibende Sediment auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Inkubator. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

3.2.3 Induktion zur Proteinexpression

Stamm-Lösung: 1 M IPTG
Stamm-Lösung: 2 mg/mL Anhydrotetracyclin in DMF

Aus einer Dauerkultur bzw. Agar Platte wurde ein Klon entnommen und eine 5 mL Flüssigkultur mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Mit dieser ÜNK wurden am darauffolgenden Morgen bis zu 1 L Medium angeimpft. Bei 37°C bzw. 30°C wuchsen die Bakterien bis zu einer $OD_{600} = 0,4-0,6$. Vor der Induktion wurde eine 100 µL Probe (I_0) entnommen und in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50 µL SDS-Auftragspuffer für 10 min bei 95°C erhitzt. Durch die Zugabe von 1 µM bis 1 mM IPTG bzw. 0,4 mM Anhydrotetracyclin wurde der jeweilige Promotor induziert und die Proteinexpression bei 16°C-37°C nach 2 bis 16 h abgestoppt. Die Bakteriensuspensionen wurden in Zentrifugenbecher gefüllt und bei 8000 x g für 10 min im *SLA-3000 Rotor* sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wie unter 3.2.4 beschrieben aufgeschlossen oder bei –20°C gelagert.

3.2.4 Bakterien-Aufschluss

3.2.4.1 Lysozym-Aufschluss

Puffer Ä1:	pH 7,5
	50 mM Tris
	150 mM Natriumchlorid
Lysozym Lsg.:	10 mg/mL Lysozym

Das Bakteriensediment wurde in einem Viertel des vorherigen Volumens im Puffer Ä1 resuspendiert. Zum Aufschluss wurden 0,1 mg/mL Endkonzentration Lysozym hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten 3 Intervalle je 10 sec. im Ultraschallbad zum endgültigen Bakterienaufschluss. Das resultierende Zelllysat wurde durch Zentrifugation bei 18000 rpm für 30 min im *SS-34 Rotor* von dem unlöslichen Proteinsediment getrennt.

3.2.4.2 Durchflußhomogenisator-Aufschluss

Der Durchflußhomogenisator wurde zum Aufschluss großer Expressionsansätze von bis zu 10 L verwendet. Das Bakteriensediment der Proteinexpression wurde in einem Viertel des vorherigen Volumens im jeweiligen Puffer resuspendiert und mit einer Tablette pro 30 mL Puffer, *Protease Inhibitor Complete* bzw. EDTA frei (Roche), versetzt. Zum initialen Kühlen wurde 4°C kaltes Wasser durch den Homogenisator gepumpt. Der Homogenisator wurde aus der N₂ Hausleitung gespeist und hatte einen Eingangsdruck von 200 psi, welcher sich in der Homogenisatorkammer auf 10000-15000 psi erhöht. Die Zellsuspension wurde in die Vorlagenkammer gegeben, und durch Betätigung des Durchgangsventils durch den Homogenisator gepumpt. Dieser Vorgang wurde 2 bis 3 mal wiederholt. Die Suspension wurde bei 18000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend aus dem Überstand das gewünschte Protein gereinigt.

3.2.4.3 French Press-Aufschluss

Für mittlere Expressionsansätze bis zu 4 L ist die French-Press ein ideales Aufschlussgerät. Dafür wurden die pelletierten Zellen im jeweiligen Puffer inkl. einer Tablette *Protease Inhibitor Complete* bzw. EDTA frei (Roche) resuspendiert und in den eisgekühlten Zylinder der French-Press gegeben, der maximal 30 mL fassen kann. Zuvor wurden alle Teile der

French-Press die mit der Zellsuspension in Berührung kommen auf Eis vorgekühlt. Der Stempel wurde langsam bei einem maximalen Druck von 1500 psi nach unten bewegt, wo die Zellen auf einen Zapfen treffen und dort durch Scherkräfte zerplatzen. Durch ein Ventil wurden die aufgeschlossenen Zellen abgeführt und in einem 50 mL Gefäß auf Eis gelagert. Dieser Vorgang wurde 5 bis 7 mal wiederholt. Die Suspension wurde bei 18000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und aus dem Überstand konnte anschließend durch Affinitätschromatographie das jeweilige Protein gereinigt werden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA-Isolierung

3.3.1.1 Mini-Plasmid-Präparation

P1-Puffer pH 8,0
 50 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA
 100 Mg/mL RNase A

P2-Puffer 200 mM Natriumhydroxid
 1 % (w/v) SDS

N3-Puffer pH 5,5
 3 M Kaliumacetat

PE-Puffer pH 6,5
 1,0 M NaCl
 50 mM MOPS
 15 % (v/v) Ethanol

EB-Puffer pH 8,5
 10 mM Tris

Zur heterologen Proteinexpressionen wurden Plasmide verwendet. Im Folgenden ist die dazu notwendige Plasmidisolierung beschrieben. Es wurden 5 mL Medium (LB- oder 2xYT-Medium, siehe auch 3.1.5) in einem 12 mL *Snap-Cap* mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden die Bakterien mit 3500 rpm 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das entstandene Sediment in 250 µL P1-Puffer resuspendiert. Diese 250 µL wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 250 µL P2-Puffer hinzugegeben, und 3x invertiert. Diese Reaktion wurde 4 min inkubiert und mit 350 µL N3- Puffer, nachdem 3x invertiert wurde, gestoppt. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß in einer Tischzentrifuge mit 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit über dem entstandenen weißen Pellet wurde nun in die *Qiaprep*-Säule überführt und 30 sec mit 13000 rpm zentrifugiert. Die nun gebundene DNA wurde mit 750 µL PE-Puffer überschichtet und anschließend mit 13000 rpm 30 sec nochmal zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und erneut 1 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA auf der Säule wurde nun bei Raumtemperatur getrocknet und mit 20 µL EB-Puffer 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge eluiert. Die so isolierte DNA wurde bei –20°C gelagert.

3.3.1.2 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* bzw. von Prokaryonten wurde jeweils eine ÜNK mit ausreichender optischer Dichte für 10 min und 4000 rpm zentrifugiert. Bei der Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µL Sorbitol-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 U Lyticase zugegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Spheroplasten wurden 10 min bei 300 x g zentrifugiert und in 180 µL ATL Puffer aufgenommen. Gram positive Bakterien wurden in 180 µL Lysis Puffer resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Lysis der Hefen bzw. gram positiven Bakterien wurden 20 µL Proteinase K zugegeben und unter gelegentlichem Schütteln bei 55°C für 3 h inkubiert. Nun wurde 15 sec gevortext, 200 µL Puffer AL zugegeben, gevortext und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 200 µL EtOH zugegeben, durch vortexen intensiv gemischt und auf eine DNeasy Mini Spin-Säule gegeben. Nach Zentrifugieren bei 6000 x g für 1 min wurde der Durchbruch verworfen und mit 500 µL Puffer AW1 gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min, der Durchbruch wurde wieder verworfen und überschüssiges EtOH mit 500 µL Puffer

AW2 ausgewaschen. Anschließend wurde 3 min bei 20000 x g zentrifugiert, mit 200 µL Puffer AE eluiert, für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert und der letzte Schritt wiederholt.

3.3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

PE-Puffer	pH 6,5
	1,0 M NaCl
	50 mM MOPS
	15 % (v/v) Ethanol
EB-Puffer	pH 8,5
	10 mM Tris

Hierzu wurde das Qiagen-MiniElute-Gel-Extraction-Kit verwendet. Dazu musste die zu isolierende DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten werden und nach dem Protokoll von Qiagen weiterbehandelt werden. Als erstes wurde die ausgeschnittene Bande in eine 1,5 mL Reaktionsgefäß gelegt, gewogen und mit dem dreifachen des Gewichtes an QG-Puffer aufgefüllt. Im Anschluss wurde im Thermoblock bei 54° C für 10 min inkubiert, so dass sich das Agarosegel vollständig auflöst. Da dem QG-Puffer Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt war, konnte man den pH-Wert kontrollieren und wenn erforderlich (rötlich= pH >7) mit 3 M Natriumacetat korrigieren. Isopropanol wurde im Verhältnis 1:1 zum Gelvolumen hinzugegeben und durch mehrmaliges invertieren gemischt. Die Probe wurde nun auf die Säule gegeben und 30 sec. bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und die gebundene DNA 2x mit je 750µL PE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde dazu jeweils 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun wieder luftgetrocknet und mit 10 –15µL EB- Puffer die DNA eluiert.

3.3.2 DNA-Reinigung

3.3.2.1 QIAquick PCR Purifikation Kit

PE-Puffer	pH 6,5
	1,0 M NaCl
	50 mM MOPS
	15 % (v/v) Ethanol

EB-Puffer pH 8,5
 10 mM Tris

Bei einem Ansatz, der nur ein PCR- Produkt enthielt, wurde für die Reinigung das QIAquick PCR Purifikation Kit verwendet. Dadurch wurden alle Salze, insbesondere MgCl₂, überschüssige dNTP's und die Taq- Polymerase entfernt. Die PCR-Probe wurde mit dem fünf fachen Volumen an PB- Puffer versetzt und auf eine Säule aufgetragen, die in einem 2 mL Sammelgefäß stand. Anschließend wurde für 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen, die Säule mit 750 µL PE-Puffer gewaschen und erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Auch dieser Durchbruch wurde verworfen und die Säule 1 min bei 13000 rpm trocken zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein sauberes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 20 µL EB- Puffer eluiert. Die DNA-Menge wurde bestimmt und bei -20°C gelagert.

3.3.2.2 Phenol- Extraktion

Bei der Phenolextraktion wurden Proteine und DNA durch ihre unterschiedliche Löslichkeit in Phenol bzw. Wasser voneinander getrennt. Hierzu wurde zu dem Ansatz, welcher die zu trennenden Komponenten enthielt, die gleiche Volumenmenge an TE-gepufferten Phenol zugegeben und gut gemischt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge wurden die beiden Phasen getrennt und anschließend die untere organische Phase abgenommen und verworfen. Auf die wässrige Phase wurde dieselbe Volumenmenge an 1:24 Isoamylalkohol/Chloroform gegeben, wiederum gut gemischt und wie oben beschrieben erneut zentrifugiert. Nach dem Abnehmen der unteren organischen Phase wurde nochmals für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um den Rest an organischer Phase abzunehmen. Anschließend wurde die DNA gefällt (3.3.2.3).

3.3.2.3 Ethanol und Isopropanolfällung von langen DNA Fragmenten

Um die in einer wässrigen Phase enthaltene DNA zu konzentrieren wurde das 0,7 fache Volumen Isopropanol und das 0,1 fache Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Alternativ wurde das 2,5 fache Volumen Ethanol und das 0,1 fache Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Die Fällung erfolgte für 10 min bei RT. Im Anschluss

wurde jeweils für 30 min bei 14000 rpm und 4° C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand über dem Sediment wurde abgenommen und das Sediment 2 x mit eiskaltem 70%-igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und je nach gewünschter Konzentration in 20 µL HPLC-H₂O resuspendiert.

3.3.2.4 Ethanolfällung von Oligonukleotiden

Nach diversen Reaktionen mussten die Oligonukleotide konzentriert bzw. von störenden Salzen und Fluoreszenzfarbstoffen gereinigt werden. Zunächst wurde die Reaktionslösung mit der Speedvac komplett getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in 100 µL Natriumacetat (300 mM) und 900 µL Ethanol (abs.) resuspendiert. Die Lösung wurde für 1 h bei -80°C gelagert und anschließend 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt und das entstandene Pellet nach 1 h Lufttrocknung in 100 µL H₂O wieder aufgenommen.

3.3.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Laupuffer: pH 7,5
 40 mM Tris
 1 mM EDTA

TAE-Gelpuffer : pH 7,5
 20 mM Tris
 0,5 mM EDTA

EtBr : 1 mg/mL

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Konformation getrennt. Es liegt eine Spannung von ca. 120 V längs der Laufrichtung an. Die DNA Fragmente wandern zur Anode und werden dabei durch die Agarosepolymere in ihrer Laufgeschwindigkeit beeinflusst (= Siebeffekt). Kleine/kompakte DNA-Moleküle wandern schneller als große/linearisierte DNA-Moleküle.

Es wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße 0,8-2,0 %-ige Agarosekonzentrationen verwendet. Bereits vor dem Gelgießen erfolgt die Zugabe von 0,1 µL EtBr / 1mL Agarosegel. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff ($\lambda_{Abs.} = 300$ nm, $\lambda_{Emmis.} = 595$ nm) der

in ds-DNA interkaliert und die DNA somit detektierbar macht. Die verwendeten DNA Größen- und Massenstandards sind in 3.1.8. dargestellt.

3.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Verdünner: 8,3 M Harnstoff

10 x TBE Puffer: pH 8,0
89 mM Tris
89 mM Borsäure
20 mM EDTA

SYBR-GreenII: 1:10000 in 1x TBE

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Trennung von kurzen DNA Fragmenten verwendet. Dabei ist es möglich, eine Auflösung von nur einer Base zu bekommen. Die 3 Mini-Gele wurden entsprechend der Tabelle 3.4 gegossen und bei konstanten 12 mA laufen gelassen. Die bereits gelabelte DNA konnte unmittelbar nach dem Lauf im *LAS-3000 Geldokumentationsgerät* analysiert werden. Bei ungelabelter DNA wurde das Gel zuvor für 20 min in einer SYBR-GreenII Lösung unter Schwenken inkubiert.

Tabelle 3-4: Zusammensetzung der denaturierenden Polyacrylamidgele.

DNA Fragmentgröße in bp	Acrylamid- konzentration[%]	Rotiphorese Sequenziertiegel	Verdünner	10x TBE	APS-Lsg.	TEMED
>200	4 %	1,6 mL	7,4 mL	1 mL	50 µL	5 µL
80-200	5%	2,0 mL	7,0 mL	1 mL	50 µL	5 µL
60-150	6%	2,4 mL	6,6 mL	1 mL	50 µL	5 µL
40-100	8%	3,2 mL	5,8 mL	1 mL	50 µL	5 µL
10-50	12%	4,8 mL	4,2 mL	1 mL	50 µL	5 µL
>20	20%	8,0 mL	1,0 mL	1 mL	50 µL	5 µL
<20	22,5%	9,0 mL	0 mL	1 mL	50 µL	5 µL

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde das Eppendorf Biophotometer bzw. das NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 verwendet. Die Quantifizierbarkeit von Nukleinsäuren beruht auf folgender Beziehung:

$$1,0A_{260} - \text{Einheit} = 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ dsDNA} = 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ ssDNA} = 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ RNA}$$

Das 260/280nm Verhältnis gibt den Reinheitsgrad der DNA an. Bei sauberer DNA sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Sind die Werte oberhalb oder unterhalb dieses Bereiches, liegen Verunreinigungen durch Proteine oder niedermolekularer Substanzen vor. Die zu messende Probe wurde 2:98 mit HPLC-H₂O verdünnt und jeweils in eine 100 µL Quarzküvette überführt, wobei ein Mindestvolumen von 100 µL im Eppendorf Biophotometer eingehalten wurde. Bei Messungen am NanoDrop Spectrophotometer wurde die Probe unverdünnt mit 2 µl in die Messöffnung überführt.

3.3.6 Restriktion von DNA

Die Restriktion von Plasmiden bzw. DNA-Fragmenten wurde mit dem jeweiligen Restriktionsenzym im vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Das Restriktionsenzym wurde mit 5-10 U pro µg DNA eingesetzt. Die Temperaturoptima der jeweiligen Enzyme lagen im Bereich von 20°C–60°C. Hierbei wurde folgender Standardansatz verwendet:

1 µl Restriktionsenzym 1 (10 U/µL)
1 µl Restriktionsenzym 2 (10 U/µL, nur bei Doppelrestriktion)
x µl DNA (~1µg)
2 µl 10x Puffer
2 µl BSA (evtl. da von Enzym abhängig)
y µl HPLC-H₂O
ad 20 µl

Die Inkubationszeit betrug 2 h bis über Nacht. Bei gleichzeitiger Doppelrestriktion musste darauf geachtet werden, dass der verwendeten Puffer für beide Enzyme eine maximale

Aktivität zur Folge hatte. Die Restriktion wurde mittels Agarosegelektrophorese kontrolliert.

3.3.7 Klenow-Fill-In Reaktion

Um sticky end DNA in blunt end DNA umzuwandeln, wurde die Klenow-Fill-In Reaktion verwendet. Dabei werden die überlappenden Enden durch komplementäre Basen im Gegenstrang ergänzt. Durch den Verlust der 5'-3' Exonucleaseaktivität kommt es nicht zur Hydrolyse des überhängenden Einzelstranges.

2 μ l Klenowfragment (500 U/mL)
x μ l DNA (~8 μ g)
3 μ l 10x DNA-Pol1 Puffer
1 μ l dNTP's (jedes 1mM))
y μ l HPLC-H₂O
ad 30 μ L

Die Reaktion wurde 15 min bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Kleowfragments mit 20 min bei 75°C gestoppt.

3.3.8 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Ligation von zwei DNA Fragmenten mit blunt ends kommt es häufig zu Religationen. Um die Religation von Plasmiden zu verhindern, werden diese am 5'- Ende der DNA dephosphoriliert.

1,5 μ l Alkalische Phosphatase (10000 U/mL)
x μ l DNA (~8 μ g)
3 μ l 10x DNA-Pol1 Puffer
y μ l HPLC-H₂O
ad 30 μ l

Die Reaktion wurde für 60 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert.

3.3.9 Ligation von Plasmid DNA

Bei der Ligation sollen DNA Fragmente in gewünschter Reihenfolge zusammengefügt werden. Die einzelnen Fragmente hatten jeweils einen der beiden Doppelstränge überlappend und komplementär zum überlappenden Einzelstrang des anderen Fragmentes (= *sticky ends*). Hierzu wurden die Fragmente im molaren Verhältnis 1:4 (Vektor:Fragment) gemischt und in folgenden Ansatz eingesetzt:

100 ng Vektor
25 ng Fragment
1,5 μ L 10x Ligasepuffer (NEB)
1 μ L T4-DNA-Ligase (400000 U/mL)
x μ L HPLC-H₂O
ad 15 μ L

Die Ligation wurde für 1h bei RT oder über Nacht bei 16°C im Thermomixer inkubiert. Die ligierte DNA wurde im Anschluss direkt in die Bakterien transformiert.

3.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht eine exponentielle Amplifikation von definierten DNA-Bereichen. Das Prinzip der PCR beruht auf einer enzymatischen Duplikation der DNA-Sequenz unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden, den sog. Primern.

Die Annealingtemperatur der Primer lässt sich nach einer empirischen Tabelle bestimmen, welche im Anhang zu finden ist. Diese Tabelle berücksichtigt, dass zwischen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrücken und zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Man zählt dazu die jeweilige Gesamtzahl der Nukleotide und G und C Basen im Primer ohne Berücksichtigung der Überhänge, und erhält anhand der Tabelle 7-1 die richtige Annealingtemperatur. Die PCR wurde standardmäßig mit vier verschiedenen DNA Templatkonzentrationen durchgeführt um den Erhalt des PCR Produktes sicherzustellen.

Mastermix Ansatz für vier Reaktionen:

10 μ L	10x Puffer(<i>Pfx</i>)
2 μ L	MgSO ₄ (50 mM)
4 μ L	dNTP's (10 mM, jedes)

4 μ L Primer sense (10 pmol/ μ L)
 4 μ L Primer antisense (10 pmol/ μ L)
2 μ L AccuPrimerPfx (15 U/ μ L)
 = 26 μ L

4 verschiedene DNA Konzentrationen von 2 ng bis 50 ng

x μ L DNA-Template
 y μ L HPLC-H₂O
 ad 18,5 μ L

PCR- Programm:

1. 96°C 1:30 min
2. 94°C 0:10 min
3. T_m -4°C 0:15 min
-0,2°C pro Zyklus
4. 68°C 1:00 min
5. Goto 2 10x
6. 96°C 0:10 min
7. T_m -1°C 0:15 min
8. 68°C 1:00 min
9. Goto 6 30x
10. 68°C 5:0 min
11. Hold 4°C

3.3.10.1 Bakterien-PCR

Zum Screening von positiven Klonen wurde eine Bakterien PCR durchgeführt. Dazu wurden die Klone von einer Platte gepickt oder 2 μ L einer Flüssigkultur in einem 0,5 μ L Reaktionsgefäß in 15 μ L HPLC-H₂O aufgenommen und 5 min bei 96° C denaturiert, um alle DNAsen und Zellwände zu zerstören. Zu diesem Gemisch wurde jeweils 7 μ L des folgenden Ansatzes hinzupipettiert. Bei der Verwendung des RT-PCR Gerätes wurden zusätzlich 1 μ l SYBR-GreenII hinzugegeben, um so bereits während der PCR die positiven Klone zu identifizieren.

Ansatz für 10 Reaktionen:	20 µL 10x Puffer	(inkl. MgCl ₂)
	4 µL dNTP's	(10 mM, jedes)
	5 µL Primer sense	(10 pmol/µL)
	5 µL Primer antisense	(10 pmol/µL)
	2 µL Taq	(15 U/µL)
	<u>34 µL HPLC-H₂O</u>	
	= 70 µL	

PCR- Programm:	1.	96° C	1:30 min
	2.	94° C	0:10 min
	3.	62° C	0:15 min
		-0,5° C	pro Zyklus
	4.	72° C	1:00 min
	5.	Goto 2	29x
	6.	96° C	0:10 min
	7.	52° C	0:15 min
	8.	72° C	1:00 min
	9.	Goto 6	24x
	10.	End	

3.3.11 Ortsspezifische Mutagenese

Mithilfe der ortspezifischen Mutagense können bis zu drei Basen einer dsDNA beliebig ausgetauscht werden. Dieser Methode bedient man sich, um gerichtet Aminosäuren auszutauchen, Stopcodons zu entfernen oder eine spontane Mutationen wieder rückgängig zu machen. Dazu sind mehrere Schritte notwenig:

1. PCR

Für diese PCR wurden Primer verwendet, die auf beiden Seiten der Punktmutation eine Länge von ca. 15 Basen haben um den Mismatch zu stabilisieren. Folgender Ansatz und PCR Programm wurden verwendet:

5,0 µL	10x Puffer	1.	95°C 2 min
x µL	DNA (5-50 ng)	2.	95°C 30 sec

2,0 μ L	Primer 5'(10 pmol/ μ L)	3.	56°C	30 sec
2,0 μ L	Primer 3'(10 pmol/ μ L)	4.	72°C	x min (1kbp/min)
0,5 μ L	Pfu Turbo (2,5 U/mL)	5.	GOTO 2	Repeat 20
1,0 μ L	dNTP (10 mM, jedes)			
x μ L	<u>ddH₂O</u>			
	ad 50 μ L			

2. Restriktionsverdau mit *DpnI*

Das Restriktionsenzym *DpnI* schneidet ausschließlich DNA an denen A in der Erkennungssequenz methyliert ist. Es wird also ausschließlich das parentale DNA Fragment, welches in der PCR als Templat diente, verdaut und somit nicht mehr transformierbar gemacht. Die Reaktion wurde mit 20 U *DpnI* für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3. Transformation

Nun wurden 2 μ L des Reaktionsansatzes in XL10 Gold ultracompetent transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm besitzt die Fähigkeit lineare DNA in zirkuläre umzuwandeln. Aus den gewachsenen Kolonien wurde eine Übernachtkultur angeimpft und daraus die DNA isoliert.

3.3.11 Gateway Technologie

Die Gateway-Technologie beruht auf dem Prinzip der natürlichen Amplifikation des λ -Phagen in *E. coli*. Im lytischen Zyklus wird die Phagen-DNA vermehrt und in neue Phagen verpackt, während im lysogenen Zyklus die DNA als „stille DNA“ in das Chromosom integriert wird. Dieses geschieht mit Hilfe der Phagen Enzyme Integrase (Int), der Excisionase (Xis) und dem Protein IHF (= integration host factor) aus *E. coli*.

Im lysogenen Zyklus integriert der λ -Phage über Attachment-Sites, *attP* auf der DNA des Phagen und *attB* auf dem Genom von *E. coli*, λ -Phagen DNA Fragmente in das *E. coli* Genom. Nach der Integration (= lysogener Zyklus) enthält das *E. coli* Genom Phagen DNA, die durch die Attachment-Sites *attL* und *attR* flankiert wird. Diese sind aus den Attachment-Sites *attB* und *attP* entstanden^[223]. Der Austauch wird durch die Enzyme Integrase und dem Protein IHF katalysiert.

Um den lytischen Zyklus zu starten, wird die λ -Phagen DNA mit Hilfe des Enzyms Excisionase aus dem *E. coli* Genom freigesetzt. Hierbei wirken wiederum Integrase und IHF mit, um die Bildung von *attL*- und *attR*-sites umzukehren und um somit wieder *attP* flankierte λ -Phagen DNA herzustellen.

Amplifiziert man nun ein DNA-Fragment durch PCR unter Verwendung von Primern, welche die Attachment-Sites *attB* enthalten, lässt sich dieses PCR Produkt nun durch die Gateway-Technologie über die BP-Reaktion (stammt vom lysogenen Zyklus) in einen Entryvektor bzw. durch die LR-Reaktion (stammt vom lytischen Zyklus) in einen Expressionsvektor klonieren. Der Vorteil einer 2 stufigen Reaktion ist, dass sobald ein Entry-Klon nach der BP-Reaktion existiert, man diesen in alle erhältlichen Expressionsvektoren durch nur einen Schritt klonieren kann. Es sind also keine weiteren Sequenzierungen, Ligation oder Restriktionen notwendig. So ist z.B. ein Wechsel des Expressionssystem von Prokaryonten zu Eukaryonten schnell und einfach möglich.

3.3.11.1 BP-Reaktion

Das durch PCR amplifizierte DNA-Produkt wird mittels der BP-Reaktion in einen Donor-Vektor (pDONR201) integriert. Auf dem Plasmid ist das *ccdB* Gen, welches ein DNA-Gyrase-Inhibitor kodiert, von den Attachment-Sites *attP* umrahmt. Das amplifizierte PCR Produkt ist durch die Attachment-Sites *attB* flankiert. Diese Attachment sites werden von dem λ -Phagen Enzym Integrase und dem Integration Host Factor (IHF) genutzt, um das zwischen den *attB*-sites liegende PCR- Fragment mit dem zwischen den *attP*-sites liegende *ccdB* Gen auszutauschen. Bei dem Austausch der beiden Fragmente wird jeweils ein Teil dieser Erkennungssequenzen, welcher direkt an den Fragmenten gebunden sind, mitgenommen. Als Resultat entsteht ein Entry-Klon mit dem gewünschten DNA-Fragment, flankiert durch die Attachment-Sites *attL* und ein *by*-Produkt (= Nebenprodukt), welches das *ccdB*-Gen enthält, flankiert durch die Attachment-Sites *attR*.



Abbildung 3-1: BP-Reaktion zur Herstellung eines Entry-Klones (Invitrogen, Online-Katalog 2006).

Die Reaktion wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt:

x μ L PCR-Produkt (15- 150ng) mit *attB*-Sites
 1 μ L pDONR 201 (150 ng/ μ L)
 ad 8 μ L TE-Puffer

Die bei -80° C gelagerte *BP-ClonaseII* wurde auf Eis 2 min aufgetaut, 2 x gevortext und 2 μ L in das 1,5 mL Reaktionsgefäß hinzugegeben. Die Reaktion wurde ü.N. bei 25° C im Thermomixer inkubiert. Am darauf folgenden Morgen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 μ L Proteinase K mit 10 min bei 37° C abgestoppt.

Im Anschluss wurden jeweils 4 μ L des Reaktionsansatzes in 50 μ L *E. coli* DH5 α elektrotransformiert bzw. 2 μ L in TOP10 durch Hitzetransformation. Die Selektion nach einer Transformation beruht auf den Prinzipien, dass erstens nur die Transformaten, die eine Kanamycinresistenz aufweisen und zweitens kein DNA-Gyrase-Inhibitor translatieren, auf kanamycinhaltigem Nährboden wachsen. Die isolierten Plasmide wurden nun in der unter 3.3.11.2 beschriebenen LR-Reaktion eingesetzt.

3.3.11.2 LR-Reaktion

Bei dem zweiten Reaktionsschritt des Gateway-Systems wurde das DNA-Fragment, welches zwischen den Attachment-Sites *attL* im Entry-Vektor sitzt, in einen Destinations Vektor kloniert. Diese Vektoren enthalten ebenfalls das *ccdB* Gen für die DNA-Gyrase-Inhibition, welches hier wiederum durch die Attachment-Sites *attR* flankiert wird. Das Enzym Excisionase setzt zuerst die *attR* und *attP* Sites flankierenden DNA Fragmente frei, welche im Anschluss durch die umgekehrte Katalyse von Integrase und dem Integration Host Factor ausgetaucht werden. Es kommt also zu einem Wechsel der Fragmente zwischen dem Entry-Vektor und dem Destination-Vektor. Das Ergebnis der Reaktion ist ein Expressions-Klon, welcher das ursprüngliche PCR-Produkt mit seinen ursprünglichen Attachment-Sites *attB* enthält, sowie ein *by-Produkt*, bestehend aus dem *ccdB* Gen, eingerahmt von den Attachment-Sites *attP*. Dieser neu entstandene Vektor wird als pExp bezeichnet (Abb. 3-2).

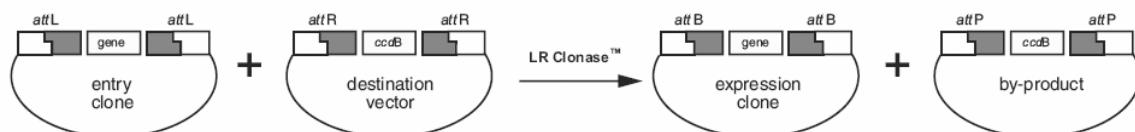


Abbildung 3-2: LR-Reaktion zur Herstellung eines Expressions-Klones (Invitrogen, Online-Katalog 2006).

Die Reaktion wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt:

x μ L pENTR x (50-150ng)
1 μ L pDEST x (150 ng/ μ L)
ad 8 μ L TE-Puffer

Der *LR-ClonaseII-Mix* aus dem -80°C Gefrierschrank wurden auf Eis 2 min aufgetaut, 2 x gevortext und 2 μ L des Enzymmix in das 1,5 mL Reagiergefäß hinzugegeben. Die Reaktion wurde ü.N. bei 25°C im Thermomixer inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 μ L Proteinase K mit 10 min bei 37°C abgestoppt. Anschließend wurden 4 μ L des Reaktionsansatzes in 50 μ L *E. coli* DH5 α transformiert. Die Selektion nach einer Transformation beruht auf den Prinzipien, dass erstens nur die Transformaten, die eine Ampicillinresistenz aufweisen, und zweitens kein DNA-Gyrase-Inhibitor translatierten auf ampicillinhaltigem Nährboden wachsen. Die isolierten Plasmide wurden nun in verschiedenen Expressions Stämme transformiert, um den Stamm mit der höchsten Proteinexpressionrate zu bestimmen.

3.3.12.3 Herstellung von neuen Destinations Plasmiden

Durch Integration der Gatewaykassette an der Stelle der MCS lässt sich jedes Plasmid in einen Destination Vektor umwandeln. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Plasmid nicht ausschließlich eine Kanamycinresistenz kodiert, da ansonsten keine positive Selektion durchgeführt werden kann. Zuerst muss das gewünschte Plasmid linearisiert werden und mit *blunt ends* versehen werden. Dieses wurde durch die weiter oben beschriebenen Techniken erreicht. Um im Leserahmen des jeweiligen Plasmides zu bleiben, musste die Gatewaykassette dementsprechend durch eine PCR amplifiziert werden. Im Anschluss wurde das PCR Produkt in den Vektor ligiert und in DB3.1 Zellen transformiert. Es wurde also auf das Vorhandensein der Gatewaykassette selektiert. Die DB3.1 Zellen mussten verwendet werden, da dieser *E. coli* Substamm einen Inhibitor für den DNA Gyrase Inhibitor enthält, welcher von dem *ccdB*-Gen kodiert wird. Auf der Gatewaykassette ist ebenfalls das Gen für Chloramphenicol Acetyltransferase kodiert, welches eine sichere Amplifikation des Vektors in DB3.1 *E. coli* Zellen ermöglicht. Die gewachsenen Kolonien wurden amplifiziert und eine Plasmidpräparation durchgeführt. In der nächsten Stufe wurden diese Plasmide in TOP10

transformiert. Diese Zellen mussten sterben, da das *ccdB*-Gen zur negativ Selektion verwendet wurde. Im Anschluss wurden die Plasmide zum Sequenzieren gesendet.

3.3.13 TOPO-Technologie

TOPO-Vektorlösungen enthalten linearisierten Vektor mit 3'-GTGG-Überhängen, die komplementär zu den von der DNA-Polymerasen erzeugten PCR Produkten mit 5'-CACC sind. Die Ligation wird von einer mit der Vektorenden assoziierten Topoisomerase vermittelt bzw. katalysiert. Zuerst bindet das PCR Produkt am komplementären Fragment des Vektors, und wird durch die Topoisomerase in den Vektor ligiert. Dabei löst sich die Topoisomerase und das überhängende Fragment des Vektors ab (Abbildung 3-3). Die Reaktion dauert 5 min und ist ebenfalls in Kombination mit dem Gatewaysystem zu verwenden, wenn der TOPO Vektor die entsprechenden *att* Sites enthält.

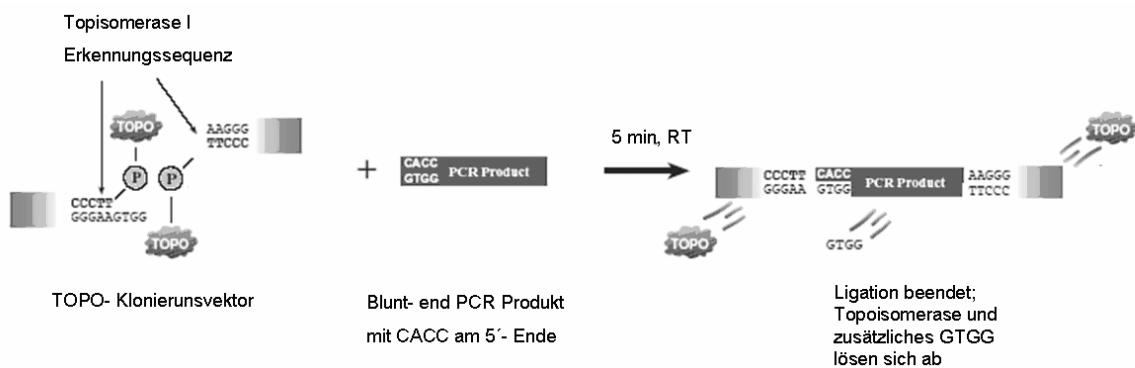


Abbildung 3-3: TOPO Reaktion zur Herstellung von Expressionsvektoren oder „entry“ Vektoren.

Die Reaktion wurde in einem 1,5 mL Reagiergefäß durchgeführt:

$x \mu\text{L}$ PCR-Produkt (2- 10 ng) mit CACC-Sites
 $1 \mu\text{L}$ pTOPO x (20 ng/ μL)
 $1 \mu\text{L}$ Topo-Salzlösung
 ad $6 \mu\text{L}$ ddH₂O

Die Topoisomerase aus dem -20°C Gefrierschrank wurde in das 1,5 mL Reaktionsgefäß hinzugegeben und die Reaktion wurde 5 min bei 25°C im Thermomixer inkubiert. Die DNA konnte unmittelbar in die entsprechenden *E. coli* Zellen transformiert werden.

3.3.14 M13-Phagenmethoden

3.3.14.1 M13-Phagenamplifikation in *E. coli*

PEG/NaCl: 20 % (w/v) Polyethylenglykol 6000
 2,5 M NaCl

SM-Puffer: pH 7,5
 1 % (w/v) Glukose
 100 mM NaCl
 35 mM Tris
 10 mM Magnesiumsulfat

Um den M13-Phagen zu amplifizieren, wurde mit einer bereits infizierten TB-1 Kultur angeimpft (OD: 0,01). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 30°C und 70 rpm auf einem Schüttler. Am darauffolgenden Morgen wurden jeweils 200 mL Bakteriensuspension in einen Zentrifugenbecher überführt und bei 4000 rpm für 10 min im *SL3000*-Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde abgezogen und mit 20% (v/v) PEG/NaCl versetzt. Die neuen Zentrifugenbecher wurden nun für mindestens 2 h auf Eis gelagert, um die Phagen aus dem Überstand zu fällen. Es folgte eine zweite Zentrifugation für 30 min bei 10800 x g im *SLA3000*-Rotor. Der Überstand wurde wieder entfernt, und das entstandene weiße Sediment getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 2 mL SM-Puffer resuspendiert und im Anschluss der Phagentiter bestimmt.

3.3.14.2 Bestimmung des Phagentitors/ Gesamtphagenzahl

Von der Phagenlösung wurden Verdünnungen von 10^{-4} - 10^{-10} mit SM-Puffer hergestellt. Parallel dazu wurde 1 L 2xYT -Medium mit dem *E. coli* Stamm TB-1 angeimpft. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die OD nicht größer als 0,02 war, da ansonsten TB-1 weniger F-Pili ausbildet. Die Bakteriensuspension wurde in 5 mL Portionen auf *Snap-Caps* verteilt und mit 400 μ L Phagenprobe versetzt. Es folgte die eigentliche Infektion, bei der die Proben für 30 min stehend bei 37°C inkubieren. Im Anschluss an die Infektion wurden 100 μ L der Bakteriensuspension auf 2xYT-Kan Platten ausplattiert und bei 37°C für 16 h im

Brutraum gelagert. Die entstandenen Kolonien entsprachen einem infektiösen Phagen. Der Phagentiter und die Gesamtphagenzahl wurden dann nach folgenden Formeln berechnet:

gezählte Phagen x 50 x eingesetzter Verdünnung x 1,5= Phagen (pfu / ml)

Phagen/ml x Probenvolumen = Gesamtphagenzahl (pfu)

3.3.14.3 M13-ssDNA Isolierung

TE-Puffer:	pH 8,0
	100 mM Tris
	10 mM EDTA

Um die M13-Phagen ssDNA zu isolieren, wurden zuerst 5 mL einer logarithmisch wachsenden JM101 *E. coli* Kultur (OD₆₀₀: 0,1) mit 10 x 10¹¹ pfu M13 Phagen für 10 min bei RT ohne Schütteln infiziert. Diese infizierte *E. coli* Kultur wurde auf 500 mL mit LB Medium (+ 5 mM MgCl₂) verdünnt. Im Anschluss wurde die Kultur bei 37°C für 5 h weiterinkubiert. Die Zellsuspension wurde im SLA3000 Rotor für 15 min mit 4000 xg bei 4°C zentrifugiert. Die 500 ml Überstand wurden im Becherglas auf einem Magnetrührer unter Rühren mit 16 g PEG (6000) und 12 g NaCl₂ versetzt. Die Suspension wurde für weitere 60 min gerührt und im Anschluss bei 10000 xg für 20 min und 4°C im SLA3000 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Papiertücher gut getrocknet und im Anschluss in 16 mL 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Zu dieser Lösung wurde ein äquimolares Volumen an Tris gepuffertem Phenol gegeben und für 2 min gevortext. Hierdurch wurde die ssDNA von den Phagenhüllproteinen getrennt. Die ssDNA Reinigung wurde durch Zentrifugation der gesamten Lösung für 10 min bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge fortgeführt. Die Extraktion wurde durch Zugabe von 16 mL Phenol/Chloroform (50:50) zur wässrigen Phase abgeschlossen. Die 16 mL wässrige Lösung wurden auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und je 0,8 mL Natriumacetat (3 M, pH5,2) und 11 mL Ethanol zugegeben. Die Suspension wurde im Anschluss für 15 min bei RT inkubiert und schließlich bei 12000 xg für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde luftgetrocknet, in 1 mL TE Puffer aufgenommen und bei - 20°C gelagert.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS- Auftragspuffer : pH 6,8
62,5 mM Tris
4 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
20 % (w/v) Glycerin
5 % (w/v) β -Mercaptoethanol

Rotiphorese 30: 30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bisacrylamid

Trenngelpuffer: pH 8,8
3,0 M Tris

Sammelgelpuffer: pH 6,8
0,5 M Tris

10x SDS Laufpuffer : 0,25 M Tris
1,92 M Glycin
1 % (w/v) SDS

APS-Lösung: 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

SDS- Lösung: 10 % (w/v) SDS

Färbelösung: 0,25% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R250
9,20 % (v/v) Essigsäure
45,40% (v/v) Ethanol

Entfärbelösung: 20,00% (v/v) Ethanol
10,00% (v/v) Essigsäure

Bei der Probenvorbereitung wurde die Probe mit SDS-Auftragspuffer im Verhältnis 4:1 gemischt, so dass ein Massenverhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein vorlag. Die Probe wurde mit 13000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert, und anschließend für 5 min auf 100° C erhitzt, um Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle lösen zu können. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden standardmäßig durch die Zugabe von reduzierendem β -Mercaptoethanol aufgespalten. Die Gelzusammensetzung wurde, je nach gewünschtem Trennbereich, anhand der Tabelle 3.5 bestimmt. Dieses Trengel wurde umgehend mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Kante zu erhalten. Nachdem das Trengel polymersiert war, wurde das Sammelgel bis an den obersten Rand der Glasplatten gefüllt und der Taschenformer eingeschoben. Die auspolymerisierten Gele wurden entweder bei 4°C in feuchten Tüchern gelagert oder umgehend verwendet. Dazu wurden 20 μ L der jeweiligen Probe mit einer Hamiltonspritze in die Taschen gespritzt. Als Proteinstandard wurde, je nach weiterer Verarbeitung, die unter 3.1.8 gezeigten Standards verwendet. Von dem Proteinstandard wurde jeweils 8 μ L aufgetragen. Der Gellauf fand im 1x Laupuffer statt. Zum Einlaufen in das Sammelgel wurde eine Spannung von 110 V angelegt. Nach dem Eintritt in das Trengel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Im Anschluss wurden die Gele direkt mit Coomassie gefärbt oder zum Western blotten weiterverwendet.

Tabelle 3-5: Trenngele

Acrylamid-konzentration [%]	H ₂ O	Rotiphorese 30	Trenngelpuffer	SDS-Lsg.	APS-Lsg.	TEMED
10%	4,8 mL	4 mL	3 mL	120 μ L	50 μ L	5 μ L
12,50%	3,8 mL	5 mL	3 mL	120 μ L	50 μ L	5 μ L
15%	2,8 mL	6 mL	3 mL	120 μ L	50 μ L	5 μ L

Tabelle 3-6: Sammelgel

Acrylamid-konzentration [%]	H ₂ O	Rotiphorese 30	Sammelgelpuffer	SDS-Lsg.	APS-Lsg.	TEMED
3,75%	2,45 mL	0,5 mL	1 mL	40 μ L	20 μ L	4 μ L

3.4.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose Membranen

3.4.3.1 Western-Blot-Analyse nach Khyse-Anderson (1984)

Kathodenpuffer: 25 mM Tris
 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
 0,1% (w/v) SDS
 20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer I: 300 mM Tris
 20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II: 25 mM Tris
 20% (v/v) Methanol

Ponceau S-Lösung: 0,02% (w/v) Ponceau S
 2% (v/v) Trichloressigsäure

Die durch die SDS-Gelelektrophorese getrennten Proteinen wurden über ein elektrisches Feld im Semi-Dry-Verfahren auf eine Membran (Nitrozellulose) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion fixiert.

Dazu wurden sieben Whatman Papiere (3 mm stark), ebenso wie eine Nitrozellulosemembran, auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Drei Whatmanpapiere wurden im Kathodenpuffer, jeweils zwei im Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde im Anodenpuffer II befeuchtet. Nach der Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel mit destilliertem H_2O abgespült und dann zwischen Membran und den Whatmanpapieren positioniert. Die Whatmanpapiere wurden zuvor durch Abstreifen an der Gefäßkante von überschüssigem Puffer befreit.

Der Proteintransfer erfolgte bei einer der Gelgröße angepassten Stromstärke von $2,5 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche. Die Blotdauer betrug 1 h. Die Spannung durfte während des Blottens nicht über 25 V steigen, da es sonst zu einer starken Wärmeentwicklung kommt. Um den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu kontrollieren, wurde eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Farbstoff, mit dem man Proteine reversibel anfärben kann.

3.4.3.2 Dot-Immunoassay

Der Dot-Immunoassay ist eine Methode, mit der sich Proteinmengen bis zu 20 ng detektieren lassen. Der Dot-Blot kann sowohl zur quantitativen als auch zur qualitativen Analyse eingesetzt werden. Der Assay wurde dazu verwendet, die Fraktionen der Säulenchromatographie mit den gewünschten Proteinen zu identifizieren. Dabei wurden 5 µl der jeweiligen Probe auf eine Nitrozellulosemembran, welche auf einem Whatmanpapier lag, übertragen und dann mit der jeweiligen Kombination aus Erstantikörper bzw. Zweitantikörper nachgewiesen.

3.4.4 Immunchemische Färbung für Proteine auf Nitrocellulose- Membranen

TBST-Blotto: 1x TBST-Puffer
5,0% (w/v) Magermilchpulver

PBS- Blotto: 1x PBS-Puffer
3.0% (w/v) BSA

AP-Puffer: pH 9,5
100 mM Tris
100 mM Natriumchlorid
5 mM Magnesiumchlorid

Stop- Puffer: pH 8,0
200 mM Tris
5 mM EDTA

NBT- Lösung: 5 ,00% (w/v) NBT
70,00% (v/v) DMF

BCIP- Lösung: 5,00 % (w/v) BCIP
100 % (v/v) DMF

Das auf der Membran immobilisierte Protein wird mittels einer indirekten Nachweismethode visualisiert, bei der ein proteinspezifischer Antikörper an das Protein bindet. Dieser Antikörper fungiert als Antigen für einen Sekundärantikörper, der mit Alkalischer

Phosphatase gelabelt ist. Diese Markierung dient der Sichtbarmachung der Antikörperbindung durch ein präzipitierendes Produkt der enzymatischen Substratumsetzung. Vorteil dieser indirekten Markierung ist eine Sensitivitätssteigerung, da der zweite Antikörper eine Amplifikation um das etwa 20-100 fache bedeutet.

Die geblottete Membran wurde zunächst 3x 5 min in 1xTBST gewaschen. Danach folgte das Blocken der Membran für 30 min mit TBST- Blotto oder PBS- Blotto, um freie Stellen auf der Membran abzusättigen. Die Blocksubstanzen wurden durch 2x waschen für je 5 min in 1xTBST abgewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers für 2 h. Der Blot wurde nun erneut 3x für 5 min in 1x TBST gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers für 1h. Anschließend wurde 3x für 5 min mit TBST gewaschen. Der Blot wurde nun für 10 min im AP-Puffer auf den für die Alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 eingestellt. Die Substratlösung wurde in der Zwischenzeit angesetzt, indem man zu 25 mL AP- Puffer 75 µL BCIP-Lösung und 125 µL NBT-Lösung hinzupipettiert. Die Membran wurde nun bis zum Sichtbarwerden der Banden in der Substratlösung inkubiert und im Anschluss mit dem Stop-Puffer die enzymatische Reaktion beendet. Der Blot wurde getrocknet und in eine Folie eingeschweißt.

Kombination A:

Primärantikörper: Anti-StrepTagII (1:5000)
Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG-AP (1:5000)

Kombination B:

Primärantikörper: Anti-His₆Tag (1:800)
Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG-AP (1:5000)

3.4.5 Proteinquantifizierung

1. Warburg-Formel

Proteine werden mittels Absorptionsmessung quantifiziert, da die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin alle Absorptionsmaxima in der Nähe von 280 nm aufweisen. Bei einer statistisch ermittelten Anzahl von aromatischen Aminosäuren in Proteinen gilt, dass 1 Absorptionseinheit bei 280 nm einer Konzentration von 1 mg/mL Protein entspricht. Ist die AS-Sequenz bekannt kann man durch die Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor die exakte Proteinkonzentration des gereinigten Proteins bestimmen. Um die Absorption eventuell vorhandener Nukleinsäuren und Nukleotiden zu berücksichtigen gilt folgende Formel:

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

Das Spektrometer wurde mit dem Puffer kalibriert, indem die Proteine vorlagen. Der jeweilige Ansatz wurde gegen diese Referenz gemessen.

2. Bradford-Test

Bradfordlösung:

0,01% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue G 250
5,0% (v/v)	Ethanol
10,0% (v/v)	H_3PO_4 (85%-ig)

Der Bradford-Test^[18] basiert auf der Tatsache, dass das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blau von 465 nm auf 595 nm verschoben wird, wenn es an anionische Gruppen des Proteins bindet. Die Sensitivität reicht von 0,1 mg/mL bis 30 mg/mL Protein pro mL. 100 μ L Bradford-Reagenz wurden mit 20 μ L Proteinlösung versetzt und bei RT 1-5 min inkubiert.

3.4.7 Proteinreinigung

3.4.7.1 His₆-Affinitätschromatographie

Säule	NTA Superflow
Säulenvolumen (CV)	5 mL
Probenauftragsvolumen	5-50 mL
Aktive Gruppen	Nickel-NTA

Der Histidin Linker ist ein weit verbreiteter Tag bei rekombinanten Proteinen, da er eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber dem nativen Protein aufweist. Die Eigenschaft des Histidins werden sich bei der Immobilisierten – Metallionen – Affinitäts - Chromatographie (IMAC) zunutze gemacht. Bei diesem Verfahren werden an einer Sepharose- oder Agarosematrix eine metallchelatierende Gruppe wie Nitritotriessigsäure (= NTA) immobilisiert. Dieser Ligand besitzt 4 komplexierende Stellen, die eine stabile Interaktion mit zweifach positiv geladenen Metallkationen, wie z.B. Ni^{2+} eingehen kann. Da Nickel jedoch 6 Koordinationsstellen aufweist, sind 2 Stellen für die Bindung des Imidazolringes des Histidins frei. Die Elution der über die Ni-NTA Säule gereinigten Proteine erfolgt mit Hilfe von freiem Imidazol, welches kompetitiv um die Bindungsstellen des Ni^{2+} konkurriert und das Histidin verdrängt.

Zur Protein Reinigung wurde standardmäßig eine FPLC-Anlage (GE- Healthcare, München) verwendet. Die jeweiligen Puffersysteme der gereinigen Proteine sind im Ergebnisteil beschrieben. Im jeweiligen Auftragspuffer waren bereits 10 mM Imidazol vorhanden, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Abhängig von der benötigten Proteinmenge wurden 5 – 50 mL Zellextrakt mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule gepumpt. Nach dem Auftragen wurde so lange mit Puffer A nachgespült, bis die UV Absorption bei 280 nm wieder die Baseline erreichte. Danach wurde mit einem linearen Gradienten mit Puffer B das Protein von der Säule eluiert. Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen wurden mit Bradfordlösung getestet. Hierzu wurden zu 20 μL der Fraktionen 100 μL Bradfordlösung gegeben. Alle positiven Fraktionen wurden mittels einer SDS-Gelelektrophorese (3.4.1) auf ihre Reinheit überprüft.

3.4.7.1 Strep-tagII-Affinitätschromatographie

Säule	Strep-Tactin Superflow
Säulenvolumen (CV)	5 mL
Probenauftragsvolumen	5-50 mL
Aktive Gruppen	Strep-Tactin

Der Strep-tagII (IBA, Göttingen) hat im Vergleich zum bereits beschriebenen His₆-tag den Vorteil, dass die Bindungsaffinität selektiver, und somit die Proteinisolierung besser ist. Zusätzlich ist die Elutionskurve des Proteins nicht mit im Puffer B enthaltenes Imidazol überlagert und die Zuordnung der Proteinelution leichter. Das Prinzip dieser Affinitätschromatographie beruht auf der Interaktion des Strep-tagII mit Streptavidin, das auf einer Säulenmatrix immobilisiert ist. Nachdem ungebundene Proteine ausgewaschen worden sind, kann der Strep-tagII durch Konkurrenz mit freiem Desthiobiotin kompetitiv gelöst werden. Die löslichen Proteine wurden über einen *Superloop* auf die Streptavidin-Säule aufgetragen und mit Puffer A gewaschen. Eluiert wurde mit Puffer E entsprechend der Herstellerangaben und in 1 mL Fraktionen gesammelt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 mL/min. Um Denaturierung und Degradation der Proteine zu vermeiden, wurden alle Lösungen bei 4°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen wurden mit Bradfordlösung getestet. Hierzu wurden zu 20 µL der Fraktionen 100 µL Bradfordlösung gegeben. Die Intensität der blauen Farbe ist direkt proportional zur Proteinmenge. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch die beschriebene SDS-PAGE überprüft.

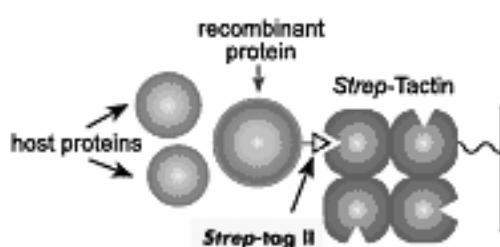


Abbildung 3-4: Interaktion des Strep-TagII rekombinannten Proteins mit Strep-Tactin der Säule.

3.4.7.2 Hitzefällung von *E. coli* Proteinen

Eine Verringerung der Gesamtproteinmenge vor der Affinitätsreinigung erhöht den Reinheitsgrad der Proteine am Ende der Affinitätsreinigung. Zur Isolierung von überexprimierten themophilen Enzymen aus *E. coli* wurde deshalb das hergestellte Zellextrakt (3.2.4) in einem Becherglas auf einem Thermomixer unter Rühren erhitzt. Da das Temperaturwachstumsoptimum von *G. stearothermophilus* bei 55°C liegt, wurde der Zellextrakt für das DinB Protein für 20 min bei 50°C inkubiert. Die Proteinlösung wurde im Anschluss mit 18000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und aus dem Überstand konnte anschließend durch Affinitätschromatographie DinB gereinigt werden

3.4.7.3 Gelpermeationschromatographie

Säule	Superdex TM 200
Säulenvolumen (CV)	120 mL
Probenauftragsvolumen	500 µL
Aktive Gruppen	Quervernetzte Agarose

Bei der Gelpermeationschromatographie sind poröse und stark hydratisierende Kugelchen aus einem Polymer wie Kohlenhydraten oder Polyacrylamid in der Säule. Beim Auftragen der Proteine können Kleinere in die Hohlräume der Kugelchen eindringen, dabei verringert sich die Laufgeschwindigkeit der kleinen Proteine. Die größeren Proteine werden als erstes von der Säule gespült, und es kommt zu einer Trennung nach Größe.

Da der Gelpermeationschromatographie Lauf ohne Kopplung der Proteine an die Säule stattfindet, sollte das Probenvolumen möglichst klein sein. Je geringer das Volumen der Probe, desto besser ist die Auflösung.

Das max. aufgetragene Probenvolumen war deshalb nicht größer als 500 µL. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,8 mL/min. Die entstandenen Fraktionen wurden durch einen Dot-Immunoassay auf die Konzentration des gereinigten Proteins überprüft. Alle Fraktionen wurden bei 4° C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die verwendeten Puffer entsprachen den jeweiligen Lagerungspuffern der Proteine, um diese dann umgehend mit flüssigen N₂ einzufrieren. Alle positiven Fraktionen wurden mittels einer SDS-Gelelektrophorese (3.4.1) auf ihre Reinheit überprüft.

3.4.8 Rekonstitution der Sporenphotoproduktlyase

Rekonstitutionspuffer: pH 8,0
50 mM Tris-HCl
anearob

DTT- Stocklösung: 100 mM DTT
in anearoben Rekonstitutionspuffer

Na₂S- Stocklösung: 10 mM Na₂S
in anearoben Rekonstitutionspuffer

FeCl₂- Stocklösung: 10 mM FeCl₂
in anearoben Rekonstitutionspuffer

Die aerobe Reinigung von Enzymen, welche Eisen-Schwefel-Cluster enthalten[4Fe- 4S]^{2+/1+}, führt primär zur Oxidation des Clusters gefolgt vom Verlust von Eisen und Schwefelatomen [2Fe-2S]. Um die katalytisch aktive Form zu erhalten, wurde der Eisen-Schwefel-Cluster unter anaeroben Bedingungen rekonstituiert. Zuerst muss aus allen Puffern, die in die *Glovebox* (Unilab, MBraun) einzuschleusen sind, der Sauerstoff entfernt werden. Die Puffer wurden, fertig angesetzt, auf 95°C im Wasserbad erhitzt und mit N₂ durch einen Gaswaschflaschenaufsatzt für 30 min durchströmt. Im Anschluss wurden die noch warmen Flaschen in die große Schleuse der *Glovebox* überführt. Während des Einschleusvorgangs sieden die Puffer, und der restliche Sauerstoff wurde *in vacuo* entfernt. Der Rekonstitutionspuffer wurde als Flüssigkeit eingeschleust, alle anderen Stocklösungen als Festsubstanz. Diese wurden erst in der *Glovebox* im Rekonstitutionspuffer gelöst. In der *Glovebox* ist eine 5%-ige H₂; 95%-ige N₂ Atmosphäre mit einem O₂ Gehalt < 2 ppm. Die auf 800 µL konzentrierte und gereinigte Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilus*, apo-SpI_G, wurde zunächst mit einer Gelpermeationssäule Sepharose G-25 (PD-10, GE-Healthcare) von dem aeroben Reinigungspuffer in den anaeroben Rekonstitutionspuffer umgepuffert. Danach wurde die farbige Proteinlösung in einer Tischzentrifuge bei 4°C mit Membrankonzentratoren (Ultrafree-0,5, Millipore) wieder auf 800 µL konzentriert. Im Anschluss wurde die Proteinlösung durch Zugabe von 40 µL der reduzierenden DTT Stocklösung auf eine Endkonzentration von 5 mM DTT eingestellt. 100 µL der FeCl₂ wurden parallel mit 5 µL DTT Stocklösung ebenfalls auf eine Endkonzentration von 5 mM DTT

eingestellt. Diese beiden Lösungen wurden für 30 min vorinkubiert. Zuletzt wurde zu den 800 μ L Enzymlösung 8 μ L Na₂S und 8 μ L der vorinkubierten FeCl₂ Lösung hinzupippetiert und für 16 h bei 4°C weiterinkubiert. Die Endkonzentration von 100 μ M des Na₂S und FeCl₂ war somit größer als die Proteinkonzentration (5 bis 50 μ M).

3.4.9 Reparaturassay mit Sporenphotoproduktlyase

Assaypuffer:	pH 7,0 100 mM Tris-HCl 200 mM KCl anearob
DTT- Stocklösung:	100 mM DTT in anearoben Assaypuffer
Na ₂ S ₂ O ₄ - Stocklösung:	100 mM Na ₂ S ₂ O ₄ in anearoben Assaypuffer
SAM- Stocklösung:	100 mM S-Adenosylmethionin in 1 mM HCl

Nach der 16 stündigen Rekonstituierung der apo-SplG lag diese als holo Form vor. Für den Enzymassay musste die SplG vom Rekonstituierungspuffer in den Enzymassaypuffer überführt und konzentriert werden. Dazu wurde die Enzymlösung in einem Membrankonzentratoren (Ultrafree-0,5, Millipore) in einer Tischzentrifuge bei 4°C auf 200 μ L konzentriert und mit dem Assaypuffer wieder verdünnt. Dieses wurde 4-mal wiederholt, um den Pufferaustausch sicherzustellen. Dann wurden verschiedene Substrate und ein Inhibitor in den Assay eingesetzt, um die SplG Aktivität genauer zu untersuchen.

50,0 μ L	SplG (10 nM/50 μ L)
7,0 μ L	Na ₂ S ₂ O ₄ (3 mM Endkonzentration)
5,0 μ L	DTT (5 mM Endkonzentration)
1,1 μ L	SAM (0,45 mM Endkonzentration)
X μ L	Substrat
<u>X μL</u>	<u>Assaypuffer</u>

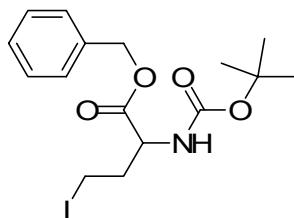
ad 250 μ L

Die Reaktion wurde bei 22°C in der Glovebox mit unterschiedlichen Zeiten inkubiert. Die Proben wurden nach der Reaktion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Um die jeweilige Reaktionsmischung sauber auf der HPLC zu analysieren, wurde das Protein vorher denaturiert. Dazu wurden 70 µL Perchlorsäure (20%; v/v) zur jeweiligen Reaktionslösung hinzugepumpt und für 1 min gevortext. Danach wurden sofort 70 µL Ammoniumacetat (20%; w/v) hinzugegeben, um den pH Wert zu neutralisieren und die DNA vor Hydrolyse zu schützen. Die abgestoppten Reaktionsmischungen wurden nun für 10 min auf 95°C erhitzt und danach für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und weiter auf der *rp*-HPLC analysiert.

3.5 Chemische Synthese

3.5.1 Synthese von AzaSAM

2-*tert*-Butoxycarbonylamino-4-iodo-butyric acid benzyl ester (5)



Verbindung **2** (3,37 g, 10 mmol) wurde in einem ausgeheizten 250 mL Rundkolben in 50 mL trockenem THF unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Der Rundkolben wurde mit Alufolie ummantelt und die Reaktionslösung mit Trockeneis und Ethanol auf -15°C gebracht. Danach wurden *N*-Methylmorpholin (1,1 mL, 10 mmol) und Isobutylchloroformat (1,4 mL, 10 mmol) unter Rühren hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei -15°C gerührt. Das Ende der Umsetzung wurde per DC kontrolliert (Verbindung **3**: $R_f = 0,45$ (10% Methanol in Dichlormethan)). Eine weitere Aufarbeitung wurde nicht vorgenommen, da die Reaktion quantitativ war und direkt in die nächste Stufe eingesetzt werden konnte.

Parallel wurde in einem weiteren mit Alufolie ummantelten Rundkolben Triethylamin (1,7 mL, 12 mmol) und *N*-Hydroxypyridin (1,52 g, 12 mmol) in 20 mL trockenem THF unter Rühren gelöst. Diese Reaktionsmischung wurde direkt zur anderen Reaktionsmischung

transferiert und für 1 h bei -15°C weitergerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde per DC überprüft (Verbindung 4: $R_f = 0,47$ (Toluol/ EtOAc 1:1). Das Lösungsmittelgemisch wurde unter Lichtausschluss *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung in die nächste Reaktionsstufe eingesetzt. Das entstandene gelbe Öl wurde in 150 mL Tetrachlormethan aufgenommen und in eine Belichtungsapparatur (Pyrex, 750 Watt) überführt. Zu dieser Reaktionsmischung wurde Iodoform (7,88 g, 20 mmol) hinzugefügt. Die Belichtungsapparatur wurde vorher mit Argon mehrmals durchgespült und mit einem Kryostaten auf die gewünschte Temperatur eingestellt. Die Reaktion wurde 1 h bei 15°C durchgeführt, bis kein weiterer Umsatz durch DC zu beobachten war. Das Lösungsmittelgemisch wurde *in vacuo* entfernt. Im Anschluss wurde der kristalline Feststoff durch Säulenchromatographie (Toluol/EtOAc 20:1) gereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines leicht gelben Feststoffes (1,43 g, 3,41 mol, 34%).

DC: $R_f = 0,45$ (Toluol/EtOAc 20:1);

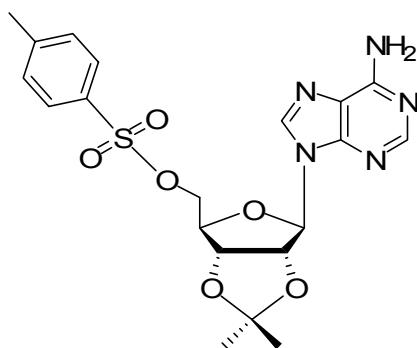
¹H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 7.74$ -7.34 (m, 5H, Phenyl), 5.26-4.94 (m, 2H, CH_2Bz), 4.11 (dt, $J = 8.73$, 8.72, 5.24 Hz, 1H, $CH(2)$), 3.33-3.15 (m, 2H, $CH_2(4)$), 2.51-2.15 (m, 1H, $CH_{2b}(3)$), 2.21-2.09 (m, 1H, $CH_{2a}(3)$), 1.38 (s, 9H, $C(CH_3)_3$)

¹³C NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 171.49$ (CO), 155.45 (CO), 137.20 (C_{Aryl}), 135.75 (C_{Aryl}), 128.76 (C_{Aryl}), 125.17 (C_{Aryl}), 78.32 (CH_2Bz), 65.93 ($C(CH_3)_3$), 54.27 ($CH(2)$), 34.33 ($CH_2(3)$), 28.01 (CH_3), 3.09 ($CH_2(4)$)

MS (MALDI⁺): m/z: gef. 420, 01 $[M+H]^+$, ber. für $[C_{16}H_{22}INO_4 +H]^+$, 420,0594.

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein. [224]

Toluene-4-sulfonicacid 6-(6-amino-purin-9-yl)-2,2,4-trimethyl-tetrahydro-furo[3,4-d] [1,3]dioxol-4-ylmethyl ester (7)



Verbindung **6** (5 g, 16,5 mmol) wurde in 50 mL trockenem Pyridin in einem Rundkolben gelöst. Das Pyridin wurde bereits vor der Zugabe von **6** mit Trockeneis und Ethanol auf -20°C heruntergekühlt. Danach wurde *p*-Toluolsulfonchlorid (3,5 g, 18,5 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre 2 min gerührt und dann für 3 Tage in den -20°C Gefrierschrank gestellt. Die Reaktion wurde schließlich in CH₂Cl₂ (500 mL) aufgenommen und 3-mal mit H₂SO₄ (2 M) ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde mit MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* entfernt. Als Produkt blieb ein weißer Schaum zurück (**6**).

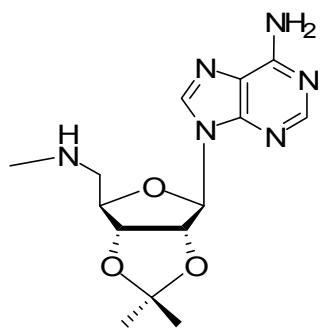
DC: R_f = 0,45 (Toluol/EtOAc 20:1);

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.24 (d, J = 12.13 Hz, 2H, Aryl), 7.82 (d, J = 8.00 Hz, 1H, CH(8)), 7.66 (d, J = 8.29 Hz, 2H, Aryl), 7.29 (s, 2H, NH₂), 7.20 (d, J = 8.30 Hz, 1H, CH(2)), 6.14 (d, J = 2.11 Hz, 1H, CH(1')), 5.30 (d, J = 1.14 Hz, 1H, CH(3')), 4.98 (dd, J = 6.10, 2.67 Hz, 1H, CH(4')), 4.51 (dd, J = 6.81, 3.99 Hz, 2H, CH₂(5')), 4.23 (d, J = 3.92 Hz, 1H, CH(2')), 2.42 (s, 3H, CH₃), 1.59 (s, 3H, C(CH₃)), 1.37 (s, 3H, C(CH₃))

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 151.40 (C(6)), 148.16 (CH(2)), 145.57 (C(4)), 141.93 (CH(8)), 132.04 (C_{Aryl}), 129.96 (C_{Aryl}), 128.95 (C_{Aryl}), 127.83 (C_{Aryl}), 119.44 (C(5)), 115.00 (C(CH₃)₂), 91.37 (CH(4')), 84.64 (CH(1')), 81.09 (CH(3')), 68.79 (CH₂(5')), 27.05 (CH₂(2')), 25.24 (CH₃), 21.67 (CH₃)

MS (MALDI⁺): m/z: gef. 420,01 [M+H]⁺, ber. für [C₁₆H₂₂INO₄ -H]⁺, 420,0594.

9-(2,2-Dimethyl-6-methylaminomethyl-tetrahydro-furo[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-ylamine (8)



Verbindung **7** (500 mg, 1,1 mmol) wurde in einem Druckrohr in 6 mL Methylamin gelöst. Die Reaktion wurde 3 d bei RT gerührt. Danach wurde auf 0 °C heruntergekühlt, das Druckrohr wurde geöffnet und das überschüssige Methylamin verdampfte. Der zurückbleibende Feststoff wurde durch Säulenchromatographie (EtOAc/MeOH/NH₄OH 10:1:1) gereinigt und als weißer Feststoff (**8**) (330 mg, 1,03 mmol, 90 %) in die nächste Stufe eingesetzt.

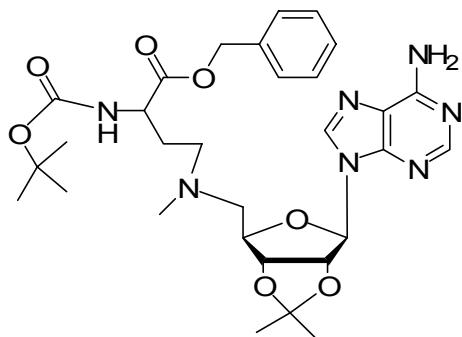
DC: $R_f = 0,33$ (EtOAc /MeOH 10:1);

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.31$ (s, 1H, CH(8)), 7.90 (s, 1H, CH(2)), 6.04-5.95 (m, 1H, CH(1')), 5.44 (dd, $J = 6.44, 3.22$ Hz, 1H, CH(3')), 5.02 (dd, $J = 6.36, 3.34$ Hz, 1H, CH(4')), 4.37 (dt, $J = 5.05, 4.93, 3.27$ Hz, 1H, CH_{2b}(5')), 3.13 (d, $J = 1.56$ Hz, 1H, CH_{2a}(5')), 2.88 (d, $J = 5.13$ Hz, 1H, CH(2')), 2.42 (d, $J = 1.72$ Hz, 3H, CH₃), 1.60 (s, 3H, C(CH₃)), 1.36 (s, 3H, C(CH₃))

MS (FTICR⁻): m/z: gef. 319,1517 [M-H]⁻, ber. für [C₁₄H₂₀N₆O₃ -H]⁻, 319,16.

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein. ^[225]

4-{[6-(6-Amino-purin-9-yl)-2,2,4-trimethyl-tetrahydro-furo[3,4-d][1,3]dioxol-4-ylmethyl]-methyl-amino}-2-tert-butoxycarbonylamino-butyric acid benzyl ester (9)

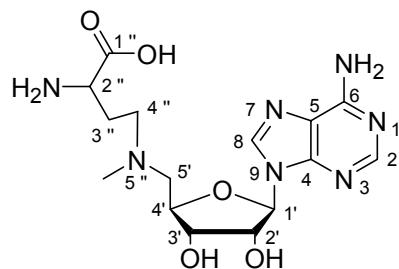


Zur Kupplung der Aminosäure mit dem Nukleosid wurde **8** (330 mg, 1,032 mmol) in 9 mL trockenem Acetonitril unter Argonatmosphäre gerührt. Parallel wurde in einer zweiten Reaktion **5** (515,3 mg, 1,135 mmol) in 15 mL trockenem Acetonitril gelöst und *N,N*-Diisopropylethylamin (0,19 mL, 1,135 mmol) hinzugegeben. Danach wurden beide Reaktionsgemische vereinigt und für 2 d bei 55°C unter Argonatmosphäre gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt durch zwei Säulenchromatographieschritte (Et₃N/MeOH/EtOAc 1:1:98) und (Isopropanol/DCM 7,5:92,5) gereinigt. Das Produkt wurde zweimal in DCM aufgenommen und das Lösungsmittel wiederholt *in vacuo* entfernt, um **8** (229 mg, 0,37 mmol, 35%) als weißen Feststoff zu erhalten.

DC: R_f = 0,30 (Isopropanol /DCM 7,5:92,5);

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 8.35 (s, 1H, CH(8)), 7.95 (s, 1H, CH(2)), 7.32 (s, 5H, Phenyl), 6.05 (d, J = 2.05 Hz, 1H, CH(1')), 5.87-5.77 (m, 1H, CH(3')), 5.67 (bs, 2H, CH₂Bz), 5.54-5.35 (m, 1H, CH(4')), 5.15 (bs, 2H, CH₂(5')), 4.94 (dd, J = 6.29, 3.89 Hz, 1H, CH(2'')), 4.55-4.21 (m, 2H, CH₂(4'')), 2.69-2.26 (m, 3H, CH(2'), CH₂(3)), 2.17 (s, 3H, CH₃), 1.61 (s, 3H, C(CH₃)), 1.41-1.39 (m, 12H, C(CH₃), C(CH₃)₃)

MS (MALDI⁺): m/z: gef. 612,39 [M+H]⁺, ber. für [C₃₀H₄₁N₇O₇ +H]⁺, 612,69.

aza-Adenosylmethionin (1)

Zur Entschützung des Zielmoleküls wurde **9** (229 mg, 0,374 mmol) in 3 mL trockenem DCM gelöst und zu einer Mischung aus BF_3 -Etherat (0,46 mL, 3,74 mmol) und Ethanthiol (0,87 mL, 11,22 mmol) gegeben. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre bei 0°C für 30 min gerührt. Danach wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion wurde für weitere 23 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand 3-mal in 10 mL Methanol aufgenommen und erneut evaporiert. Der klebrige weiße Rückstand wurde in 5 mL ddH₂O aufgenommen und ü.N. trocken lyophilisiert. Die weitere Reinigung von **1** ist im Ergebnisteil beschrieben.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.36-8.15 (m, 2H, CH(8), CH(2)), 6.10 (d, J = 5.53 Hz, 1H, CH(1')), 5.09 (t, J = 5.34, 5.34 Hz, 1H, CH(3')), 4.58 (td, J = 11.02, 3.13, 3.13 Hz, 1H, CH(4')), 4.44-4.41 (m, 1H, CH(2'')), 3.84 (dd, J = 13.06, 11.41 Hz, 1H, CH_{2b}(5')), 3.67 (dd, J = 9.03, 4.18 Hz, 1H, CH_{2a}(5')), 3.59 (dd, J = 13.42, 2.66 Hz, 1H, CH_{2b}(4'')), 3.55-3.34 (m, 3H, CH_{2a}(4''), CH₂(3'')), 2.92 (s, 3H, CH₃), 2.40-2.26 (m, 1H, CH(2''))

¹³C NMR (400 MHz, D₂O): δ = 180.61 (CO), 152.70 (C(6)), 148.95 (CH(2)), 145.57 (C(4)), 141.58 (CH(8)), 104.99 (C(5)), 89.43 (CH(1')), 78.49 (CH₂(2'')), 72.42 (CH(4')), 71.96 (CH(3'')), 57.86 (CH(2'')), 54.76 (CH₂(5')), 52.82 (CH₂(4'')), 39.29 (CH₃), 24.99 (CH₂(3''))

MS (FTICR): m/z: gef. 380,168 [M-H]⁻, ber. für [C₁₅H₂₃N₇O₅ -H]⁻, 380,18.

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein^[226].

3.5.1 Photochemische Herstellung des Sporen Photoschadens

Belichtungspuffer: pH 7,0
10 mM Pyridin-2,6-dicarbonsäure (DPA)
10 mM CaCl₂

DNA-Puffer: pH 7,0
100 mM NaCl

500 nmol des jeweiligen DNA Einzelstranges wurden in 2 mL DNA Puffer resuspendiert und mit dem gleichen Volumen an Belichtungspuffer auf 4 mL aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden jeweils 666 µL in je eine Kavität einer 6 Well Zellkulturschale (Greiner) überführt. Die Schale wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Lyophilisator getrocknet. Dieser trockene Film wurde mit den Schalen in der Glovebox für 5 h mit 254 nm belichtet. Die Sporenphotoprodukt enthaltende DNA wurde auf einer semipräparativen *rp*-HPLC von ungeschädigter DNA gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und *in vacuo* mit Hilfe der SpeedVac konzentriert, in ddH₂O resuspendiert und anschließend mit *Sep[®]-Pak Säulen* (Waters) entsalzt. Um diese optimalen Bedingungen herauszufinden, wurden eine Reihe von empirischen Versuchen bzgl. der Belichtungszeit und DPA Konzentration durchgeführt, welche im Ergebnisteil dargestellt sind.

3.5.2 Nachweis des Sporenphotoproduktes

Verdaupuffer 1: pH 5,7
300 mM Ammoniumacetat
100 mM CaCl₂
1 mM ZnSO₄

Verdaupuffer 2: pH 8,0
500 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem erzeugten DNA Schaden um das gewünschte Sporenphotoprodukt handelt, wurde die gereinigte DNA enzymatisch verdaut und Massenspektrometrisch analysiert. Der erste Teil der Verdaureaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt.

100,0 μ L	DNA (20 μ M Endkonzentration)
10,0 μ L	Verdaupuffer 1
10,0 μ L	Nuklease P1 aus <i>Penicillium citrum</i> (2,2 U/ μ L)
1,0 μ L	<i>calf-spleen</i> Phosphordiesterase (0,05 U/ μ L)

Die Reaktion wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe des Verdaupuffers 2 gestoppt. Der zweite Teil der Verdaureaktion wurde nach folgendem Schema zusammenpippetiert.

121 μ L	Teil 1 Verdaureaktion
12,0 μ L	Verdaupuffer 2
1,0 μ L	<i>alkaline calf intestinal</i> - Phosphatase (10U/mL)
10,0 μ L	<i>snake venom</i> -Phosphatase (0,9 U/ μ L)

Die Reaktion wurde erneut für 3 h bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von 6 μ L HCl (0,1M) gestoppt. Im Anschluss wurde die Reaktion für 10 min mit 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um alle ausgefallenen Proteine zu entfernen. Die Lösung wurde nun durch HPLC-MS/MS (vgl. 3.6.3) analysiert.

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Maldi-MS

Zur Identifizierung der überexprimierten Proteinen wurde ein Verdau mit Trypsin vorgenommen. Die Proteine konnten dann durch Peptidfingerprints eindeutig identifiziert werden.

Lösung 1: 50% (v/v) Acetonitril
 in ddH₂O

Lösung 2: 0,1% Trifluoressigsäure
 in ddH₂O

Matrixlsg.: CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamidsäure)

10 mg/ml CHCA

50% (v/v) Acetonitril

0,6% (v/v) Trifluoressigsäure

(Lagerung bei -20°C, 1 Woche)

Trypsinlsg.: 1 μ g/ μ L Trypsin (Promega)

50 mM Essigsäure

Ammoniumbicarbonatlsg.: 40 mM NH_4HCO_3

Alle verwendeten Geräte (Glasplatte, Skalpell, Pinzette) müssen sauber sein. Die Ammoniumbicarbonatlösung wurde aliquotiert, jeweils nur einmal benutzt, und bei -20°C gelagert. Es konnten Proteinbanden im Coomassie gefärbten SDS Gel und auch Proteine in Lösung gemessen werden. Das in Lösung befindliche saubere Protein wurde in einem möglichst salzarmen und glycerinfreien Puffer aufbewahrt. Die Banden im SDS Gel wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und 2-mal mit 200 μ L ddH₂O und danach 2-mal mit 200 μ L Ammoniumbicarbonat jeweils für 30 min bei 37°C im Thermomixer (600 rpm) gewaschen. Anschließend wurde 2-mal mit 200 μ L 50% Acetonitril für 5 min bei 37°C gewaschen. Das Acetonitril wurde sorgfältig entfernt und der Rest bei RT evapiert. Im Anschluss wurden 1 μ L Trypsinlösung auf das Gel pipettiert und für 3 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Gel mit 40 μ L Ammoniumbicarbonatlösung überschichtet und ü.N. bei 37°C mit 200 rpm im Thermomixer geschüttelt. Bei Analysen, in denen das Protein in Lösung war, wurden 40 μ L der Probe mit 1 μ L Trypsin versetzt und identisch ü.N. inkubiert.

Nach dem Verdau wurden 5 μ L Probe mit 5 μ L Lösung 2 gemischt. Danach wurde ein *ZipTip*® (C18, Millipore) 4-mal mit jeweils 10 μ L Lösung 1 equilibriert. Das *ZipTip*® wurde im Anschluss 4-mal mit jeweils 10 μ L Lösung 2 auf eine wässrige Lösung umgepuffert. Die Probe wurde danach durch 4-maliges aufziehen von 10 μ L auf die Säule geladen und danach 4-mal mit jeweils 10 μ L in Lösung 2 gewaschen. Am Ende wurden die Peptide mit 5 μ L Acetonitril von der Säule eluiert. Von dieser Lösung wurden 1 μ L mit 1 μ L Matrixlsg. auf dem MALDI Stahltarget gemischt und danach gemessen. Zur Messung wurde das etablierte Programm („RP_PepMix“), welches im Methodenordner abgespeichert ist, verwendet. Bei jeder Messung wurde zuvor auf einen Peptidstandard (NEB) nachkalibriert.

3.6.2 HPL-Chromatographie

Puffer A: 100 mM Triethylammoniumacetat
in ddH₂O

Puffer B: 100 mM Triethylammoniumacetat
in 80% Acetonitril

Die Analytik des Enzymassays, die Reinigung von belichteten DNA Strängen und die Reinigung von aza-Adenosylmethionin wurden auf mehreren *Merck-Hitachi*-Anlagen (analytisch: *L-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7400* UV-Detektor, *L-7480* Fluoreszenzdetektor, *L-7612* Lösungsmittel Entgaser, bzw. *L-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7420* UV/Vis-Detektor, *L-7455* DAD Detektor, *L-7612* Lösungsmittel Entgaser; präparativ: *L-1000* Interface Modul, *L-7150* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *Rheodyne P/N 77 25i* Einspritzventil, *L-7420* UV-Detektor, *ERC-3415 a* Lösungsmittel Entgaser) durchgeführt. Für analytische Umkehrphasen-Trennungen wurden *CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18*, *CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18* und *CC 250/4 Nucleosil 120-3 C8* Säulen der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Für präparative Umkehrphasen-Trennungen wurden *VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18* und *VP 250/10 Nucleosil 120-3 C8* Säulen der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die verwendeten Gradienten sind bei der jeweiligen Messung angegeben.

3.6.3 HPLC-MS/MS

Die hochauflösenden Massen wurden von dem MS-Service des Departments Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. ESI-Massenspektren wurden mit einem *Finnegan LTQ-FT* (Thermo Finnigan, Bremen) mit ESI-Quelle gemessen. Die Auflösung wurde auf 100000 bei m/z = 400 eingestellt. Der Massenbereich wurde auf bis zu 100 Masseneinheiten eingestellt. Die Spannung der Spraykapillare war 3 kV und die Kappilartemperatur wurde auf 300 °C eingestellt. Die HPLC Anlage wurde mit einer Flussrate von 200 µL/min betrieben.

3.6.4 UV/VIS-Spektroskopie

Die Messungen wurden auf einem *Varian 100 Bio Cary* Spektrometer durchgeführt. Die Proben wurden mit einer Proteinkonzentration von 0,8 mg/mL gemessen. Die holo-SplG wurde in 150 mM Tris-HCl (pH 8,0) durchgeführt. Das Enzym wurde nach der Rekonstituierung in der Glovebox in die UV Küvette (Suprasil®, Helma) überführt und

verschlossen. Die Reduktion mit 3.6 mM Na- Dithionit wurde ebenfalls in der Glovebox durchgeführt und im Anschluss eine zeitabhängige Messung durchgeführt.

3.6.5 EPR-Spektroskopie

Gereinigtes apo-SplG wurde rekonstituiert, konzentriert und in der Glovebox in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Messungen wurden auf einem *ESP* Spektrometer (Bruker) mit 9.45 GHz gemessen). Während der Messung wurde die Kühlung mit einem *ESR-900* (Oxford Instruments) Krystaten, welcher mit Helium gefüllt war, durchgeführt. Dieser Kryostat wurde durch einen ITC-4 Temperaturregler gesteuert. Diese Messungen wurden von Dr. *Antonio Pierik*, Phillips-Universität Marburg, durchgeführt.

3.6.6 Quantitative Fe und S Bestimmung

Der Eisen und Schwefelgehalt wurde durch *inductively-coupled-plasma-atomic-emission-spectroscopy* (ICP-AES) und durch einen colorimetrischen Assay bestimmt. Die Proteinproben für die ICP-AES wurden 2-mal gegen Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl) dialysiert. Die Probe enthielt 300 nmol/mL holo-SplG, welche vor der Messung mit 100 µL HCl (8 M) für 10 min bei 4°C inkubiert wurde. Danach wurden 100 µL TCA (80%, w/v) hinzugegeben und für weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Das denaturierte Protein wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1:4 verdünnt, und auf dem ICP-AES Spektrometer *Varian Vista RL CCD* (Varian) gemessen. Diese Messungen wurden von *Helmut Hartl*, LMU-München, durchgeführt.

Zur colorimetrischen Eisen Quantifizierung wurden 600 µL holo-SplG, wie bei der ICP-AES Messung denaturiert, zentrifugiert und dann mit 200 µL Ammoniumacetat (75 %,w/v) auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt. Danach wurden 80 µL Hydroxylamine-HCl (10%, w/v) und 80 µL 2,4,6-Tripyridyl-S-triazine (4 mM) hinzugegeben. Im Anschluss wurde für 1 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 593 nm in einem *Varian 100 Bio Cary* Spektrometer gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über eine zuvor aufgenommene Standardkurve.

Zur S2- Quantifizierung wurden 700 µL holo-SplG mit 100 µL NaOH (6%, w/v) und 500 µL Zn(CH₃COO)₂ 1 min gevortext. Danach wurden schnell 250 µL N,N-dimethyl-p-phenyldiamine (0,1%, w/v, in 5 M HCl) und 100 µL FeCl₃ (11.5mM, in 600 mM HCl) zugegeben und für 0,5 h bei RT inkubiert. Die Lösung wurde im Anschluss für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei 670 nm im *Varian 100 Bio Cary* Spektrometer

gemessen. Auch hier erfolgte die Quantifizierung über eine vorher aufgenommene Standardkurve.

3.6.7 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Aluminium-Fertigplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F254-Dünnschicht, 5 cm × 10 cm) durchgeführt. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL Schwefelsäure, Platte auf 100°C erwärmen) bzw. Ninhydrin-Tauchreagenz (300 mg Ninhydrin in 100 mL n-Butanol, Platte auf 100°C) sichtbar gemacht.

3.7 Biochemische Methoden

3.7.1 Inkorporationskinetik gegenüber des synthetischen Sporenphotoschadens

Lagerungspuffer DinB: pH 7,4
20 mM KH₂PO₄
50 mM KCl
20 % (v/v) Glycerin
10 mM β- Mercaptoethanol

Assaypuffer DinB: pH 8,0
40 mM Tris-HCl
5 mM MgCl₂
10 mM DTT
2,5 % (v/v) Glycerin
250 µg/ml BSA

Lagerungspuffer Polη: pH 7,5
20 mM Tris-HCl
50 mM KCl
10 mM β- Mercaptoethanol
10 % (v/v) Glycerin

Assaypuffer Pol η : pH 7,4
40 mM Tris-HCl
100 mM KCl
5 mM MgCl₂
250 μ g/ml BSA
10 mM DTT
2,5 % (v/v) Glycerin

Lagerungspuffer *Bst*Pol1: pH 7,5
10 mM Tris-HCl
50 mM KCl
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
50% glycerol
0,1% Triton X-100

Assaypuffer *Bst*Pol1: pH 8,8
20 mM Tris-HCl
10 mM (NH₄)₂SO₄
10 mM KCl
2 mM MgSO₄
0.1 % TritonX-100

Für die Primerextensionstudien wurde ein DNA Strang mit einem synthetischen Sporenphotoprodukt in der 5S-Konformation verwendet. Die Messung der Selektivität und Einbaukinetik gegenüber einem DNA Schaden wurden in Anlehnung an etablierte Methoden durchgeführt. [227-229]

Als Polymerasen wurden eine Polymerase des A-Typs (*Bst*Pol1) und zwei Polymerasen des Y Typs (Pol η ; DinB) verwendet.

Das verwendete Templat beinhaltete an einer definierten Stelle das Sporenphotoprodukt (5'-TAXGCATCATGC-3'; X: Sporenphotoprodukt). Der komplementäre Primer (5'-GCATGATGC-3') trägt am 5'Ende ein Fluoresceinmolekül. Diese beiden DNA Stränge

wurden in dem Assaypuffer der jeweiligen Polymerase hybridisiert (20 μ M Primer, 30 μ M Templat, in 100 μ L). Als Resultat erhält man einen Primer, der unmittelbar vor dem Sporenphotoprodukt aufhört, und nun durch die verwendete Polymerase komplementär zum DNA Schaden verlängert wird. Als erstes wurde nach Bedingungen gesucht unter denen der Primer bei ungeschädigter DNA max 20 % verlängert wurde. Unter diesen Bedingungen wurde eine Elongation des Primers über den geschädigten DNA Strang durchgeführt. Bei der *low fidelity* Polymerase DinB wurde die Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 μ L DNA (Templat/Primer)
3 μ L dATP (50 μ M)
4 μ L DinB (200 μ g/mL)
21 μ L Assaypuffer DinB

Die Reaktion wurde für 10 min bei 25°C durchgeführt. Bei der *low fidelity* Polymerase pol η wurde die Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

2 μ L DNA (Templat/Primer)
3 μ L dATP (50 μ M)
1 μ L Pol η (300 nM)
21 μ L Assaypuffer Pol η

Die Reaktion wurde für 1,5 min bei 25°C durchgeführt. Bei der *high fidelity* Polymerase *Bst*Pol1 wurde die Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

2 μ L DNA (Templat/Primer)
3 μ L dATP (50 μ M)
1 μ L *Bst*Pol1 (300 nM)
21 μ L Assaypuffer *Bst* Pol1

Die Reaktion wurde für 1,5 min bei 25°C durchgeführt. Alle Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 μ L EDTA (100 mM) und anschließender Hitzedenaturierung für 10 min bei 95°C gestoppt. Da nur bei Pol η ein effektiver Einbau gegenüber des Sporenphotoproduktes zu beobachten war, wurde auch nur hier eine Kinetik mit 16 unterschiedlichen dNTP Konzentrationen von 0,61 μ M, 1,2 μ M, 2,4 μ M, 4,9 μ M, 9,8 μ M...und 20 mM durchgeführt.

Die Proben wurden dann mit der unter 3.3.4 beschriebenen PAA-Gelelektrophorese getrennt und danach mit der *LAS3000* Software quantifiziert.

3.7.2 *In vivo* Replikationsassay

Für die *in vivo* Studien zur Replikation von DNA mit Sporenphotoprodukt wurde der belichtete, also natürliche Sporenphotoschaden verwendet. Dazu wurde ein 9 Nukleotide langer DNA Einzelstrang (5'-GGAAAXAAG-3'; X: Sporenphotoprodukt) belichtet, auf der HPLC von ungeschädigten DNA Strängen getrennt, lyophilisiert und entsalzt. Dieser DNA Strang wurde zuerst am 5'-Ende phosphoryliert.

5,0 µL	ssDNA (1 nmol/µL)
4,0 µL	10x PNK Puffer (NEB)
3,35 µL	ATP (100 nmol/µL)
6,8 µL	T4 PNK (10U/µL)
20,85 µL	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde für 4 h bei 37°C inkubiert und danach für 10 min bei 90°C denaturiert.

Nach der Phosphorylierung wurde der DNA Strang mit Sporenphotoprodukt und die beiden anderen DNA Stränge (Templat: 5'-CTTAATTCCGAATTCAAGGTG-3` und Elongationsstrang: 5'-CACCTTGAATT-3`) im Thermocycler hybridisiert.

10,0 µL	Templat (1 nmol/µL)
10,0 µL	Elongationsstrang (1 nmol/µL)
40,0 µL	Phosphorylierungsreaktion
13,4 µL	10x PNK Puffer (NEB)
100,6 µL	ddH ₂ O

Nach der Hybridisierung wurde der *Nick* durch Ligation geschlossen. Dazu wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert:

174,0 µL	Hybridisierungsreaktion
3,15 µL	ATP (100 nmol/µL)
1,0 µL	T4 DNA Ligase (2000U/mL)

Die Reaktion wurde für 10 h bei 4°C inkubiert und danach 1 µL Ligase (2000U/mL) hinzugegeben und nach weiteren 10 h erneut 1 µL Ligase.

Diese Reaktionsschritte wurden nun durch Massenbestimmung am FTICR überprüft. Im Anschluss wurden 5 pg DNA in eine TOPO-Reaktion (vgl.3.3.13) eingesetzt. Diese wurde schließlich in den Nukleotid Excisions Reparatur, Homologe Rekombination und CPD Photolyasen defizienten *E. coli* Stamm *CSR-603* transformiert.

3.7.3 Isolierung und Detektion eines CPD Schadens in kurzen DNA Doppelsträngen

Zur Herstellung eines definierten und sequenzspezifischen *cis-syn*-CPD in einem kurzen DNA Fragment wurden PNA-Acetophenon Stränge ^[230] mit der zu schädigenden DNA hybridisiert und belichtet. Dazu wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert.

6 µL NaCl (5 M)
2 µL Tris-HCl (1 M)
3 µL DNA Strang (100 pmol/µL)
3 µL PNA Sonde (100 pmol/µL)
186 µL ddH₂O

Die verwendeten DNA Stränge und PNA Sonden sind im Ergebnisteil aufgelistet. Die Belichtung wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm mit einer 1000 W Kurzbogenlampe für 240 min belichtet ^[231]. Nach der HPLC- Trennung bei 55°C von DNA und PNA Hybrid wurde der DNA Strang erneut mit dem komplementären DNA Strang hybridisiert.

3 µL DNA (300 ng/µL)
3 µL DNA (300 ng/µL)
5 µL NEB Puffer 2
4 µL *Bst*UI (1000 U/mL)

Die Reaktion wurde 2,5 h bei 60°C inkubiert und die DNA Fragmente mit *rp*-HPLC voneinander getrennt. Die DNA Stränge wurden danach auf einem analytischen PAA-Gel kontrolliert und im Anschluss ein Totalverdau, wie unter 3.5.2 beschrieben, durchgeführt. Dieser Totalverdau wurde dann, um das *cis-syn*-Cyclobutan Thymidin Dimer nachzuweisen, am FTICR massenspektrometrisch analysiert.

3.7.4 Isolierung und Detektion eines CPD Schadens im M13-Phagengenom

Zur Herstellung eines definierten und sequenzspezifischen *cis-syn*-CPD in einem M13 Phagengenom wurden PNA-Acetophenon Stränge [232] mit dem zu schädigenden DNA Plasmid hybridisiert. Die verwendeten Einzelstrangplasmide wurden wie unter 3.3.14 beschrieben hergestellt. Zur Hybridisierung wurde die PNA Sonde und das ss-Plasmid nach folgendem Ansatz 2:1 von 80°C auf 20°C innerhalb von 2 h abgekühlt.

2,0 μ L NaHPO₄ (100 mM)
0,4 μ L NaCl (5 M)
30 μ L ssPlasmid (11,2 pmol/ μ L)
3,0 μ L PNA Sonde (100 pmol/ μ L)
14,6 μ L ddH₂O

Dieser Ansatz wurde dann wie unter 3.7.3 beschrieben belichtet, von der PNA Sonde durch *rp*-HPLC bei 55°C getrennt und danach mit einem Biotin gelabelten DNA Oligonukleotid hybridisiert.

pH 8,0
5 μ L Tris-HCl (200 mM)
10 μ L ssPlasmid (25,0 pmol/ μ L)
2,5 μ L DNA-Biotin (100 pmol/ μ L)
32,5 μ L 7 M NaCl in ddH₂O

200 μ L *Magnetic Beads* (Dynabeads MyOneTM; Streptavidin Binding, Invitrogen) wurden an einem *Magnetic Separator* (Invitrogen) immobilisiert und dann 2-mal mit Puffer W (10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Die magnetischen *Beads* wurden danach in der DNA Hybridisierungslösung resuspendiert und 3 h bei 20°C und 600 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die *Beads* erneut immobilisiert und der Überstand wurde verworfen. Die *Beads* und daran immobilisierte DNA wurden in 300 μ L Puffer R (pH 7,9, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 100 μ g /ml BSA) resuspendiert und die beiden Endonukleasen *Bgl*II und *Pv*II (je 20 U) wurden hinzupippetiert. Die Reaktion wurde 16 h bei 30°C und 400 rpm inkubiert. Danach wurden die *Beads* wieder immobilisiert, der Überstand wurde abgenommen, lyophilisiert und auf einem Agarosegel analysiert. Die *Beads* wurden in 100 μ L Puffer D (pH 8,0, 150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat) resuspendiert und für 10 min auf 90°C erhitzt danach wurde die Probe sofort auf 4°C abgekühlt. Die DNA im Überstand wurde in der *Speedvac* konzentriert und auf eine positiv geladene Nylonmembran (INYC10100, *Millipore*) gespottet. Die DNA wurde auf der Membran hitzefixiert (20 min bei 80°C), und anschließend das *cis-syn*-CPD durch Antikörper detektiert. Dazu wurde die

Membran zuerst 3-mal mit Puffer A für 5 min gewaschen (pH 8,0, 100 mM Tris, 1,5 M NaCl, 0,5 % (v/v) Tween20) und mit der Primärantikörperlösung (pH 8,0, 100 mM Tris, 1,5 M NaCl, 0,5 % (v/v) Tween 20, 2,0 % (w/v) Milchpulver, 1:2000 monoklonaler Anti-Thymin Dimer-AK (Clone H3)) für 2 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss 3-mal mit Puffer A für 5 min gewaschen und dann mit der Sekundärantikörperlösung (pH 8,0, 100 mM Tris, 1,5 M NaCl, 0,5 % (v/v) Tween20, 2,0 % (w/v) Milchpulver, 1:2500 Anti-mouse-IgG1-HRP) für 1 h inkubiert. Die Membran wurde 3-mal für 5 min mit Puffer A gewaschen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch Zugabe von *Light Blotting Substrate* (Roche) gestartet und mit Hilfe des *LAS3000* (Raytest) analysiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit war lediglich ein Enzym aus *Bacillus subtilis* beschrieben, welches das Sporenphotoprodukt repariert. Dieses Protein konnte aufgrund seiner geringen Stabilität und extremen Sauerstofflabilität bisher wenig charakterisiert werden.^[137] Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Verwendung von Bioinformatik Datenbanken und dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) eine Sporenphotoproduktlyase im Genom des thermophilen Bakteriums *Geobacillus stearothermophilus* gefunden. Dieses Enzym wurde aufgrund von Protein und DNA Sequenzhomologien eindeutig als Sporenphotoproduktlyase identifiziert. Diese thermophile Sporenphotoproduktlyase konnte in *E. coli* überexprimiert und im Anschluss durch die Verwendung neuartiger Affinitätschromatographie-Technologien gereinigt werden. Das zur Homogenität gereinigte Protein konnte in dieser Form zur biochemischen Charakterisierung und zu initialen Kristallisationsexperimenten verwendet werden.

4.1 Charakterisierung der Sporenphotoproduktlyase

4.1.1 Sequenzanalysen zur Sporenphotoproduktlyase

Durch die Verwendung der Sporenphotoproduktlyase DNA Sequenz aus *B. subtilis* und BLAST konnten 56 verschiedene potentielle Sporenphotoproduktlyasen in verschiedensten Prokaryoten mit einem E-Wert < 0 identifiziert werden. Die meisten dieser Treffer sind in den Arten der *Bacillus* und *Clostridium* Gattung zu finden. In Abbildung 4.1 ist die phylogenetische Analyse von 12 potentiellen Sporenphotoproduktlyasen aus unterschiedlichen Arten nach *Jotun Hein* dargestellt.^[233]

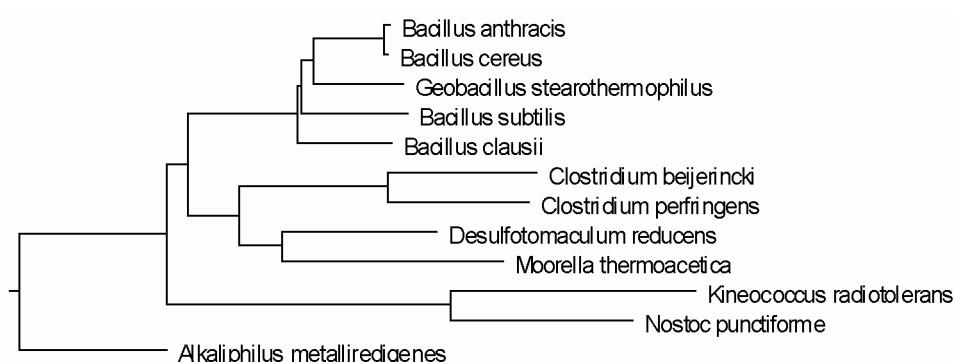


Abbildung 4-1: Phylogenetische Darstellung von 12 verschiedenen Arten, welche anhand der Proteinsequenzhomologien der Sporenphotoproduktlyasen berechnet wurden.

Die fünf obersten Sporenphotoproduktlyasesequenzen sind der *Bacillus* Gattung zugehörig und weisen deshalb eine hohe Sequenzhomologie untereinander auf. Die nächsten beiden gehören zur Gattung der *Clostridium*, für die das gleich gilt. *Desulfotomaculum reducens* und *Moorella thermoacetica* gehören ebenfalls zur Gattung *Clostridium*, sind jedoch weiter vom genetischen Mittelpunkt der Gattung entfernt. Sehr interessant ist die Präsenz einer potentiellen Sporenphotoproduktlyase in *Kineococcus radiotolerans*, da diese Art weder zur *Bacillus* noch zur *Clostridium* Gattung gehört. Dieses nicht sporulierende gram-positive Bakterium wurde erst 2002 von *Phillips et al.* in einer radioaktiv belasteten Umgebung in South Carolina entdeckt.^[234] Das Bakterium gehört zur sehr kleinen *Kineococcus* Gattung. Die Proteinsequenzidentität beträgt fast 37 %, so dass eine DNA reparierende Funktion und die Anwesenheit eines [4Fe-4S] Clusters sehr wahrscheinlich ist (Schema 4-1). Ein weiterer sehr interessanter Treffer ist das *Nostoc punctiforme* Cyanobakterium. Diese obligat photoautotrophen Organismen sind dem Sonnenlicht zwangsläufig mehrere Stunden pro Tag ausgesetzt. Die Bildung von Sporenphotoschäden wurde, da diese Bakteriengattung ebenfalls keine Sporen bildet, noch nicht beobachtet. Der letzte durch Sequenzvergleiche erhaltene signifikante Treffer ist *Alkaliphilus metallireducens*, welches eine Proteinsequenzidentität von fast 50% zur potentiellen Sporenphotoproduktlyase in *Bacillus anthracis* aufweist. Dieses *alkaliphile* und *halophile* Bakterium wurde bisher nur aus Absetzbecken von Kläranlagen isoliert und kann ebenfalls keine Sporen bilden.

Ob sich das Vorkommen der Sporenphotoproduktlyase ausschließlich auf die sporulierenden *Bacillus* und *Clostridium* Arten beschränkt, bleibt jedoch bis zur Durchführung weiterer Experimente ungeklärt.

Tabelle 4-1: Identität der Sporenphotoproduktlyase-Proteinsequenzen innerhalb verschiedener Bakterien (Angaben in Prozent).

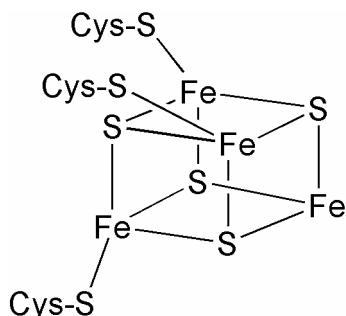
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
***	39,0	40,5	40,5	38,7	39,3	35,0	35,6	36,7	40,5	53,8	35,8	1: <i>N. punctiforme</i>
***	49,3	49,3	49,6	48,4	44,2	43,0	45,2	46,3	34,5	40,5		2: <i>A. metallireducens</i>
	***	98,5	74,9	74,6	46,9	47,5	52,6	77,2	34,2	45,9		3: <i>B. anthracis</i>
		***	75,1	74,9	46,9	47,2	52,9	77,2	34,2	45,9		4: <i>B. cereus</i>
			***	73,1	48,4	47,2	50,3	72,8	36,3	46,8		5: <i>B. clausii</i>
				***	44,5	47,5	50,9	72,9	34,5	47,6		6: <i>B. subtilis</i>
					***	64,8	49,7	46,6	38,8	44,1		7: <i>C. beijerincki</i>
						***	51,8	45,7	30,5	48,2		8: <i>C. perfringens</i>
							***	53,5	30,8	57,8		9: <i>D. reducens</i>
								***	36,6	49,1		10: <i>G. stearothermophilus</i>
									***	35,8		11: <i>K. radiotolerans</i>
										***		12: <i>M. thermoacetica</i>

Die genannten Bakterien existieren unter so extremen Umwelteinflüssen, dass ein zusätzliches Enzym zur DNA Schadens Beseitigung jedoch gut vorstellbar ist.

Bei einer genaueren Sequenzanalyse zeigt sich im Bereich zwischen den Aminosäuren 90-120, ausgehend von der *Bacillus subtilis* Proteinsequenz, eine hoch konservierte Region (Abbildung 4-2). In dieser konservierten Region befindet sich das typische Motiv für einen kubischen [4Fe-4S] Cluster, C-X-X-X-C-X-X-C, welcher über die deprotonierte Thiolseitenkette der drei Cysteine koordiniert wird (Schema 4-1). Diese konservierte Abfolge der Cysteinreste, und damit auch der [4Fe-4S] Cluster, existiert ebenfalls in allen anderen SAM-abhängigen Radikalenzymen.

Abbildung 4-2: Die hoch konservierte Region zwischen Aminosäure 90 und 120 der Sporenphotoproduktlyase enthält das C-X-X-X-C-X-X-C Motiv. An diesem Motif ist der Eisen-Schwefel-Cluster koordiniert.

Durch bioinformatische Untersuchungen zeigte sich, dass mindestens 600 Enzyme zu dieser *SAM radical* abhängigen *superfamily* gehören.^[235] Allen gemein ist die Nutzung des Eisen-Schwefel-Clusters für eine katalytische Aktivität. Der Eisen-Schwefel-Cluster in der Sporenphotoproduktlyase bildet, neben einer Proteinregion für die Erkennung des Sporenphotoschadens, das katalytisch aktive Zentrum.



Schema 4-1: Koordinierung eines [4Fe-4S] Clusters durch Cysteinseitenketten.

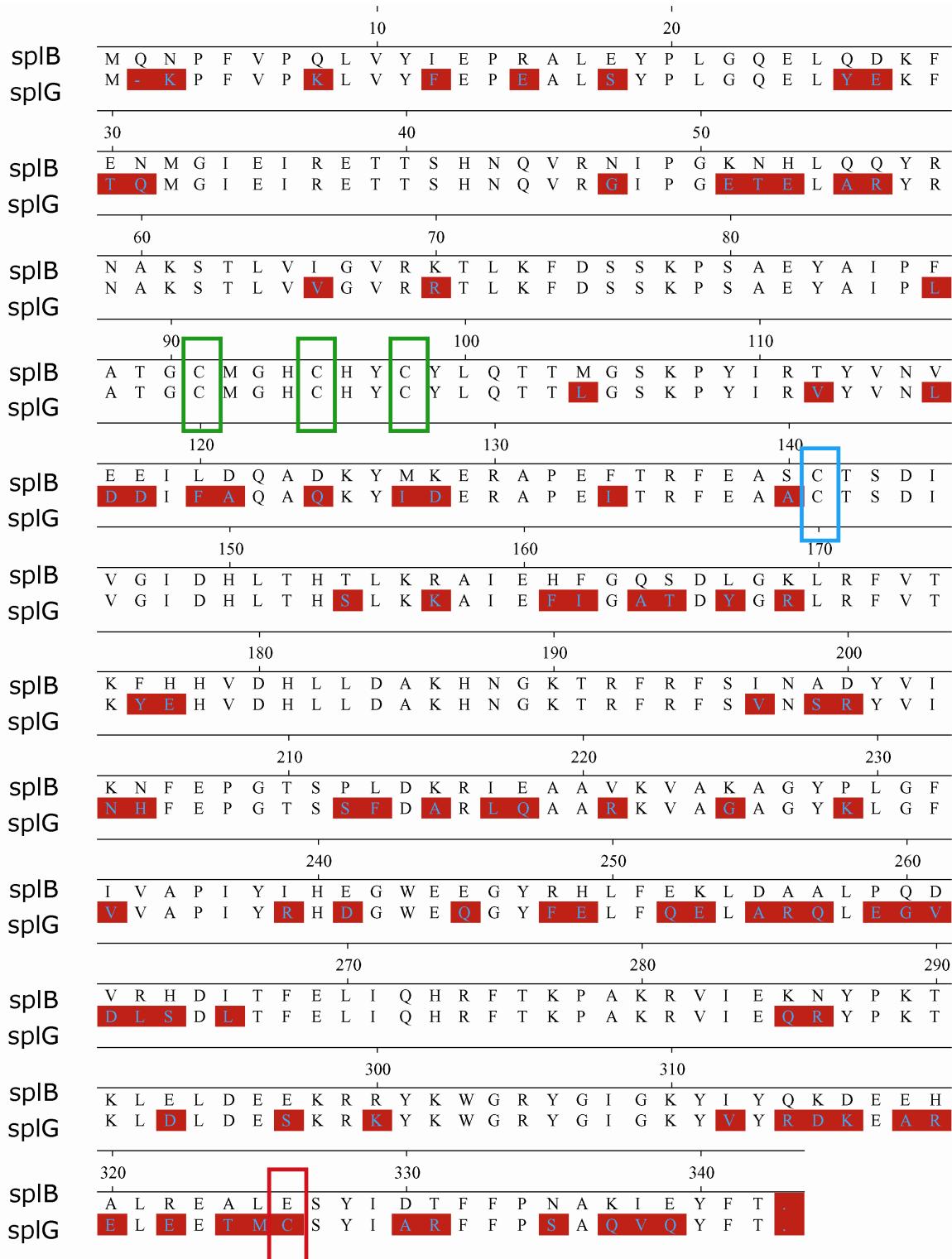


Abbildung 4-3: Sequenzalignment zwischen der bekannten Sporen Photoproduktlyase aus *B. subtilis* (SplB) mit der Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilis* (SplG); rot unterlegte Aminosäuren sind nicht identisch.

Neben den drei Cysteinen, die an der Eisen Schwefel-Cluster Koordinierung beteiligt sind, gibt es ein weiteres Cystein an Position 141 (Abbildung 4-3). Dieses Cystein ist in allen Sporenphotoproduktlyasen der *Bacillus* Gattung konserviert. In den Sporenphotoproduktlyasen der *Clostridium* Arten, ist dieses Cystein hingegen konsequent gegen ein Alanin

ausgetauscht. Studien zur Relevanz dieses vierten Cysteins in *B. subtilis* zeigten, dass durch eine Aminosäureaustausch (C141A) die UV Resistenz des modifizierten Stammes ebenso abnimmt, wie bei einem Cysteinaustausch im Eisen-Schwefel-Cluster Motiv. Die Bildung eines Homodimers aus zwei Sporenphotoproduktlyasemolekülen durch eine Thioestherverbindung ist eine mögliche Erklärung für die *in vivo* beobachtete Aktivitätsabnahme. Die Abwesenheit des vierten Cysteins in den *Clostridium* Arten deutet wiederum eher auf eine regulatorische Funktion des Cysteins hin. Bisher konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, dass die Sporenphotoproduktlyasen aus den *Clostridium* Arten überhaupt aktiv sind. Ob der Aktivitätsverlust der Sporenphotoproduktlyase nun durch eine regulatorische oder katalytische Änderung des Enzyms hervorgerufen wird, bleibt also weiterhin unklar.^[141]

Im Vergleich zu allen anderen 56 untersuchten Sporenphotoproduktlyasen aus unterschiedlichen Organismen, weist die Variante aus *G. stearothermophilus* als einzige ein weiteres fünftes Cystein an Position 326 auf. Die Funktion ist bislang unbekannt. Es könnte jedoch durch dieses weitere Cystein zu einer stabileren Homodimer-Bildung als bei mesophilen Arten kommen.

Die Anwesenheit des Eisen Schwefel-Clusters macht das Protein sehr schwer zugänglich, da der [4Fe-4S] unter aeroben Bedingungen sehr schnell in einen [2Fe-2S] Cluster zerfällt. In Sporen und keimenden Zellen herrschen reduzierende und sauerstoffarme Bedingungen vor, so dass die Sporenphotoproduktlyase unter natürlichen Bedingungen ausreichend stabil ist. Intensive Untersuchungen der transkriptionelle Regulation der Sporenphotoproduktlyase aus *B. subtilis* zeigten,^[136] dass die Sporenphotoproduktlyase nur in der dritten Phase der Sporulation transkribiert wird und nicht zum Zeitpunkt der Sporengeneration oder in vegetativen Zellen. Die Stabilität der Sporenphotoproduktlyase in den Sporen muss also sogar so hoch sein, dass sie die lange Zeit des inaktiven Sporenstatus überdauert. Die Transkription findet durch die vorsporspezifische sigma-G Faktor ($E\sigma^G$) aktivierte RNA Polymerase statt. Von dieser $E\sigma^G$ aktivierte RNA Polymerase wird die Transkription weitere Operone wie *gdh*, *ssp* Familie und *spoVA* temporär reguliert. Alle diese Operone lassen sich zu einem $E\sigma^G$ Regulon zusammenfassen.^[135] Welche Regulationsmechanismen zur zeitabhängigen Transkription führen, wird im Folgenden näher beschrieben.

Das *spl*-Operon in *Bacillus subtilis* ist bicistronisch aufgebaut. Die Regulation der Gentranskription von zwei Genen kann also durch denselben Promotor erfolgen. In *Bacillus subtilis* besteht das *spl*-Operon aus dem *splA*-Gen, welches potentiell ein Protein kodiert und

dem *splB*-Gen der Sporenphotoproduktlyase. Des Weiteren wurden zwei potentielle Promotoren identifiziert, welche als Erkennungssequenz der $\text{E}\sigma^G$ aktivierte RNA Polymerase dienen.

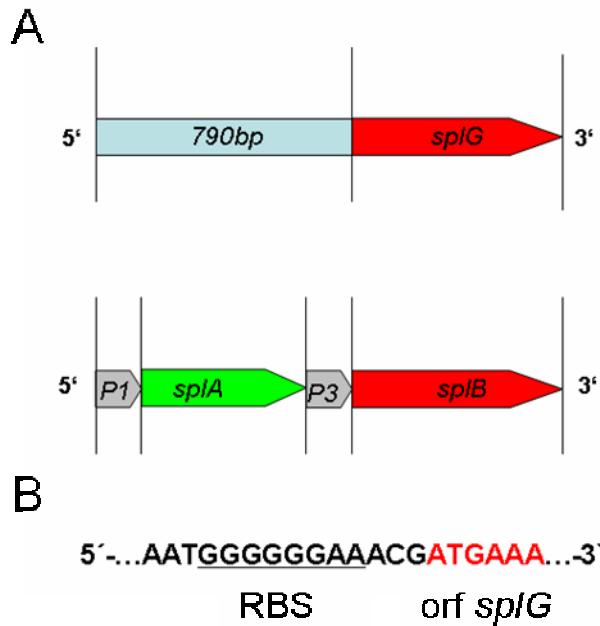


Abbildung 4-4: A) Regulation der Sporenphotoproduktlyasen aus *G. stearothermophilus* (SplG) und *B. subtilis* (SplB); schematischer Vergleich anhand der DNA Sequenzhomologien. B) Ribosomen Bindungstelle für die SplG Translation.

Der Promotor *P1* befindet sich *upstream* zum *splA* Gen und *P3* liegt *upstream* zum *splB* Gen. Die Transkription des *splB* Gens durch $\text{E}\sigma^G$ aktivierte RNA-Polymerasen kann entweder über den Promoter *P1* oder *P3* stattfinden. Eine Transkription von *P3* findet auch ohne die Anwesenheit des *P1* Genabschnittes statt, umgekehrt ist eine Transkription von *P1* ohne oder bei defektem *P3* nicht möglich. Im Genarrangement von *G. stearothermophilus* sind diese Promotoren anhand von Sequenzhomologien nicht in einer Umgebung von 3000 bp zum *splG* Gen zu identifizieren. Dieses hängt auch mit der bisher wenig untersuchten Transkriptionsregulation in diesem Organismus zusammen. Das Vorhandensein einer Ribosomenbindungsstelle unmittelbar vor dem *splG* Gen deutet auf eine klassische Promotoregulation mit zugehöriger sporulationsaktivierter RNA Polymerase hin. Die Existenz des *splA* Gens *upstream* oder *downstream* kann jedoch durch ausführliche Sequenzabgleiche auf Protein und DNA Ebene in *G. stearothermophilus* ausgeschlossen werden. Dieses *splA* Genprodukt soll negativ regulierende Eigenschaften auf die *splB* Transkription haben.^[236] Das *splA* Gen kodiert ein hypothetisches Protein mit 75 Aminosäuren und wurde bisher nicht überexprimiert, um eine genauere Charakterisierung durchzuführen. Durch bereits durchgeführte Datenbankanalysen wurde eine Sequenzidentität von 17% auf Proteinebene

zwischen dem SplA Protein und einem TRAP-Protein aus *B. subtilis* festgestellt. Diese Sequenzhomologie deutet auf einen ähnlichen Mechanismus zur negativ Regulation hin. TRAP führt zur einer negativen Regulation der Tryptophanbiosynthese in *B. subtilis*. Dazu bilden TRAP Monomere einen homooligomeren Komplex, welcher durch die Bindung jeder Untereinheit mit einem Tryptophan aktiviert wird. Dann bindet der aktivierte TRAP-Trp Komplex entweder an GAG oder UAG *repeats* (Wiederholungen) der mRNA in der Nähe der RBS und blockiert somit die Proteintranslation. Die SplA Protein bzw. DNA Sequenz wurde jedoch bisher ausschließlich in *B. subtilis* bzw. *B. amyloliquefaciens* gefunden, so dass eine generelle Regulation über diesen Mechanismus nahezu ausgeschlossen werden kann. Die Sequenzidentität von nur 17% zum TRAP Protein unterstützt diese Annahme. Die Sequenzvergleiche ergaben, dass sich *upstream* der jeweiligen Sporenphotoproduktlyase unkonservierte DNA Regionen befinden, die eher auf die Anwesenheit einer ca. 500 bp nicht kodierenden Region hindeuten. Eine negative Regulation der Sporenphotoproduktlyase erscheint aus biologischer Sicht zudem wenig plausibel, sondern eher eine Aktivierung der Transkription zum Zeitpunkt der Sporenbildung unter starker UV-Licht Bestrahlung.

Intensive Sequenzvergleiche von CPD, (6-4) Photolyasen und Cryptochromen zeigen, dass keine Sequenzhomologien auf Proteinebene zwischen diesen Enzymen bestehen. Die Funktionsähnlichkeit, die direkte Reparatur von UV induzierten Photodimeren in DNA, korreliert also nicht mit einer Sequenzähnlichkeit. Beim direkten Vergleich von CPD Photolyase aus *A. nidulans* und Sporenphotoproduktlyase aus *B. subtilis* ist die Sequenzidentität kleiner 10 %, was keinerlei Schlüsse über die Vergleichbarkeit des Erkennungsmechanismus des Helix verzerrenden Sporenphotoprodukt zum CPD Schaden zulässt. In diesem Fall muss auf die Ergebnisse von Kristallstrukturmessungen gewartet werden.

4.1.2 Expression und Reinigung von SplG aus *G. stearothermophilus*

Die Expression der *Bacillus subtilis* Sporenphotoproduktlyase in *E. coli* wurde 2001 von *Rebeil et al.*^[137] zum ersten Mal beschrieben. Die veröffentlichten Daten zur Proteinausbeute und Proteinreinheit sind jedoch für valide Enzymassaybedingungen und Kristallisationsversuche nicht ausreichend. Deshalb wurden neue -Expressionsstämme, -vektoren und -bedingungen systematisch getestet, um die beschriebenen Ausbeuten und Reinheiten bei der Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilus* zu optimieren. Dabei wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden klassische Optimierungen durch eine Variation der Expressionsvektoren und *E. coli* K12 Substämme durchgeführt. Zum anderen wurde versucht die Eisen Schwefel-Cluster Assemblierung zu optimieren, um die Aubeute an löslichem Protein zu erhöhen.

Um die Suche nach Expressionsvektoren und *E. coli* K12 Substämme zeitlich und ökonomisch sinnvoll zu gestalten, wurde das GatewaysystemTM (Invitrogen, CA) verwendet. Dieses System ermöglicht nach der Herstellung eines pEntry-splG Vektors (vgl 3.3.11) die parallele Herstellung von beliebig vielen verschiedenen Expressionsvektoren innerhalb weniger Stunden (Tabelle 4-2). Es wurden dabei ca. 20 verschiedene Expressionskonstrukte in jeweils drei verschiedenen *E. coli* K12 Substämme (Tuner (DE 3) pLysS; Bl21 (DE 3) pLysS und Rosetta (DE3)pLysS) unter Standardexpressionsbedingungen (4 h bei 37°C nach Induktion) getestet.

Tabelle 4-2: Übersicht zu einigen hergestellten Vektoren für die SplG Expression (nur kurze N-terminale Tags führen zu einer Fe-S Cluster Bildung).

Plasmidbezeichnung	TAG	Proteaseschnittstelle	Fe-S-Cluster
pEXP17-SplG	His ₆ -TAG	Faktor XA	-----
pEXP007-SplG	Strep-TAGII	-----	ja
pET101-D-SplG	His ₆ -TAG	-----	ja-
pEXP15-SplG	GST-TAG	-----	-----
pEXP008-SplG	MBP-TAG	-----	-----
pEXP14-SplG	-----	-----	?

Dabei zeigte sich, dass die Verwendung des Stammes Tuner (DE 3) pLysS zu einer sehr hohen Ausbeute an löslicher SplG führt und dieses weitgehend unabhängig von der Art des ausgewählten Proteintags. Die Proteinreinheit und auch Farbe ist jedoch extrem abhängig von der Art des verwendeten Tags. Der MBP-Tag und GST-TAG führen zu einer guten Proteinreinheit, jedoch entspricht das erhaltene farblose Protein nicht der aktiven Eisen-Schwefel-Cluster Form. Grundsätzlich ist die Assemblierung offensichtlich abhängig von der Größe der N-terminalen Fusionseinheit. Je länger die N-terminalen Fusionsproteine sind,

desto geringer ist die Ausbildung des [4Fe-4S] Clusters. C-terminale Tags wurden nicht getestet, da die Inaktivität dieser Formen durch Literaturbeispiele bereits belegt wurde.

Die Optimierung der Eisen-Schwefel Cluster Bildung wurde durch die Ko-Expression von Enzymen versucht, die in *E. coli* an der Assemblierung beteiligt sind. Der Ausgangsvektor wurde von der Arbeitsgruppe *Prof. Hopfner*, LMU München, zur Verfügung gestellt. Parallel wurden während der Expression oder vor dem Aufschluss die Ausgangssubstanzen der Eisen-Schwefel-Cluster Assemblierung zu den Expressionsansätzen hinzugegeben.

Die Ko-Expression der Assemblierungs Enzyme (Abbildung 4-5) wurde nur bei den Strep-tagII Varianten der SplG durchgeführt, da ausschließlich eine C-terminale His₆-Fusionsvariante existierte, welche dann zur Koreinigung mit einer His₆-SplG geführt hätte. Zudem führt die Verwendung von zwei pExp17-Plasmiden, jeweils mit T7 Promotor, zu Konkurrenzexpressionen zwischen SplG und den Assemblierungsproteinen.

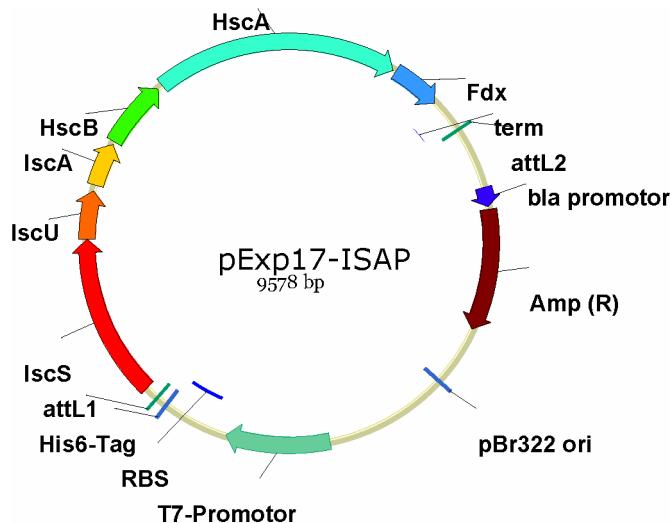


Abbildung 4-5: Darstellung des Plasmids pExp17-ISAP (=Iron-Sulfur-Assembly-Proteins) zur Koexpression mit pExp007-SplG.

Im Folgenden sind die analytischen SDS-Gele und Fotoaufnahmen von zwei favorisierten Expressions- und Reinigungsvarianten der SplG dargestellt.

Tabelle 4-3: Bedingungen für eine Expression der SplG aus *G. stearothermophilus* (hoher Dimeranteil).

<i>E. coli</i> K12-Substamm	Tuner (DE 3) pLysS
Wachstumstemperatur	37°C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	0,6
Endkonzentration IPTG	1mM
Zeitdauer der Induktion	12h
Induktionstemperatur	22°C
Schüttlerumdrehungen	150 rpm

Die erste SplG Form wurde mit einem His₆-Tag, welcher unmittelbar am N-Terminus fusioniert war, exprimiert und gereinigt. Das heterologe Expressionsystem besteht aus dem pET101-D-SplG Plasmid und den in Tabelle 4-3 aufgeführten Daten.

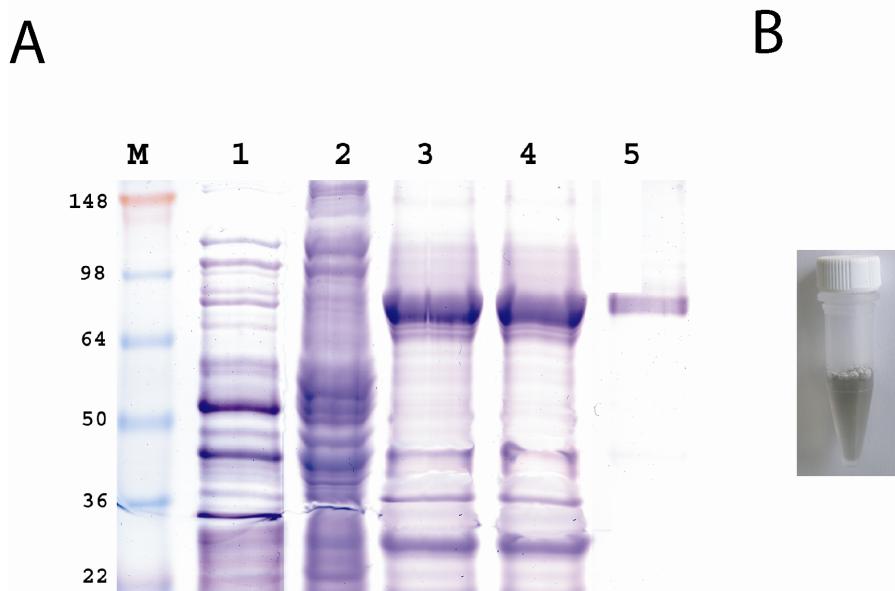
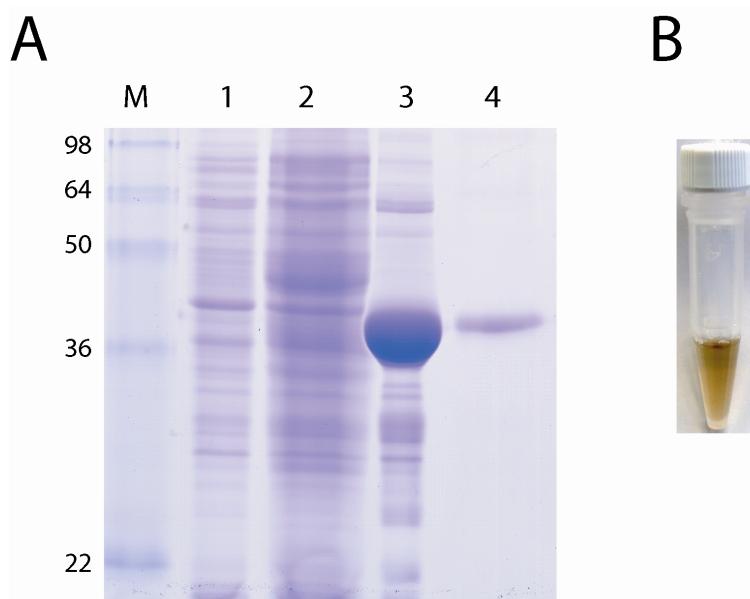


Abbildung 4-6: **A)** Spur M: Proteingrößenmarker, Spur 1: gesamtes Zellextrakt vor der Induktion, Spur 2: gesamtes Zellextrakt nach der Induktion mit IPTG, Spur 3: gereinigte SplG nach His₆-Tag-Reinigung, Spur 4: gereinigte SplG nach anaerober Rekonstituierung, Spur 5: homogen gereinigte SplG Dimer nach SEC (size exclusion) Reinigung **B)** Farbfoto der gereinigten SplG (7,5mg/mL)

Zum Medium wurde nach dem Autoklavieren Fe(III)-Citrat (100 μ M) zugegeben. Zum Aufschlusspuffer wurden *L*-Cystein (5 mM), Ammoniumeisensulfat (20 mM) und ATP (10 mM) zugegeben. Während des Aufschlusses und Zentrifugations schriffs färbt sich das Zellextrakt bräunlich schwarz. Die oberste Bande in den Spuren 3-5 der Abbildung 4-6 entspricht einer Masse von \sim 81 kDa. Die monomere Form der Sporenphotoproduktlyase hat ein Molekulargewicht von \sim 40,5 kDa. In einer vorhergehenden Publikation wurde ebenfalls eine Dimerisierung beobachtet, so dass auch hier von einer Homodimerform ausgegangen werden kann.^[137] Insgesamt scheinen die jeweiligen Proteine nicht nur einer Proteinform zu bestehen, da Doppelbanden zu erkennen sind. Diese Vermutungen wurden durch spätere Untersuchungen zur Homodimerbildung auch bestätigt. Unter den genannten Expressionsbedingungen kommt es zu einem sehr hohen Grad an Homodimerbildung. Dieses lässt sich durch die langen Expressionszeiten bei niedrigen Temperaturen und die Verwendung des kurzen His₆-Tags erklären. Ob SplG Dimerisierung unter biologischen Bedingungen in den Sporen ebenfalls stattfindet, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt.

Tabelle 4-4: Bedingungen für eine Expression der SplG aus *G. stearothermophilus*. (hoher Monomeranteil)

<i>E. coli</i> K12-Substamm	Tuner (DE 3) pLysS
Wachstumstemperatur	37°C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	0,4
Endkonzentration Anhydrotetracyclin	400 µM
Zeitdauer der Induktion	4h
Induktionstemperatur	37°C
Schüttlerumdrehungen	150 rpm

**Abbildung 4-7:** A) Spur M: Proteingrößenmarker, Spur 1: gesamtes Zellextrakt vor der Induktion, Spur 2: gesamtes Zellextrakt nach der Induktion mit Anhydrotetracyclin, Spur 3: gereinigte SplG-Monomer nach Strep-tagII Reinigung, Spur 4: homogen gereinigte SplG nach SEC Reinigung ; B) Farbfoto der gereinigten SplG (6mg/mL).

Die Expression mit dem pExp-007-SplG Plasmid wurde unter den in Tabelle 4-4 angegebenen Expressionsbedingungen durchgeführt. Außer der Zugabe von Fe(III)-Citrat (100µM) in das Medium zur Expression wurden keine weiteren Zusätze während der Expression oder dem Zellaufschluss hinzugegeben. Diese Expression findet, im Vergleich zu der oben beschriebenen, bei einer um 15°C höheren Temperatur statt und ist um 8 Stunden kürzer. In Abbildung 4-7 ist ein analytisches Gel dargestellt, in dem die monomere Form des SplG Enzyms (~40,5 kDa) über 90% des Gesamtproteins nach der Reinigung ausmacht. Die Verwendung des Strep-tagII ermöglicht eine nahezu homogene Reinigung nach bereits einem Reinigungsschritt. Der Eisen-Schwefel Cluster ist in dieser Form ebenfalls vorhanden und führt bei einer Konzentration von 6mg/mL zu einer braun-gelben Proteinfärbung (vgl. Abbildung 4-7B).

Zur eindeutigen Proteinidentifizierung, wurde die potentiell SplG enthaltende Coomassie gefärbte Bande ausgeschnitten und wie unter 3.6.1 beschrieben weiter analysiert. Dabei wurden die grau markierten Mollekulargewichte, wie in Abbildung 4-8 dargestellt, eindeutig den theoretisch zu erwartenden Mollekulargewichten zugeordnet. Das isolierte Protein ist also definitiv die Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilus*.

MKPFVPKLVYFEPEALSYPLGQELYEKFTQMGIEIRETTSHNQVRGIPGETELARYRN
AKSTLVVGVRRTLKFDSKPSAEYAIPLATGCMGHCHYCYLQTLGSKPYIRVYVNL
DDIFAQAQKYIDERAPEITRFEAACTS DIVGIDHLTHSLKKAIEFIGATDYGRLRFVTK
YEHVDHLLDAKHNGKTRFRFSVNSRYVINHFEPGTSSFDARLQAARKVAGAGYKLG
FVVAPIYRHDGWEQGYFELFQELARQLEGVDLSDLTFELIQHRFTKPAKRVIEQRYPK
TKLDLDESKRYKWGRYIGKYYVRDKEARELEETMCSYIARFFPSAQVQYFT.

Abbildung 4-8: Proteinidentifizierung durch MALDI-MS; die experimentell bestimmten Massen der rot markierten Peptide wurden eindeutig den theoretischen Massen zugeordnet.

Die Expression wurde, um große Mengen an SplG herzustellen, in bis zu 12 x 2L Erlenmeyerkolben durchgeführt, wobei das Volumen pro Kolben 1 L nicht überstieg. Nach der jeweiligen Affinitätsreinigung wurde eine SEC durchgeführt. Am Ende wurde das Protein mit Hilfe von Zentrifugationsmembranen, entsprechend der jeweiligen Verwendung, auf 2-12 mg/mL eingeengt. Mit dieser Expressionsmethode konnten bis zu 2mg/L Expressionsansatz SplG homogen gereinigt werden.

4.1.3 Homodimeruntersuchungen zur SplG

Zur Untersuchung der Homodimeren SplG wurde die N-terminalen His₆ Tag Variante verwendet. Das Dimer wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen gereinigt und exprimiert.

SEC-Untersuchungen

Nach der ersten Affinitätsreinigung (vgl. Abbildung 4-6) wurde ein analytischer SEC-Schritt durchgeführt, um die Proteingrößen genauer zu definieren. Bei diesem Chromatogramm zeigen sich bei Messung der Absorption bei 280 bzw 260 nm vier Hauptpeaks. Dabei zeigte sich, dass der erste Peak nach einem Elutionsvolumen von ca. 40 mL eine höhere Absorption bei 260 nm als bei 280 nm hat. Die Vermutung, dass es sich hierbei um Sporenphotoproduktlyase handelt, welche in hohen Mengen DNA gebunden hat, bestätigte

sich, da sich diese Fraktionen in einem DNA-Agarose Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) anfärben ließen.

Durch diese extreme DNA Bindung liegt das Molekulargewicht sogar außerhalb des Säulentrennbereiches, welcher bei 600 kDa liegt. Der zweite und auch höchste Peak enthält dass SplG Dimer, welches in Abbildung 4-6 durch diesen Reinigungsschritt homogen erhalten wurde. Diese Dimerfraktionen wurden auch für die weiter unten beschriebene Behandlung mit TCEP und der Gesamtlängenmessung im MALDI verwendet. Der dritte Hauptpeak enthält ebenfall einen erhöhten DNA Anteil, der an der Monomervariante der SplG gebunden ist. Dieser Anteil muss jedoch deutlich geringer sein, da ein DNA Nachweis im Agarosegel nur geringe DNA Mengen zeigte. Die Frage, warum der Monomeranteil der Sporenphotoproduktlyase eine schlechtere DNA Bindung aufweist, bleibt jedoch unbeantwortet.

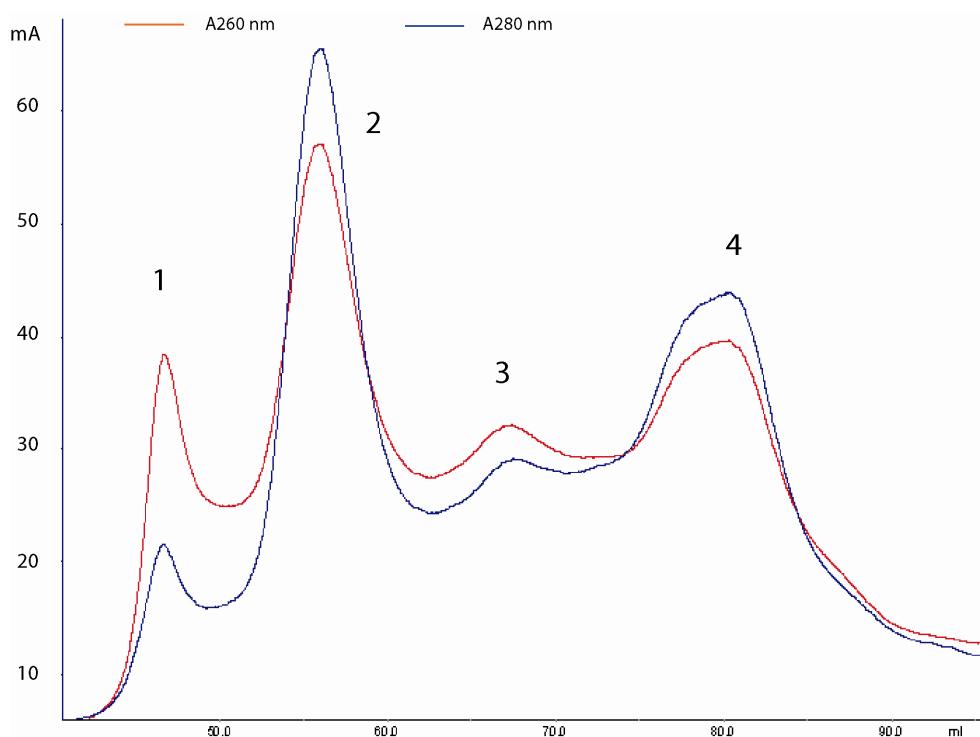


Abbildung 4-9: Analytisches FPL-Chromatogramm von einem SEC Lauf mit SplG nach Ni-NTA Reinigung

Im letzten Peak befinden sich stark C-terminal verkürzte Varianten der SplG, welche durch die relativ lange Expressionszeit in *E. coli* proteolytisch erzeugt wurden, und im Falle einer kurzen Expressionszeit bei höheren Temperaturen nicht auftreten.

TCEP-Behandlung

Um die Bindungsart und Stärke weiter zu charakterisieren, wurden die Dimer- und Monomervarianten mit einem starken Reduktionsmittel behandelt. Dazu wurden die durch SEC voneinander getrennten Dimer und Monomer Varianten der SplG mit ansteigenden TCEP Konzentrationen (1-250 mM) behandelt und im Anschluss auf einem SDS Gel mit Auftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol durch Elektrophorese analysiert. Durch die Behandlung mit TCEP sollten alle Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden. Dabei zeigte sich, dass es sich bei der angedeuteten Doppelbande der Dimerform tatsächlich um zwei verschiedene große Dimerformen handelt. Die größere Dimerform wurde erst durch relativ hohe Reduktionsmittelkonzentrationen von der kleineren Dimerform getrennt. Die kleinere Dimerform wird erst bei einer Konzentration von 125 mM TCEP zu einer scharfen Bande. Zur Dimertrennung und damit der Beweis, dass die Dimerisierung ausschließlich über eine Disulfidbrücke stattfindet, konnte jedoch selbst bei einer Konzentration von 250 mM TCEP nicht erbracht werden. Bei der monomeren Form konnte durch die Verwendung von ansteigenden TCEP Konzentrationen gezeigt werden, dass eine intramolekulare Disulfidbildung wahrscheinlich vorhanden ist. Denn hohe TCEP Konzentrationen führten zu schärferen Banden, da es erst durch die Spaltung von intramolekularen Disulfidbrücken zu einer homogenen Konformation (= totale Denaturierung) des Proteins kommt. Durch diese Analysemethode konnte desweiteren gezeigt werden, dass sowohl Monomer als auch die Dimer Variante mit His₆-Tag und langen Expressionszeiten C-terminal proteolytisch verdaut werden.

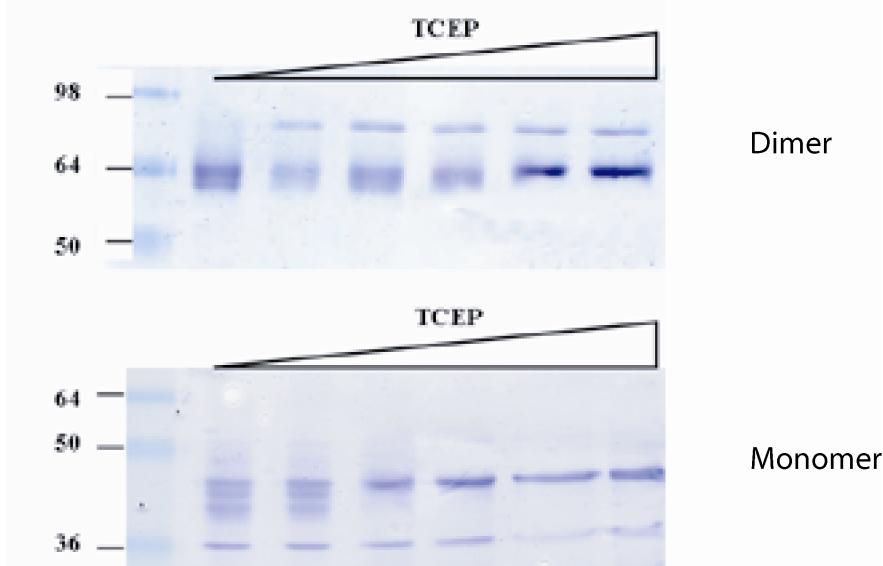


Abbildung 4-10: Analytisches SDS-Gel von gereinigten Dimer bzw. Monomervarianten. Die Proben wurden von links nach rechts mit ansteigenden Konzentrationen an TCEP (1-250mM) vorinkubiert.

Durch die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken sind die elektrophoretischen Laufeigenschaften der Dimervariante so stark beinflusst, dass die beiden Fragmentgrößen eine breite diffuse Bande erzeugen. Erst die Zugabe von großen Mengen an Reduktionsmitteln führt zu einer Bildung von scharfen Banden. Ob eine Disulfidbrücke zwischen Cys-141 und Cys-326 in der Monomervariante bzw. zwischen der Dimervariante existiert, konnte dadurch jedoch nicht eindeutig geklärt werden.

MALDI-Messung

Um die Größen der proteolytischen Abbaufragmente besser bestimmen zu können, wurden MALDI-MS Studien mit den gereinigten Dimer Proteinlösungen ohne vorangegangene Trypsinierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass auch durch die Laserenergie des Massenspektrometers die Dimere nicht vollständige in Monomere SplG-Varianten gespalten werden (Abbildung 4-11).

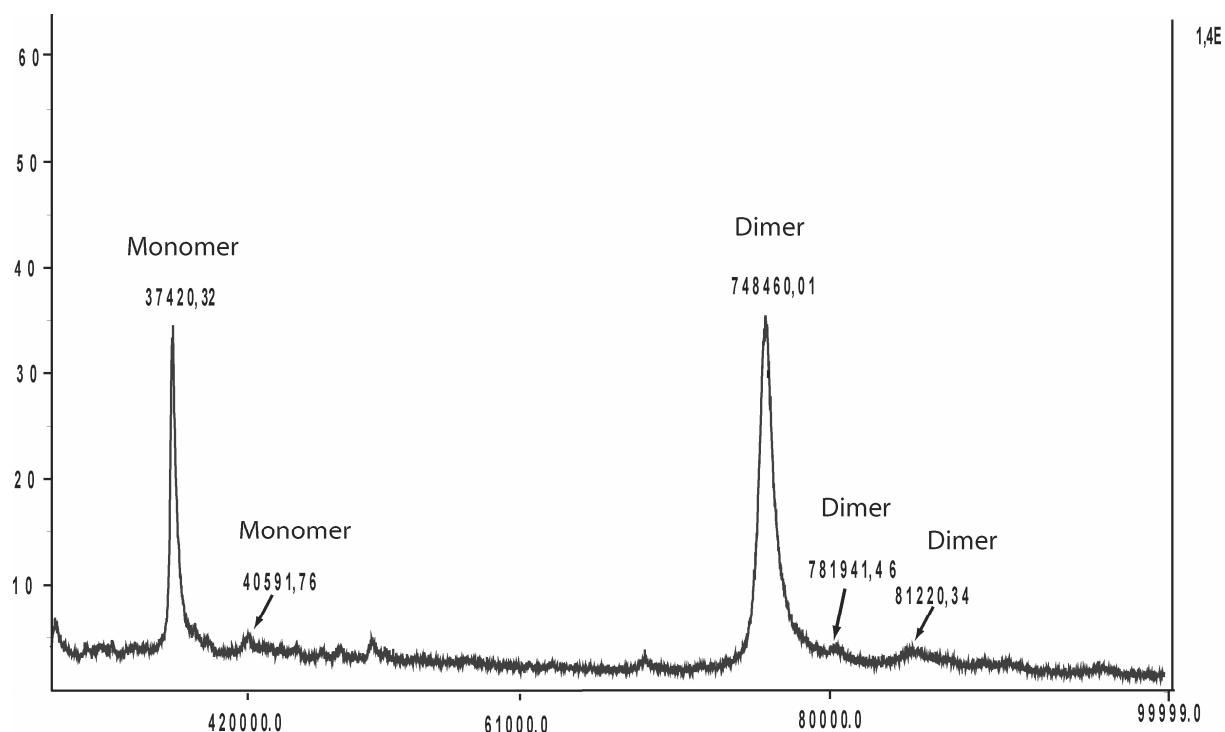


Abbildung 4-11: MALDI-TOF Analyse der gereinigten apo SplG Dimer-Form.

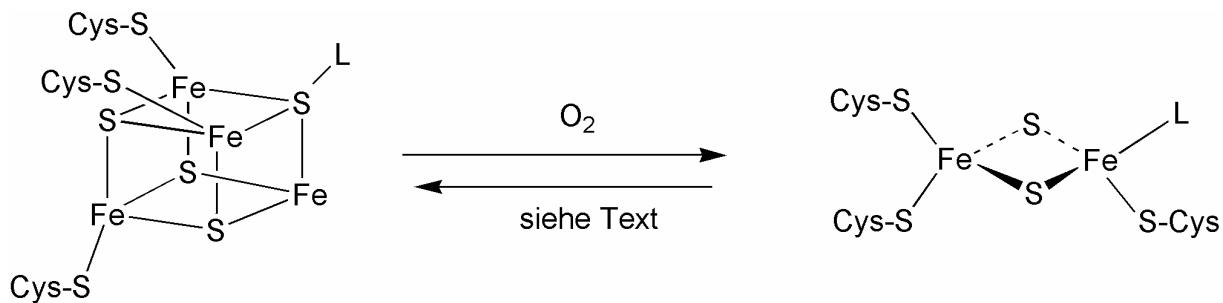
Des Weiteren ist zu sehen, dass es sich zu einem Großteil um eine Dimervariante aus den zwei proteolytisch verdauten Monomereinheiten handelt (MW~74,8 kDa). Die Dimermischung aus verkürzter und volllängen Variante bildet sich nur zu einem sehr geringen Anteil (MW~78,2 kDa). Die Dimerbildung aus zwei volllängen SplG-Proteinen ist ebenfalls nur zu einen geringen Anteil im Massenspektrometer zu beobachten (MW~81,2

kDa). Bei den Monomeren macht der Peakanteil des um ~2,5 kDa verkürzten SplG Proteins (MW~ 37,4kDa) mehr als 90% des Monomeranteils aus. Die Vollängen Variante des Monomers erzeugt hingegen nur ein schwaches Massensignal (MW~ 40,5 kDa).

Die erhaltenen Massendaten bestätigen die Daten der Dimeruntersuchung im SDS-Gel (hohe TCEP Konzentration). Es entsteht zu einem Großteil SplG Dimer aus zwei verkürzten SplG Proteinen und nur zu einem geringen Anteil aus verschiedenen Längen bzw. zwei Vollängen SplG Proteinen. Dabei ist natürlich zu bedenken, dass eine MALDI-TOF Messung nicht quantitativ ist, und sehr wahrscheinlich die längeren Proteinfragmente schlechter ionisiert werden und damit auch schlechter detektiert werden können. Warum die Dimersierung der verkürzten Versionen eine favorisierte Struktur darstellt, lässt sich jedoch mit den bisherigen Untersuchungen nicht aufklären.

4.1.4 Rekonstitution des [4Fe-4S] Clusters in der Sporenphotoproduktlyase

Nach Aufschluss der *E. coli* Zellen und eine über mehrere Stunden dauernde Proteinreinigung kommt es durch die lange Sauerstoff Exposition zu einer $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Cluster-Konversion in einen $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ Cluster (Abbildung:4-12).^[237] Diese Clusterumwandlung wurde bereits bei drei weiteren Proteinen der Radikal-SAM-abhängigen Enzymfamilie beobachtet.^[238] So wurde lange Zeit bei der Biotinsynthetase darüber diskutiert, ob es sich bei dem Eisen-Schwefel Cluster um einen $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ oder $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ Cluster handelt. Es stellte sich schließlich heraus, dass abhängig von einer aeroben oder anaeroben Enzympräparation der $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ in einen Cluster $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ konvertiert wird.^[239] Dieselben Ergebnisse wurden bei anaeroben bzw. aeroben spektroskopischen Untersuchungen mit der Ribonukleotidreduktase und Lipoat-Synthetase erhalten. Bisher wird die Sauerstoffflabilität mit der fehlenden Koordinierung eines der vier Fe-Atome erklärt, wobei diese Hypothese noch nicht ausreichend belegt ist. Des Weiteren ist unklar, ob eine Expression in *E. coli* zu einer quantitativen Bildung von einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ pro Enzym führt. Da eine anaerobe Reinigung nur mit beträchtlichem apparativem Aufwand zufriedenstellend abläuft, wurde das SplG Protein aerob gereinigt und im Anschluss der $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ Eisen-Schwefel Cluster wieder rekonstituiert.^[238, 240]



Schema: 4-2: Zerfall des kubischen [4Fe-4S] Cluster in einen[2Fe-2S] Cluster. (L= Ligand, z.B. SAM)

Zur Eisen-Schwefel Cluster Rekonstituierung können prinzipiell drei verschiedene Methoden verwendet werden. Bei den ersten beiden Methoden werden durch unterschiedliche Verfahren reduzierende Bedingungen hergestellt, und durch die Zugabe von freien Fe^{3+} und S^{2-} die Rückbildung des [4Fe-4S] Clusters herbeigeführt. Die Reduktion bei der ersten Methode erfolgt über die Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithiotreithol und Natrium-Dithionit. Bei der zweiten Methode erfolgt das Erzeugen von reduzierenden Bedingungen durch eine Photoreduktion mit z.B. Desazaflavin. Die dritte und auch aufwendigste Eisen Schwefel Cluster Rekonstituierung erfolgt mit Hilfe von Enzymen. Hierbei werden die ISC Proteine (*Iron-sulfur-Cluster*), welche für die *in vivo* Assemblierung von Eisen-Schwefel Clustern verantwortlich sind, benutzt (vgl. Abbildung 4-5). Diese Proteine müssen gereinigt werden und in Gegenwart von L-Cystein bzw. Fe^{3+} mit dem zu rekonstituierenden Protein inkubiert werden. Diese Proteine führen dann die Cluster Assemblierung *in vitro* durch. Da es keine vergleichbaren Studien zu den Effektivitäten der einzelnen Methoden gibt, wurde bei der [4Fe-4S] Cluster Rekonstituierung in der SplG die erste beschriebene Methode verwendet. Die Rekonstituierung wurde in einer Glovebox mit einem N_2 -Gehalt von 95 %, H_2 -Gehalt von 5 % und einer Sauerstoffkonzentration von < 2 ppm durchgeführt. Die Übergänge von einem „zerfallenen“ Eisen Schwefel Clusters in einen intakten [4Fe-4S] wurden nicht genauer analysiert. Beobachtet wurde, dass die SplG bei einer über Nacht andauernden Sauerstoffexposition die braune Färbung verliert. Das Vorhandensein des [4Fe-4S] Clusters nach dem Rekonstituieren wurde jedoch durch zahlreiche, im nächsten Abschnitt beschriebene, spektroskopische Verfahren kontrolliert. In dieser Form bleibt das SplG Protein in der Glovebox für mehrere Tage bei 4°C ohne Farbverluste stabil.

4.1.5 Spektroskopische Eigenschaften der Sporenphotoproduktlyase

Die qualitative und quantitative Existenz des Eisen Schwefel Clusters lässt sich durch verschiedene spektroskopische Messungen nachweisen. Zuerst wurde ein UV-Vis Spektrum der SplG mit einer Proteinkonzentration von 0,8 mg/ml aufgenommen. Diese Messung wurde mit der rekonstituierten SplG durchgeführt. Hier zeigte sich eine breite Absorption im Bereich von 410 nm. Dieser Absorptionspeak kommt durch den Ladungstransfer des Eisen-Schwefel Clusters zustande. Die Absorption bei 410 nm hat neben der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm den zweitgrößten Absorptionspeak. Die Absorption bei 410 nm ist charakteristisch für einen $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Cluster. Die Rekonstituierung hat also erfolgreich funktioniert, da die Absorption eines $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ Clusters andere Absorptionsmaxima (330 nm, 420 nm, 460 nm und 560 nm) aufweisen würde.^[241, 242]

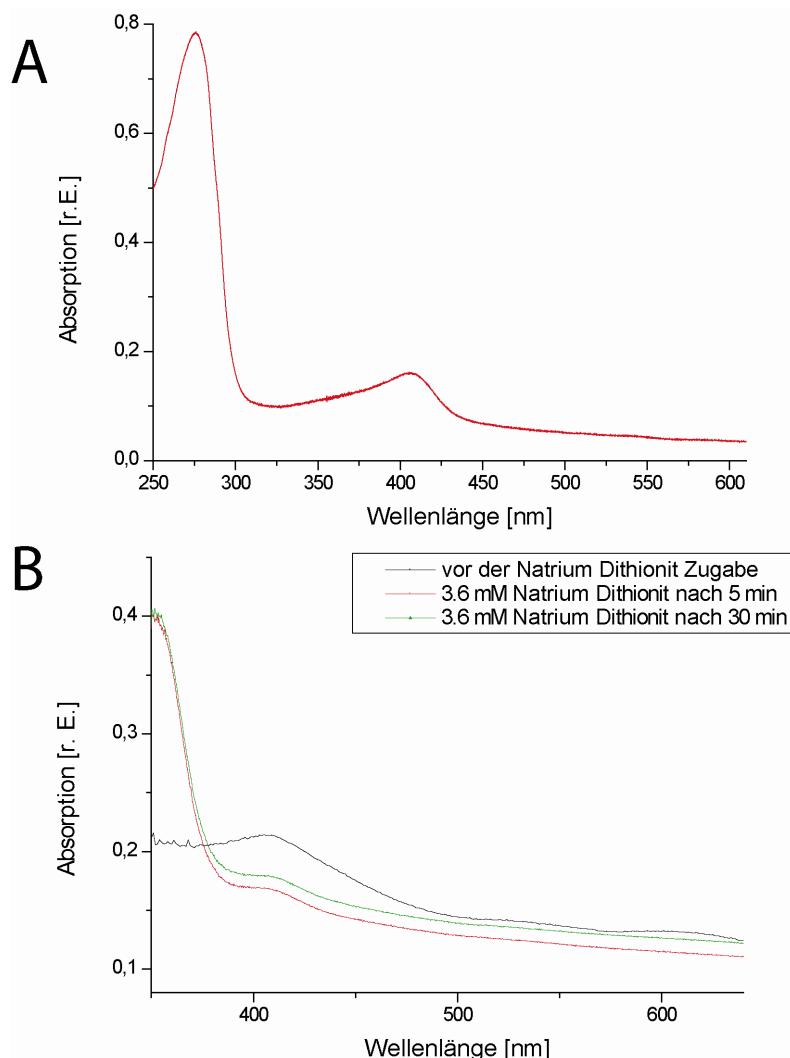


Abbildung 4-12: A) UV-Vis Spektrum der rekonstituierten SplG. B) Reduktion des $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Clusters mit Natrium Dithionit führt zu einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ Cluster mit veränderten spektroskopischen Eigenschaften.

Ein weiterer Beweis für die vollständige Rekonstituierung zum $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Cluster ergibt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten des Clusters. Dieser Extinktionskoeffizient liegt bei einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Cluster bei $\epsilon_{410} \approx 15,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, welcher sehr gut zu dem durch Messungen erhaltenen Extinktionskoeffizienten des SplG Proteins von $\epsilon_{410} \approx 13,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ passt. Des Weiteren zeigt die Behandlung mit dem Reduktionsmittel Natrium-Dithionit eine Absorptionsabnahme im Bereich von 410 nm. Diese Absorptionsabnahme wird durch die Umwandlung des rekonstituierten $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Clusters zu einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ hervorgerufen und zeigt damit, dass der Cluster redoxaktiv ist und somit prinzipiell die katalytische Funktion als Elektronen-Akzeptor bzw. -Donor übernehmen kann.

Eine weitere spektroskopische Messmethode, um die Art des Eisen-Schwefel Cluster zu bestimmen, ist die EPR Spektroskopie (Abbildung 4-13 A-D). Dazu wurde das SplG Protein zuerst von einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Cluster, welcher kein Signal im EPR ergibt, durch Zugabe von 10 mM Dithionit zu einem $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ reduziert. In diesem reduzierten Zustand lassen sich EPR Spektren aufnehmen, die Aufschluss über die Art des Eisen Schwefel Clusters geben.

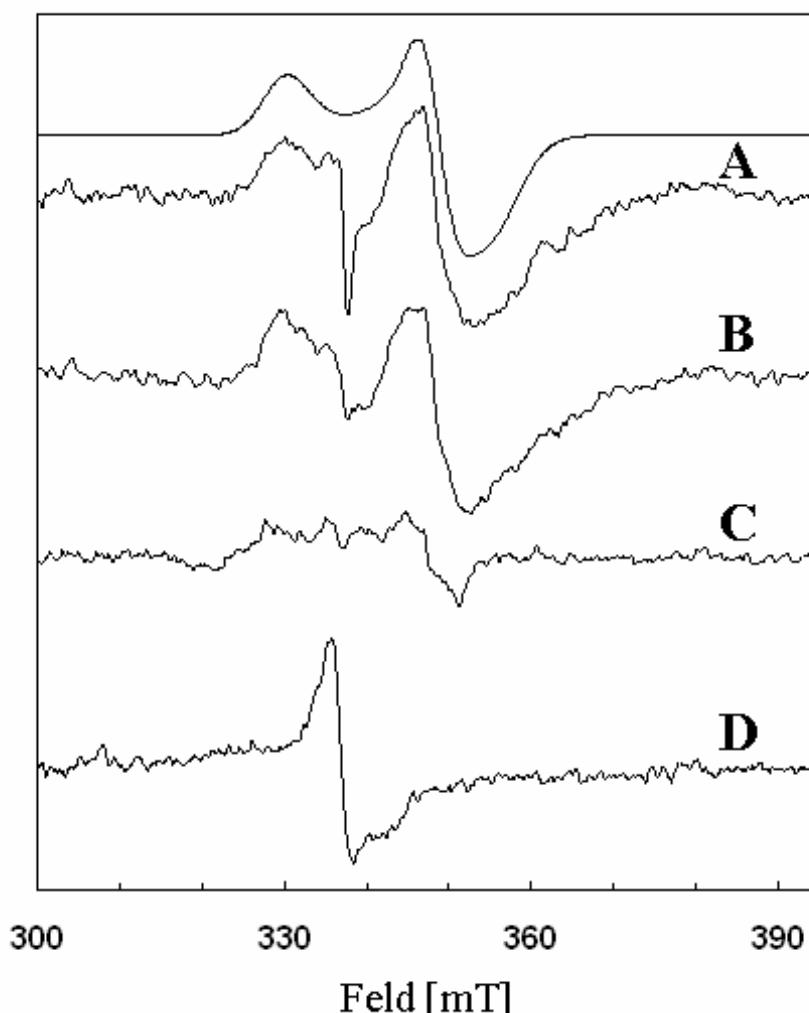


Abbildung 4-13: EPR –Spektren der SplG. (Aufgenommen von Dr. A. Pierik, Universität Marburg)

Das in Abbildung 4-13 A dargestellte rhombische EPR-Signal wurde bei 4,2 K aufgenommen und zeigt g-Werte von 2,04, 1,93 und 1,89. Die Existenz von einem g-Wert über g = 2,0 und zwei g-Werten unter g = 2,0 ist typisch für reduzierte $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$. Da $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ -Zentren in der Regel nur bis zu Temperaturen < 40 K detektiert werden, wohingegen $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$ -Zentren bis zu Temperaturen von < 70 K gut detektiert werden können, kann eine Differenzierung erfolgen.^[243] Jedoch konnte keines von beiden EPR-Signalen bei Temperaturen bis zu 70 K detektiert werden. Damit muss die Existenz von $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ -Zentren in dieser SplG Probe ausgeschlossen werden. Da das Spektrum insgesamt jedoch eine geringe Signalintensität aufweist, ist in Abb. 4-13, eine von *Dr. Antonio Pierik* durchgeführte Simulation dargestellt, welche die angegebenen g-Werte auch bestätigt. Nach der anaeroben Zugabe von S-Adenosylmethionin (SAM) ändert sich das EPR Signal aufgrund der SAM Bindung an den $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$. Dieses führt insgesamt zu einer Signalintensitätsabnahme (Abbildung 4-13 B). In Abbildung 4-13 C ist das EPR Spektrum der SplG dargestellt, nachdem ein Dimersubstrat (synthetisches 5S-Sporenphotorprodukt) hinzugegeben wurde. Die enzymatisch katalysierte Spaltung dieses Dimers wird im Kapitel 4.2 näher beschrieben. Durch die Zugabe kommt es zu einer weiteren Abnahme der Signalintensitäten, so dass man davon ausgehen kann, dass ein Teil des $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ Clusters in der SplG wieder in der oxidierten $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ Form vorliegt. Eine längere aerobe Behandlung der SplG Probe führt zu einer vollkommen Änderung des EPR Spektrums, was auf den Zerfall des $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ Clusters hindeutet (4-13 D).

4.1.6 Kristallisationsversuche mit apo-SplG Homodimer

Die Sporenphotoprodukt-Erkennung und -Bindung durch die Sporenphotoproduktlyase ist weiterhin nicht geklärt. Ebenfalls ist noch unbekannt, ob es sich bei der Sporenphotoproduktlyase artübergreifend um eine Dimer- oder Monomerform handelt. Zur Beantwortung dieser noch offenen Fragen wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe von *PD. Dr. Ilme Schlichting* am MPI in Heidelberg Kristallisationsversuche zur anschließenden Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Dazu wurde die Homodimerform der SplG aerob gereinigt und am Ende in einen Tris-HCl Puffer (100 mM pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM TCEP) umgepuffert. Die Umpufferung und Konzentrierung wurde in einem Amicon (Millipore, *cut-off* 10 KDa) 15 mL Gefäß durchgeführt. Das Protein wurde auf 12 mg/mL konzentriert. Es wurden 6000 verschiedene Kristallisationsbedingungen unter aeroben Bedingungen getestet. Unter einigen Bedingungen konnte Kristallwachstum über Nacht beobachtet werden. Die Salz- und pH-Werte einer vielversprechenden Bedingung wurden weiter variiert, um größere Kristalle zu erhalten. Nach zahlreichen Ansätzen konnten die Kristalle auf eine messbare Größe optimiert werden. Die erhaltenen Kristalle sind in Abbildung 4-14 dargestellt. Diese obeliskartige Kristallform wächst innerhalb von zwei Tagen. Trotz großer Proteinmengen und damit einer Vielzahl von Optimierungsarbeiten konnte die Auflösung der Röntgen-Diffraktogramme bis heute nur bis 7,5 Å gebracht werden. Eine damit berechnete Kristallstruktur führte leider zu keinen gesteigerten Informationsgehalt, bzgl. DNA Bindung und SP Reparatur.

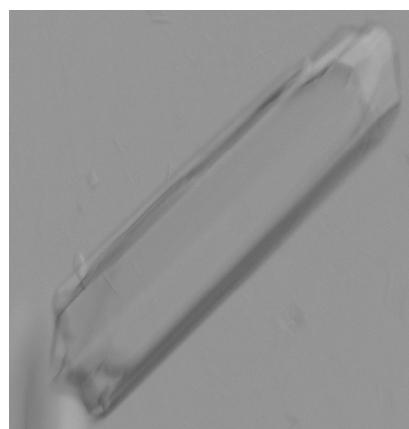


Abbildung 4-14: Kristall von apo-SplG ohne DNA und Kofaktor.

4.1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Durch Sequenzvergleiche der DNA Segmente *upstream* und *downstream* der Sporenphotoproduktlyasegene aus *Bacillus subtilis* und *Geobacillus stearothermophilus* konnte gezeigt werden, dass die Negativregulation durch SplA in *G. stearothermophilus* nicht stattfindet. Weder in der unmittelbaren Umgebung des SplG Gens, noch innerhalb des kompletten *G. stearothermophilus* Genoms konnte auf DNA oder Proteinebene eine SplA homologe Sequenz identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine stabile thermophile Version der Sporenphotoproduktlyase kloniert, exprimiert und homogen gereinigt werden. Nur durch die Änderung der Expressionsbedingungen und Plasmidauswahl wird ein Zugang zu einer Monomer und Dimervariante ermöglicht. Die exprimierte Sporenphotoproduktlyase (SplG) liegt bei langen Expressionszeiten mit N-terminalen His₆-Tag zu 90 Prozent als Homodimervariante vor. Werden die Expressionszeiten verkürzt und ein Strep-tagII am N-terminus fusioniert, liegt das Protein zu über 90 % als Monomerform vor. Die Homodimervariante ist selbst bei hohen Konzentrationen an Reduktionsmitteln stabil.

Die Reinigung wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt, so dass der [4Fe-4S]¹⁺ Cluster durch den Luftsauerstoff zerfällt. Die Rekonstituierung des Eisen-Schwefel Clusters konnte unter anaeroben Bedingungen in einer *Glovebox* erfolgreich etabliert werden. Die Rekonstituierung konnte im Anschluss durch verschiedene spektroskopische Verfahren, wie UV-Vis- und EPR-Spektroskopie, als erfolgreich bestätigt werden. Durch initiale Kristallisationsexperimente konnten zum ersten Mal Kristalle des SplG Proteins erzeugt werden. Hier sind weitere Optimierungen notwendig, um die Auflösung zu verbessern. Das Protein steht als rekonstituierte und aktive Variante für weitere enzymatische Studien in großen Mengen zur Verfügung.

4.2 Reparatur des Sporenphotoproduktes

Die enzymatische Aktivität der Sporenphotoproduktlyase wurde bislang ausschließlich mit undefinierten Substraten analysiert. In dem folgenden Abschnitt werden definierte Sporenphotoprodukte in den jeweiligen Assay eingesetzt, um neue Informationen bzgl. der Substratdiskriminierung und Reparatureffizienz zu erhalten.

Bei den verwendeten Substraten handelt es sich um vollsynthetische Sporenphotoprodukt-Dimere oder um ein Sporenphotoprodukt in einzelsträngiger DNA, welches durch Belichtung erzeugt wurde. Die jeweiligen Enzymassays wurden unter anaeroben Bedingungen mit dem rekonstituierten SplG Protein durchgeführt.

4.2.1 Photochemische Herstellung und Reinigung des Sporenphotoproduktes in DNA

Bis zu dieser Arbeit waren keine Informationen zur Herstellung eines natürlichen und definierten Sporenphotoproduktes durch UV-Bestrahlung in DNA veröffentlicht, so dass zunächst diverse Belichtungsbedingungen getestet wurden, um die größtmögliche Ausbeute und Reinheit eines Sporenphotoschadens in DNA zu ermitteln. Die Anwesenheit von DPA hat eine nachgewiesene große Auswirkung auf die Menge und Art der entstehenden Photodimerschäden, wobei die Eigenabsorption von DPA aus photophysikalischer Sicht die wesentliche Ursache dafür ist.

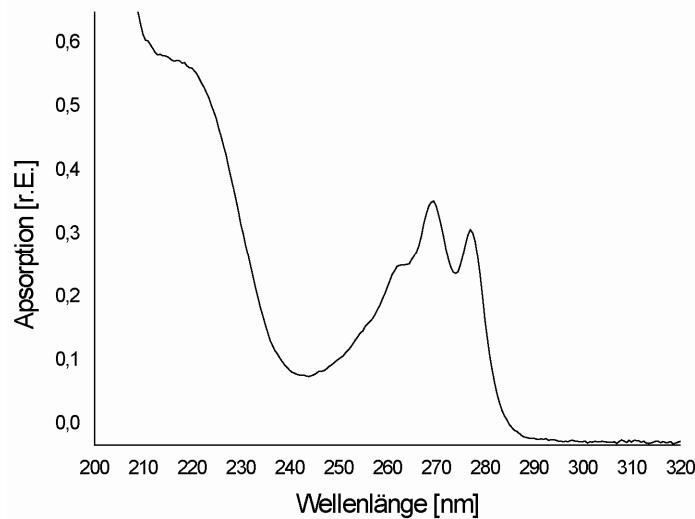


Abbildung 4-15: UV-Vis Spektrum von Pyridin-2,6-dicarbonsäure.

Aus diesem Grund wurde ein Absorptionsspektrum von DPA in wässriger Lösung bei einem physiologischen pH-Wert von 7,0 aufgenommen. Dazu wurde das Spektrum von 350-200 nm einer 100 μ M DPA-CaCl Lösung in einem UV-Vis Spektrometer gemessen (Abbildung 4-15).

Dabei zeigte sich, dass der DPA-Ca Komplexes mehrere Absorptionsmaxima aufweist. Das langwelligste liegt bei 280 nm, zwei weitere bei 270 nm bzw. 260 nm und das kurzwelligste bei 220 nm. Insgesamt ist die Absorption im UV-C und UV-B Bereich sehr hoch. Deshalb wurde für die Belichtungsexperimente eine Wellenlänge von 254 nm für die Generierung des Sporenphotoschadens in DNA verwendet.

Als nächstes wurde für die Bestimmung des optimalen DPA-CaCl/DNA Verhältnisses eine Messreihe mit unterschiedlichen DPA-CaCl₂ Konzentrationen durchgeführt. Die DNA Konzentration wurde dazu konstant auf 125 µM in einer Lösung (pH 7,0, 100 mM NaCl) eingestellt und die jeweiligen Menge an DPA-Ca wurde hinzugegeben. Danach wurden die Lösungen in einer 6-well-Zellkulturschale bis zur Trockenheit lyophilisiert und in einer *Glovebox* eingeschleust. Nach einer konstanten Belichtungszeit von 12 h unter anaeroben Bedingungen wurde der belichtete weiße, poröse Film in den einzelnen Kavitäten mit ddH₂O wieder resuspendiert und auf einer analytischen *rp*-HPLC quantifiziert.

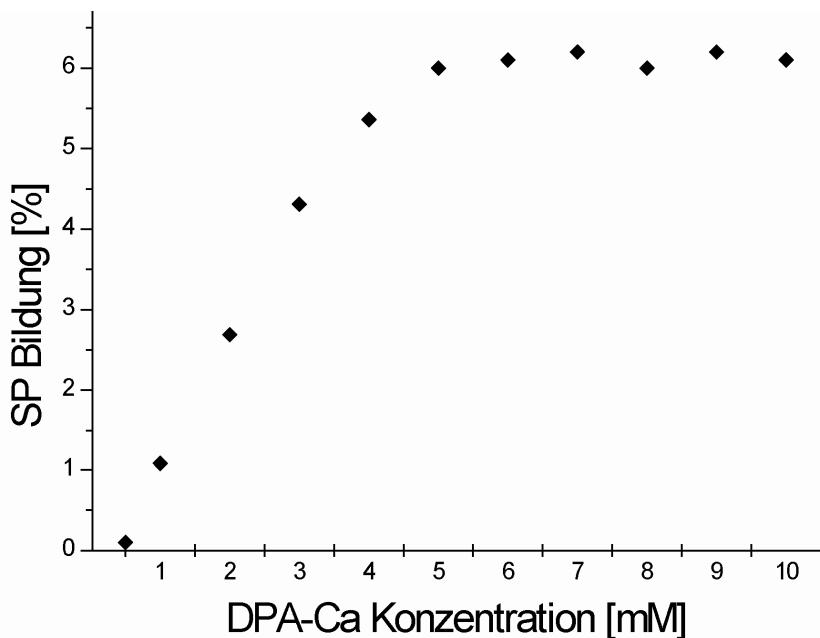


Abbildung 4-16: Sporenphotoproduktbildung (SP) unter Standardbedingungen (12 Belichtungszeit, anaerob, lyophilisiert, 254 nm) und ansteigender DPA-Ca Konzentration.

Für diese Belichtungsexperimente wurde ein DNA Strang mit der Sequenz 5'-GGTTGG-3' verwendet. Die ausgewählte DNA Sequenz lässt sich sehr gut von den entstandenen Photoprodukten auf der *rp*-HPLC trennen. Zudem bilden sich kaum Nebenprodukte bei einer längeren UV Belichtung. Die Peaks auf dem HPL-Chromatogramm wurden integriert, addiert und dann in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-16

zusammengefasst und zeigen einen linearen Anstieg an Sporenphotoproduktbildung (SP) bis zu einer DPA-Ca Konzentration von 5 mM. Bei DPA-Ca Konzentrationen oberhalb von 5 mM kommt es zu keiner vermehrten SP Bildung. Offensichtlich ist die DNA bei diesem Verhältnis gesättigt. Bei sehr hohen DPA-Ca Konzentrationen und damit einer Verschiebungen des Verhältnisses in Richtung DPA-Ca, kommt es zu keiner verbesserten SP Ausbeute. Der stattfindende photochemische Mechanismus weist also ein Maximum auf, welches durch ein Verhältnis zwischen DPA-Ca/ DNA von 40 erreicht wird. Eine Änderung dieses Verhältnisses resultiert nicht in einer Ausbeute Verbesserung, kann aber zu einer Verschlechterung führen.

Für alle weiteren Experimente wurde deshalb eine DPA-Ca Konzentration von 5 mM gewählt, um ein DPA-Ca/ DNA Verhältnis von 40 einzustellen.

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Belichtungsdauer bzw. die Lichtenergie ($\text{J m}^{-2} \text{ min}^{-1}$) variiert, um weitere kinetische Informationen über die SP Bildung zu erhalten. Bei diesem Experiment wurden alle Parameter der vorhergehenden Messreihe übernommen. Es wurde lediglich die Belichtungsdauer variiert. Dazu wurden jeweils nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 16 Stunden in drei verschiedenen Kavitäten 100 μL ddH₂O hinzugegeben. Der lyophilisierte Film wurde mit diesen 100 μL resuspendiert, aus der Glovebox ausgeschleust und durch *rp*-HPLC analysiert. Die Belichtung wurde dazu für ca. 3 min unterbrochen. Die Auswertung erfolgte analog der vorherigen. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 4-17 dargestellt. Hierbei zeigt sich eine fast lineare Zunahme der SP Bildung von der ersten bis zur fünften Stunde.

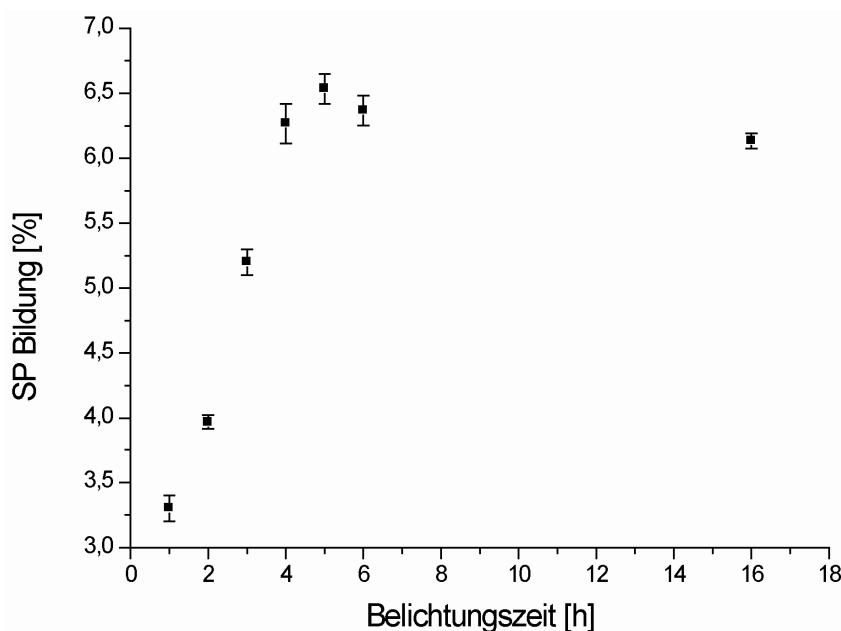


Abbildung 4-17: Sporenphotoproduktbildung mit ansteigender UV-Licht Exposition.

Die SP Bildung innerhalb der ersten Stunde ist jedoch am höchsten. Während der ersten sechzig Minuten bildet sich fast die Hälfte der endgültigen maximalen Ausbeute an SP. Dieses Maximum von 6,6 % wird nach fünf Stunden erreicht. Nach diesen fünf Stunden kommt es wieder zu einer leichten Abnahme an SP. Dieses ist dadurch zu erklären, dass nach dieser Zeit das HPL-Chromatogramm weitere Peaks aufweist. Eine nähere Analyse wurde nicht durchgeführt. Es könnte sich hierbei um CPD, (6-4) Photoproducte oder hydrolysierte Produkte der DNA bzw. Belichtungsschale handeln. Die Nebenproduktbildung steigt nach einer fünfstündigen Belichtungszeit durch den hohen Energieeintrag also stark an. Einen Grund für das Erreichen eines Maximums an SP Bildung könnte auch an der Inhomogenität des DNA/DPA-Ca Films zu finden sein. Dieses Gemisch bildet während dem Lyophilisierungsvorgang keinen homogenen Film. An einigen Stellen ist ein dünner weißer Film zu sehen, der sich auf der Oberfläche der Zellkulturschalen bildet. An anderen Stellen entstehen flockenartige und poröse Strukturen, welche durch äußere Krafteinwirkung zu einem sehr feinen weißen Pulver werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass nur in bestimmten Bereichen des Films der richtig DPA-assoziierten-Komplex vorliegt. Eine reversible Reaktion ist auszuschließen, da sie experimentell nicht beobachtet werden konnte. Dazu wurde gereinigtes SP wieder resuspendiert, lyophilisiert und belichtet. Im HPL-Chromatogramm zeigten sich daraufhin keine neuen Peaks und auch kein Peak im Retentionsbereich von ungeschädigter DNA.

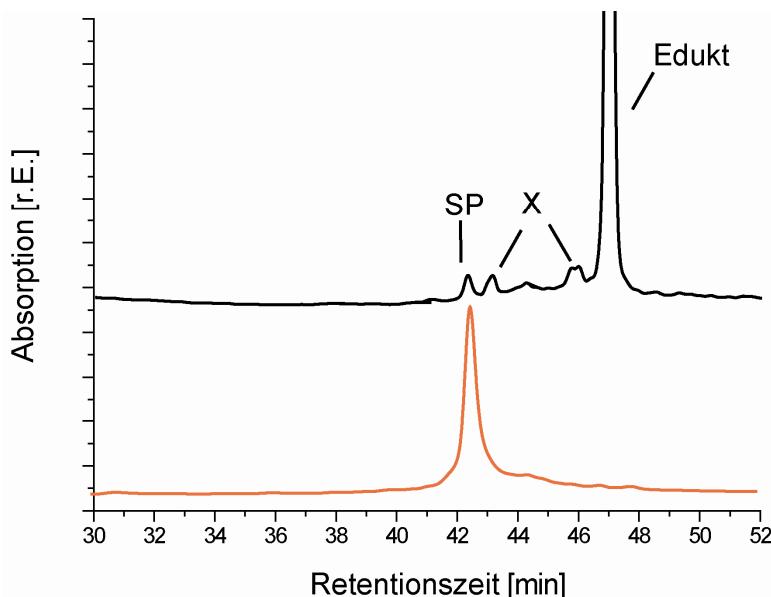


Abbildung 4-18: Präparative Reinigung des SP in DNA nach Belichtung mit UV-Licht. (schwarz: Chromatogramm der gesamten Belichtungsprodukte; rot: Chromatogramm des gereinigten SP in DNA; SP=Sporenphotoprodukt, X=Nebenprodukte, Edukt=ungeschädigte DNA)

Durch die vorhergehenden empirischen Experimente konnten die optimalen Belichtungsbedingungen für eine möglichst saubere und quantitative SP Bildung in DNA ermittelt werden. Für die quantitative Belichtung eines 6mer DNA Einzelstrangs (5'-GGTTGG-3') und eines 9mer DNA Einzelstrangs (5'-GGAATTAAG-3') wurde die DNA deshalb in Gegenwart von 5 mM DPA-Ca lyophilisiert und im Anschluss bei RT für 5 h belichtet. Die Reinigung erfolgte mittels *rp*-HPLC. In Abbildung 4-18 sind die Chromatogramme vor und nach der Reinigung zu sehen. Das schwarz colorierte Chromatogramm zeigt das Peakmuster direkt nach der Belichtung. Es entstehen drei zusätzliche Peaks, von denen der erste (RT: 42,5 min) eindeutig als Sporenphotoprodukt identifiziert werden konnte. Die Identifizierung der Belichtungsprodukte erfolgte durch einen enzymatischen Totalverdau der DNA. Nach diesem Verdau sind die jeweiligen Phosphordiesterbindungen gespalten und liegen als Nukleotide vor. Die verwendeten Enzyme katalysieren nicht die Monomerisierung von Photodimeren, so dass die Photodimere sehr gut durch Massenspektrometrie identifiziert werden können. Dazu wurden die enzymatisch verdauten DNA Proben zuerst durch *rp*-HPLC getrennt und dann auf einem Massenspektrometer mit ESI-Quelle gemessen.

Bei dem zweiten Peak (RT: 43,5 min) handelt es sich um ein Photoprodukt, welches bislang nicht identifiziert werden konnte. Bei dem dritten Peak handelt es sich um Sekundärstrukturen des DNA Strangs. Dieser Peak ist ebenfalls in unbelichteten Fraktionen zu finden und verschwindet fast vollständig, wenn die *rp*-HPLC Säule erhitzt wird. Die Fraktionen des DNA Strangs mit SP wurden gesammelt und entsalzt. Das rot colorierte *rp*-HPL-*Chromatogramm* in Abbildung 4-18 zeigt einen analytischen Lauf des gereinigten DNA Strangs mit SP. In dieser Form wurde der DNA Strang nach einer photometrischen Quantifizierung in die jeweiligen Experimente eingesetzt.

Das Massenspektrum von dieser Messung ist in Abbildung 4-19 A dargestellt. Darin stimmt der dominante Massenpeak von 545,1285 sehr gut mit dem berechneten Massenpeak von 545,1290 für das SP überein. Die gleiche Masse weisen jedoch auch CPD und (6-4) Photoprodukt auf. Aus diesem Grund wurde eine weitere Fragmentierung (MS/MS) der Masse von 545,1285 durchgeführt. Durch den weiteren Energieeintrag kommt es unter anderem zu Spaltung der *N*-glykosidischen Bindung und damit zu einer Nukleotidspaltung in Basen- und Zuckermoleküle.

Als Ergebnis erhält man ein typisches Fragmentierungsmuster, welches für jeden Photodimerschaden einzigartig ist. Das erhaltene Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 4-19 B dargestellt und entspricht dem von Douki *et al.* veröffentlichten Fragmentierungsmuster

für das Sporenphotoprodukt.^[244] Hierbei ist sehr deutlich die Masse des Basendimers mit 251,1 zu sehen. Zusätzlich sind die Massen des Deoxyribosephosphatrestes (dRP) mit 195,1 und die Gesamtmasse ohne 2-Deoxyribose (M-dR) mit 447,1 zu erkennen. Das erhaltene Fragmentierungsmuster unterscheidet sich von denen des CPD und (6-4) Photoproduktes, so dass das Vorhandensein des SP in DNA mittels Massenspektrometrie bewiesen wurde.

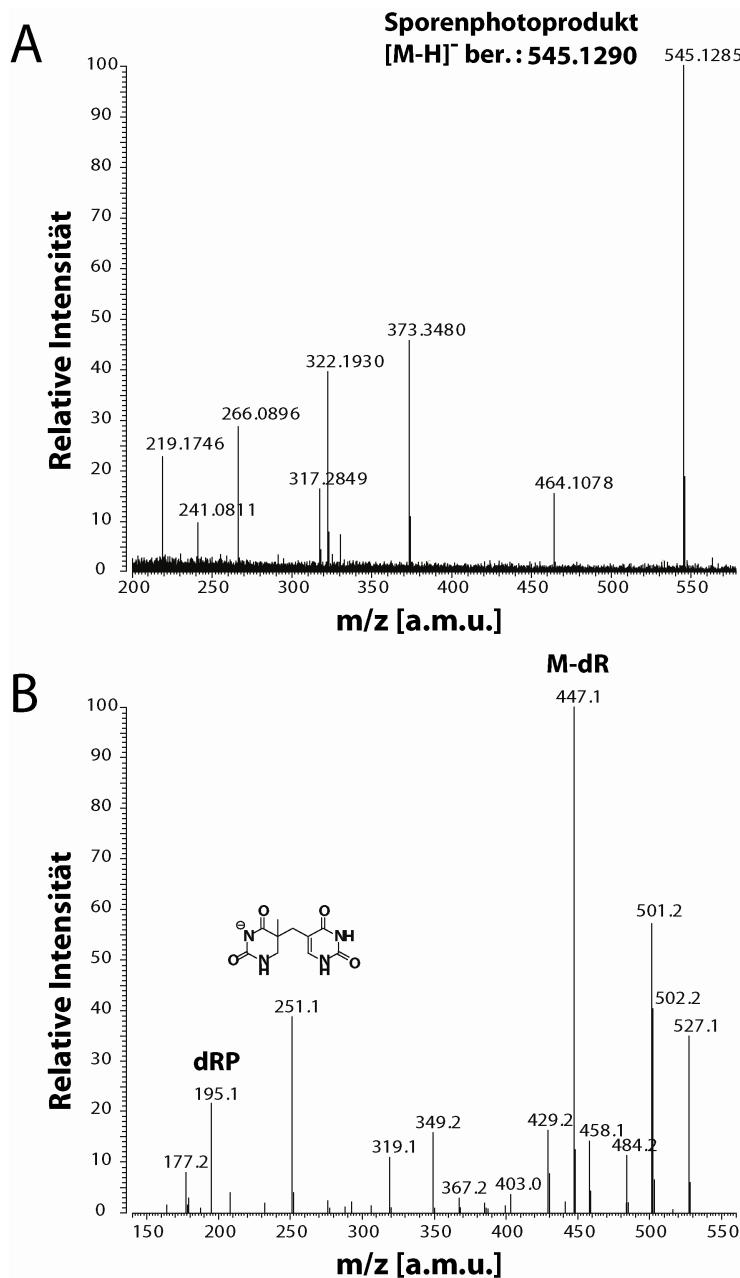
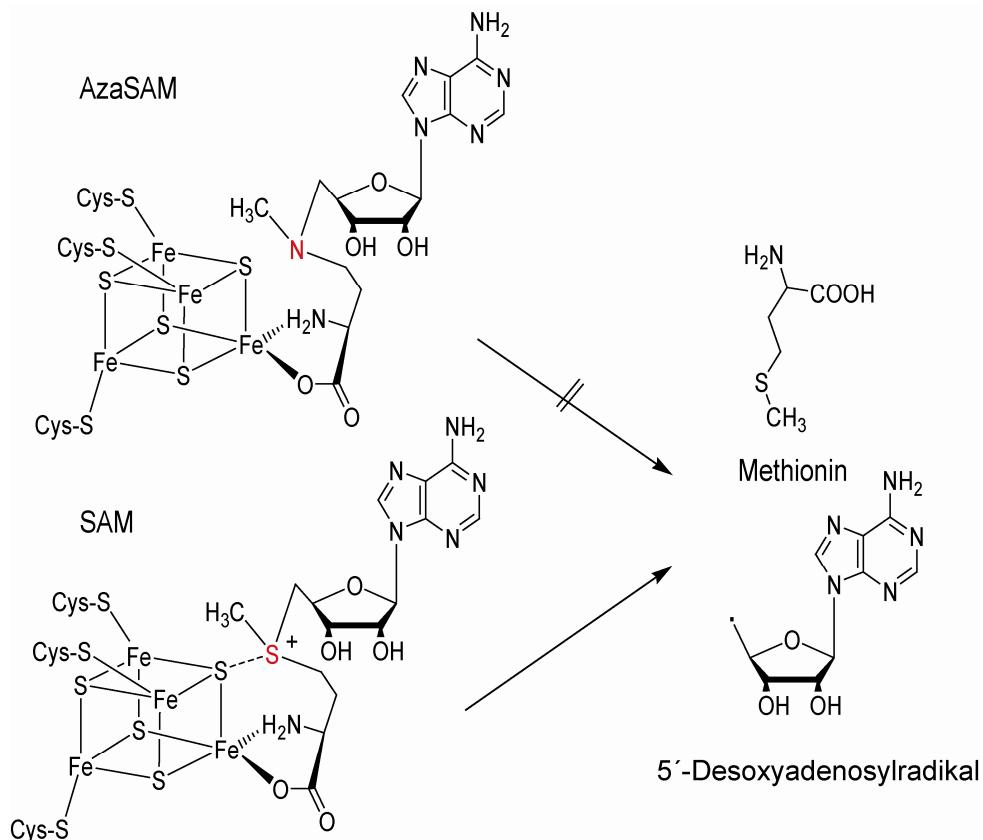


Abbildung 4-19: Massenspektren vom Sporenphotoprodukt. **A)** Massenspektrum nach HPLC-MS, **B)** Massenspektrum des fragmentierten Sporenphotoprodukts.

4.2.2 Synthese von AzaSAM

Um das Verständnis der Sporenphotoproduktreparatur durch die Sporenphotoproduktlyase zu erweitern, wurde ein Inhibitor synthetisiert. Dieser Inhibitor sollte einen Einblick in den Reparaturmechanismus geben und zugleich für Kristallisationsexperimente zu Verfügung stehen. Eine Kokristallisation von DNA und Enzym ist in der nativen Form theoretisch nur mit *S*-Adenosylmethionin möglich, welches am Fe-S Cluster als vierte Koordinierungsstelle des Eisens fungiert. Eine Kokristallisation in Gegenwart von SAM ist jedoch aus zwei Gründen nicht praktikabel. Zum einen ist die Sporenphotoproduktlyase mit SAM katalytisch aktiv, was zu einer zwangsläufigen Reparatur des Sporenphotoproduktes führt und damit eine Kokristallstruktur von Enzym mit geschädigter DNA unmöglich macht. Der zweite Grund ist die Instabilität von SAM. Eine dauerhafte Lagerung ist nur bei -80°C und in einer Lösung mit einem niedrigen pH-Wert möglich. Unter anderen Bedingungen kommt es sehr schnell zu einer Hydrolyse in *S*-Adenosylhomocystein, welches eine Kokristallisation unter normalen Bedingungen unmöglich macht.

Die S-C Bindung zwischen Methionin und Adenosin im SAM weist eine Dissoziationsenergie von 60 kcal/mol auf. Dieses setzt eine Destabilisierung der Bindung durch Reduktion voraus, um dann ein 5'-Deoxyadenosylradikal erzeugen zu können, welches wiederum ein Proton des Sporenphotoproduktes abstrahiert.

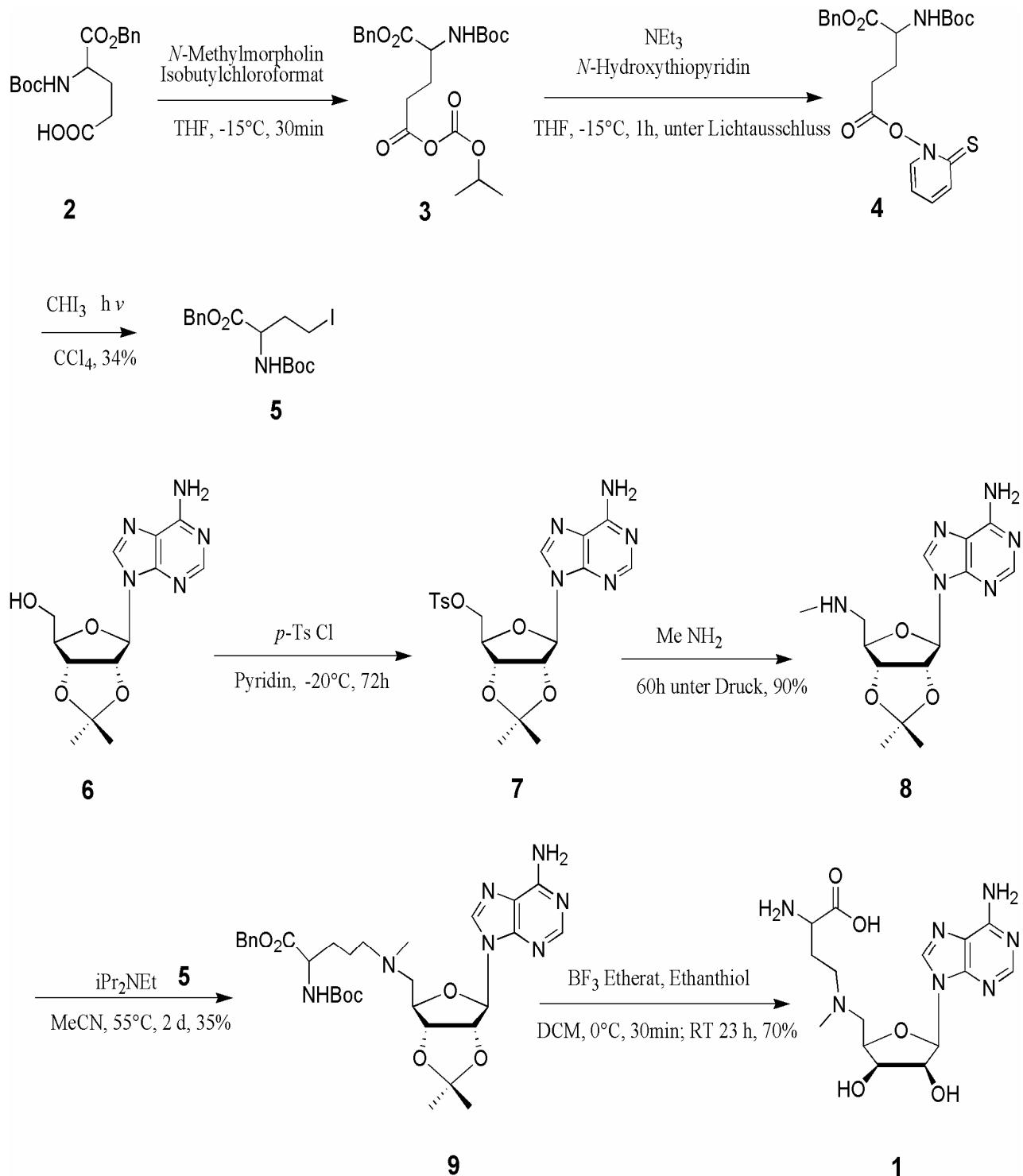


Schema: 4-3: Die Verwendung von AzaSAM inhibiert die Aktivität der Sporenphotoproduktlyase.

Durch die Übertragung von einem Elektron des $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ Clusters auf das SAM erfolgt die Reduktion und es entsteht ein instabiles Sulfuranylradikal. Dieses spaltet sich in Methionin und das benötigte 5'-Deoxyadenosylradikal. Ausgehend von diesen Reaktionen am Eisen-Schwefel Cluster und SAM wurde AzaSAM als potentieller Inhibitor ausgewählt. Dieser potentielle Inhibitor soll die Koordinierung des Eisen-Schwefel Clusters ermöglichen, jedoch nicht zu einer katalytischen Aktivität der Sporenphotoproduktlyase führen, da es nicht hydrolysiert oder in das Radikal zerfällt. Weitere Vorteile von AzaSAM sind die hohe Stabilität und die fast identischen sterischen Eigenschaften zum SAM, was zu keiner Strukturänderung im Protein führen sollte. Es ist weiterhin bekannt, dass andere Enzyme der gleichen Familie wie z.B. die 2,3-Aminomutase, Bindungskonstanten im einstelligen $\mu\text{molaren}$ Bereich zu AzaSAM aufweisen.

Eine Synthese von AzaSAM ist in Schema 4-4 gezeigt und wird im nachfolgenden näher beschrieben. Die Synthese von azaSAM (**1**) erfolgte ausgehend von *N*-Boc und Benzyl geschützten Glutamat (**2**), welches mit Isobutylchloroformat aktiviert und mit *N*-Hydroxypyridin unter basischen Bedingungen zum Glutamatdiester **4** umgesetzt wurde. Durch Belichtung in Gegenwart von Iodoform wurde **4** unter Decarboxylierung zu **5** umgesetzt. Der zweite Baustein des azaSAMs (**1**) wurde ausgehend von dem Acetal geschützten Adenosin (**6**) synthetisiert. Die 5'-Hydroxylgruppe des Zuckers wurde nach einer Standardmethode durch Tosyl als Abgangsgruppe aktiviert und direkt durch Methylamin mit einer Ausbeute von 74 % in das sekundäre Amin **8** überführt. **9** wurde durch die Kupplung von **8** und **5** in Gegenwart von Hünig-Base in Acetonitril mit einer Ausbeute von 50% hergestellt. Die Schutzgruppen von **9** wurden unter sauren Bedingungen abgespalten. Das gewünschte AzaSAM **1** wurde mit einer Ausbeute von 70% erhalten. Die Reinigung der letzten Synthesestufe musste aufgrund der hohen Polarität von AzaSAM mit Hilfe von FPLC und HPLC Anlagen erfolgen. Dazu wurde das lyophilisierte AzaSAM in ddH₂O (pH 7,0) aufgenommen und durch eine Kationentauschersäule (Source 30S, GE) mittels einer FPLC-Anlage (Puffer A: ddH₂O (pH 7,0); Puffer B: 2M NH₄HCO₃) gereinigt (Abbildung 4-20). Die Säulenkapazität beträgt maximal 10 mg des ungereinigten AzaSAMs, so dass zwölf FPLC Läufe durchgeführt werden mussten. Es wurde ein linearer Gradient angelegt, bei welchem die Puffer B Konzentration innerhalb von 150 mL auf 70 % ansteigt. Das FPLC-Chromatogramm in Abbildung 4-19 zeigt, dass große Mengen an unpolaren oder negativ geladenen Nebenprodukten nicht am Ionentauscher binden. Das AzaSAM eluierte bei diesem Gradienten bereits nach 50 mL und die Peakfläche macht über 80 % der Gesamtabsorption

bei 260 nm aus. Die Nebenprodukte wurden abgetrennt und die gesammelten AzaSAM Fraktionen vereinigt und lyophilisiert.



Schema: 4-4: Synthese von AzaSAM 1.

Ein nachfolgender analytischer *rp*-HPLC Lauf zeigte jedoch eine unvollständige Reinigung. Aus diesem Grund wurde anschließend noch eine *rp*-HPLC Trennung (C18, VP 250/10 Nucleosil100/7 von *Macherey & Nagel*) durchgeführt.

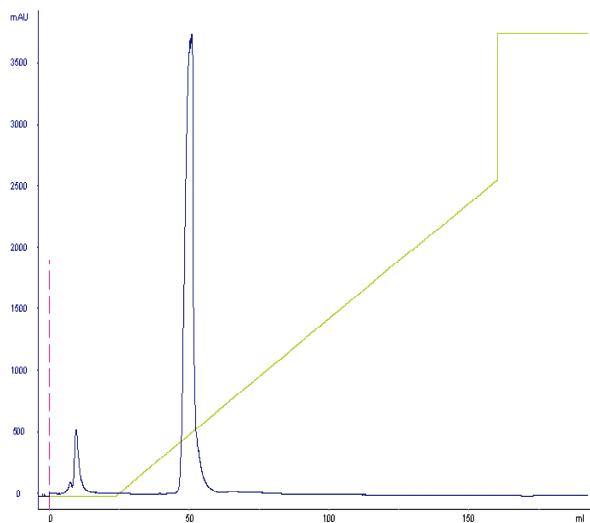


Abbildung 4-20: FPLC-Chromatogramm zur AzaSAM Reinigung mit einem Kationentauscher.

Das lyophilisierte AzaSAM wurde dazu in Puffer A (100 mM Triethylammoniumacetat) aufgenommen und durch einen linearen Gradienten mit Puffer B (100 mM Triethylammoniumacetat, 80% Acetonitril) von der Säule eluiert. Die AzaSAM Fraktionen wurden vereinigt wieder lyophilisiert (110 mg, 0,262 mmol, 70 %) und in die jeweiligen Ezymreaktionen eingesetzt. Die Reinheit von AzaSAM wurde daraufhin durch analytische *rp*-HPL Chromatographie überprüft. Das zugehörige Chromatogramm ist in Abbildung 4-21 dargestellt und zeigt den hohen Reinheitsgrad von azaSAM. Dieses Ergebniss wurde durch NMR Spektroskopie bestätigt.

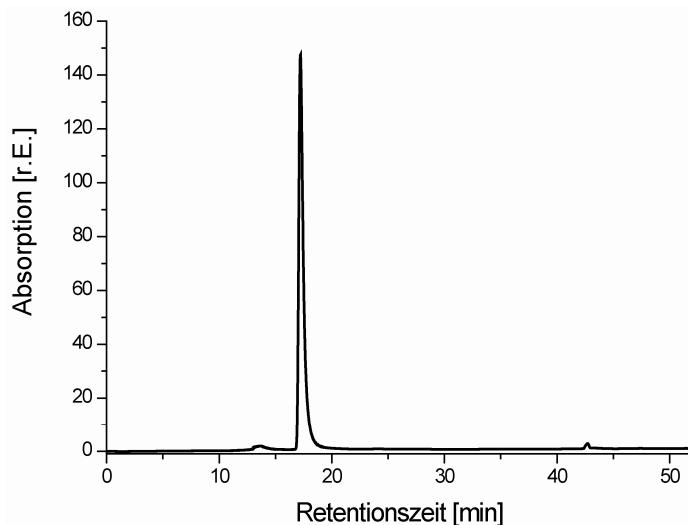


Abbildung 4-21: Analytisches *rp*-HPL Chromatogramm zur Reinheitskontrolle von AzaSAM.

4.2.3 Reparatur des synthetischen 5S- und 5R- Sporenphotoproduktes durch SplG

Die Substratspezifität der Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilus* (SplG) wurde mit Hilfe von synthetisch hergestellten Sporenphotoprodukten analysiert. Als erstes wurde die Enzymaktivität der SplG durch die Spaltung von SAM in 5'-Deoxyadenosin (5'-AdoH) und Methionin untersucht. Dazu wurde ausschließlich SAM in den Enzymassay eingesetzt.

Die beiden Diastereoisomere 5S-Sporenphotoprodukt (5S-SP) und 5R- Sporenphotoprodukt (5R-SP) wurden von *Dr. Marcus Friedel* synthetisiert und in ausreichender Menge zu Verfügung gestellt (Schema 4-5).^[245] Bis zu diesen Versuchen gab es keine experimentellen Daten zu einer möglichen Substratdiskriminierung der Sporenphotoproduktlyase.

Für diese Experimente wurde das gereinigte und rekonstituierte SplG Protein und jeweils das 5S-SP bzw. 5R-SP in einer Konzentration von 1mM eingesetzt.

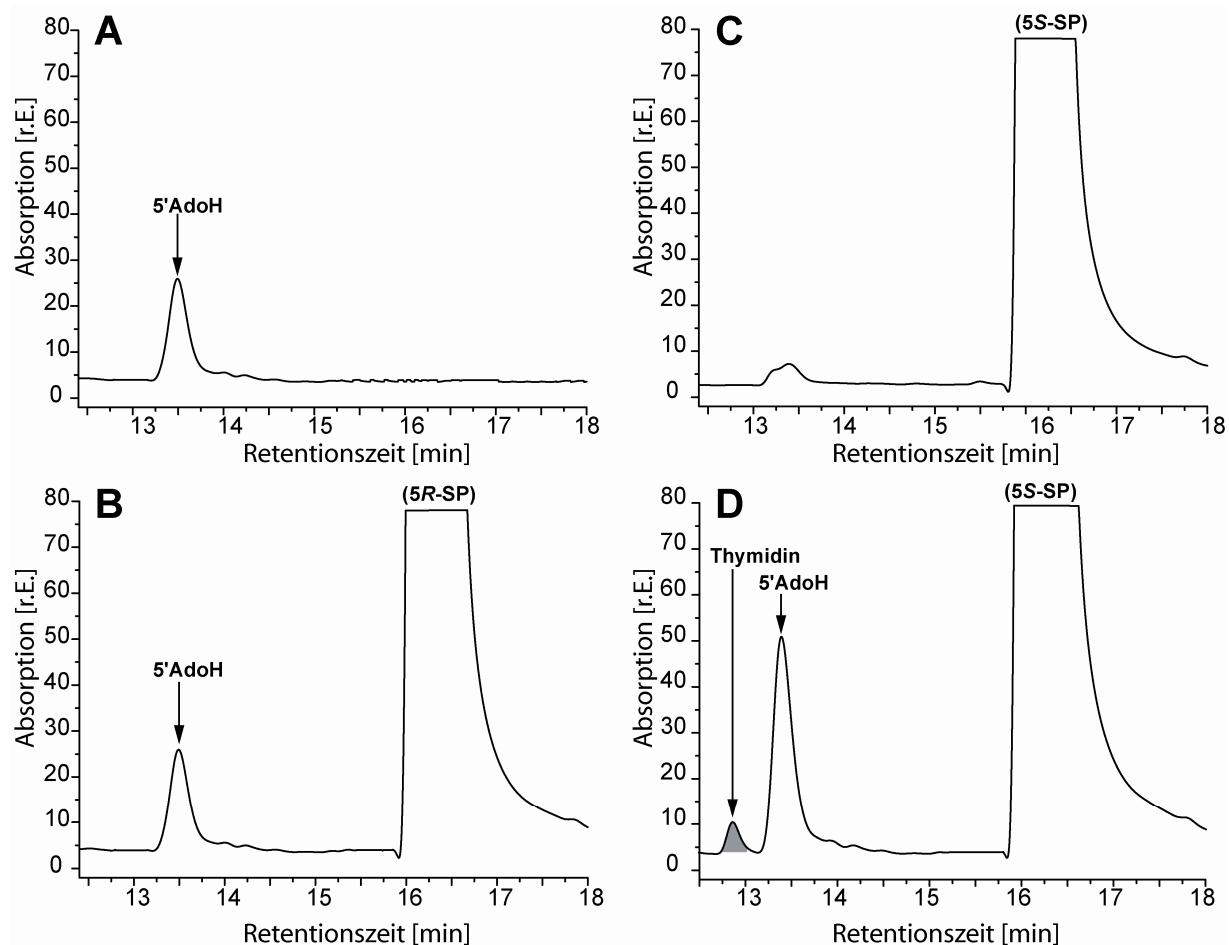
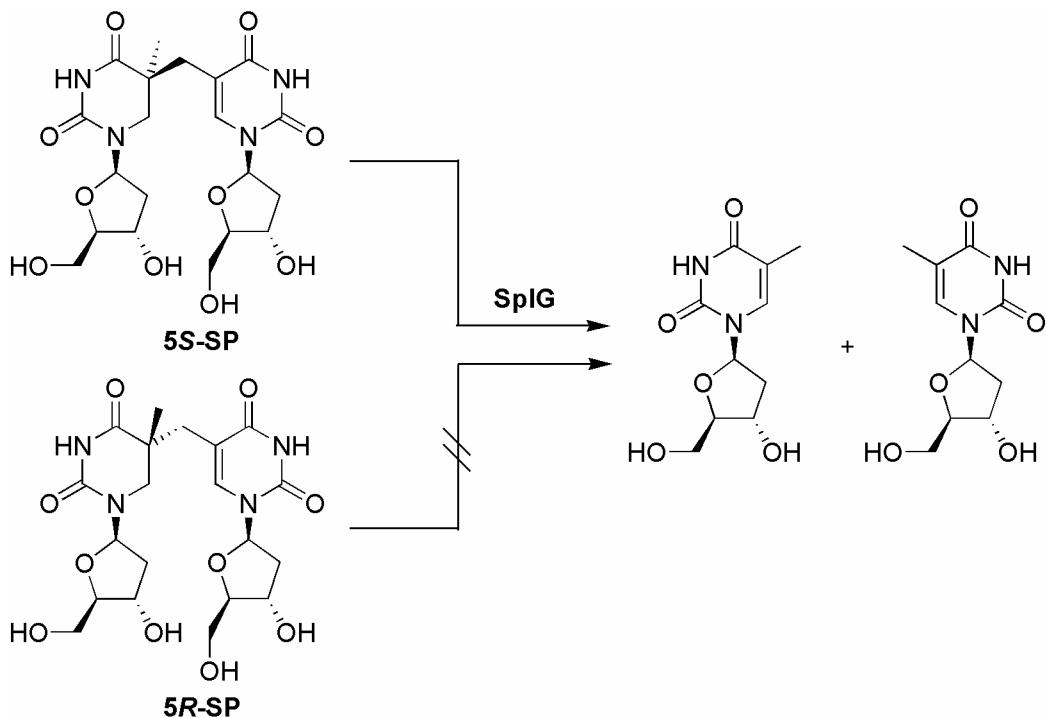


Abbildung 4-22: HPL-Chromatogramme zur enzymatischen Aktivität von SplG. **A)** Assay mit SplG und SAM führt zur Spaltung von SAM in 5'-Deoxyadenosin (5'-AdoH) und Methionin; **B)** Assay mit SplG, 5R-SP und SAM zeigt ausschließlich SAM Spaltung; **C)** Assay mit 5S-SP und SAM führt zu keiner Produktneubildung; **D)** Assay mit SplG, 5R-SP und SAM zeigt die Reparatur des 5R-SP und damit die Entstehung von Thymidin.

Die Reaktionen wurden für 3 h bei RT inkubiert. Als Kontrollexperimente wurden Assays mit Enzym ohne Substrate, sowie mit Substraten ohne Enzym durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zufuhr von Luftsauerstoff, welcher den [4Fe-4S]-Cluster oxidiert, beendet. Die einzelnen Ansätze wurden mittels *rp*-HPLC analysiert. Ausschnitte der analytischen HPL-Chromatogrammen sind in Abbildung 4-22 gezeigt. Dabei zeigt sich, dass die Inkubation von SplG in Gegenwart von SAM zur Entstehung von 5'-Deoxyadenosin mit einer Retentionszeit von 13,5 min führt, welches wiederum aus dem umgesetzten 5'-Deoxyadenosylradikal entstanden ist. Die Nutzung der SAM-Spaltung zur Enzymaktivitätskontrolle wird zurzeit kontrovers diskutiert. Die SAM-Spaltung in 5'-Deoxyadenosin und Methionin sollte anhand des postulierten Reparaturmechanismuses von Broderick *et al.*^[144] und Begley *et al.*^[52] nicht stattfinden, da diese radikalische Spaltung reversible ist und nur in Gegenwart eines Substrates stattfinden sollte. Die SAM-Spaltung wird jedoch standardmäßig für Aktivitätskontrolle von Radikal SAM abhängigen Enzymen verwendet, da diese Aufschluss über die Konstitution des [4Fe-4S]⁺ Clusters gibt.^[140] Bei der SplG wurde eine Spaltung von ~1,5 Moleküle SAM pro Homodimer SplG gemessen. Da die Spaltung nicht katalytisch ist, kann von einer Nebenreaktion am [4Fe-4S]⁺ mit SAM ausgegangen werden.



Schema: 4-5: Die Reparatur des synthetischen Dimer Sporenphotoschadens findet selektiv nur bei dem 5S-SP statt.

Die Analyse des Enzymassays in Anwesenheit von 5R-SP zeigte keine andere Produktbildung als die des 5'-Deoxyadenosins (Abbildung 4-22, B). Die Reparatur des 5R-SP und damit die Spaltung in zwei Thymidinmoleküle konnte nicht beobachtet werden. Die Reparatur fand im Fall von 5R-SP selbst nach 24 h nicht statt.

Bei der Verwendung des 5S-SP Isomers entsteht ein neuer Peak (Retentionszeit: 12,5 min). Dieser Peak konnte als Thymidin, das Produkt der Reparatur von 5S-SP (Schema 4-5), durch Koinjektion von Thymidin und Untersuchung des UV-Spektrums identifiziert werden (Abbildung 4-22, D). In den verschiedenen Kontrollexperimenten, ohne Enzym aber mit Substrat, konnte ebenfalls keine Spaltung von 5S-SP beobachtet werden, so dass die Spaltung tatsächlich enzymabhängig ist (Abbildung 4-22, C). Des Weiteren führte eine erhöhte Konzentration der SP-Lyase und Inkubationszeiterhöhung nur für das 5S-SP zu einer erhöhten Bildung von Thymidin.

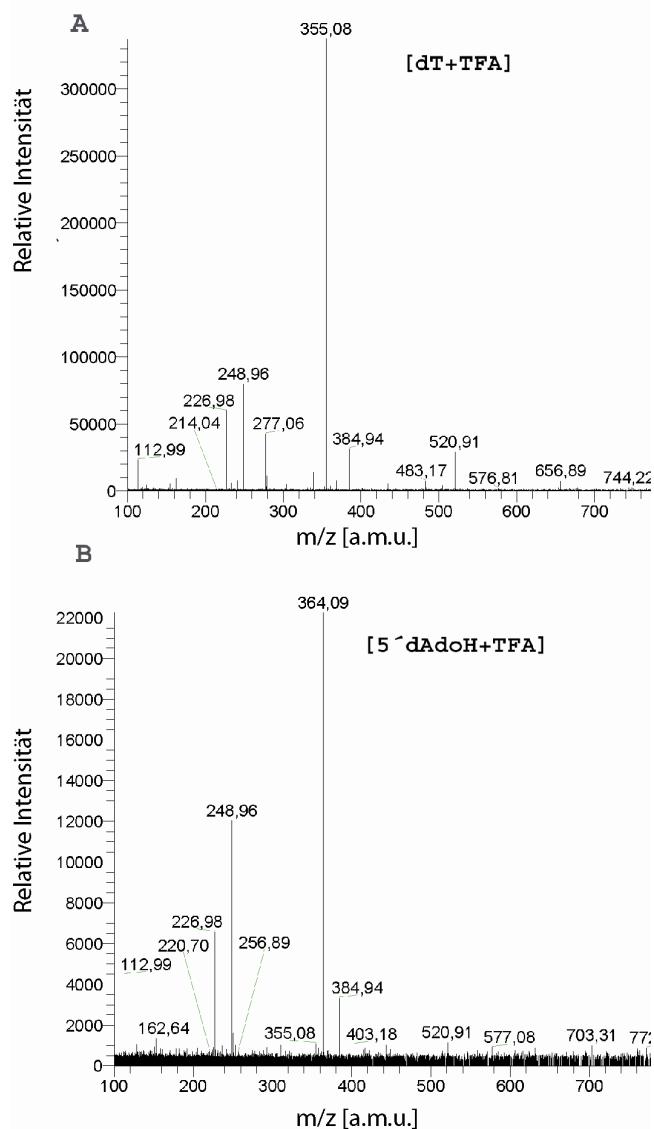


Abbildung 4-23: Massenspektrometrische Identifizierung der enzymatischen Reaktionsprodukte des SpIG Assays; Thymidin (A) und 5'-AdoH (B).

Die Produkte der enzymatischen Reaktion mit der SplG wurden zusätzlich durch Massenspektrometrie eindeutig zugeordnet (Abbildung 4-23). Die für die Massenspektrometrie verwendeten Reaktionsgemische entsprechen dem Enzymassay, der in Abbildung 4-22 D dargestellt ist. Die enzymatische Reaktion wurde abzentrifugiert und direkt durch HPLC-MS gemessen. Da in den verwendeten Puffersystemen Trifluoressigsäure vorhanden war, wurden die TFA-Addukte von Thymidin und 5'-AdoH detektiert. In Abbildung 4-23 A entspricht die Masse von $m/z = 355,08$ $[5\text{'-AdoH}+\text{TFA}]^+$ und beweist damit die Entstehung von 5'-AdoH aus SAM. In Abbildung 4-23 B entspricht die Masse von $m/z = 364,09$ $[\text{dT}+\text{TFA}]^+$. Die Spaltung des 5S-SP in Thymidin und damit die Reparatur des Dimers konnte hiermit eindeutig belegt werden. Diese Reparatur beschränkt sich ausschließlich auf das 5S-SP und bedeutet, dass die Sporenphotoproduktlyase zwischen den Diastereoisomeren diskriminiert. Die Sporenphotoproduktlyase ist also ein stereo-spezifisches Enzym.

4.2.4 Reparatur des natürlichen Sporenphotoproduktes in DNA durch SplG

Die erfolgreiche Herstellung eines definierten und natürlichen Sporenphotoproduktes in DNA ermöglicht detaillierte Enzymstudien mit der SplG. Die Enzymreaktionen wurden wiederum mit der rekonstituierten und homogen gereinigten SplG und einem SP enthaltenen DNA Strang mit der Sequenz 5'-GGSPGG-3' durchgeführt. Die DNA mit Sporenphotoprodukt wurde wie unter 4.2.1 beschrieben hergestellt. Für die Messung einer Enzymkinetik wurden alle 20 min eine Probe aus der Glovebox ausgeschleust, bei -80°C tiefgefroren und dann hintereinander auf der *rp*-HPLC analysiert. Die Gesamtzeit beträgt 80 min und die zugehörigen Chromatogramme sind in Abbildung 4-24 zusammengefasst. Zum Anfang der Reaktion ist im dargestellten Retentionsbereich lediglich der DNA-Strang mit Sporenphotoprodukt zu sehen und ein über die gesamte Messzeit konstanter Peak (X) eines Pufferbestandteils. Bei einer Inkubationszeit von 20 min entsteht nach einer Retentionszeit von 48,2 min ein neuer Peak, der mit längerer Messzeit zunimmt. Die Peakserie, welche nach einer Retentionszeit von 44,2 min eluiert, wird dagegen während der gesamten Messzeit kontinuierlich kleiner.

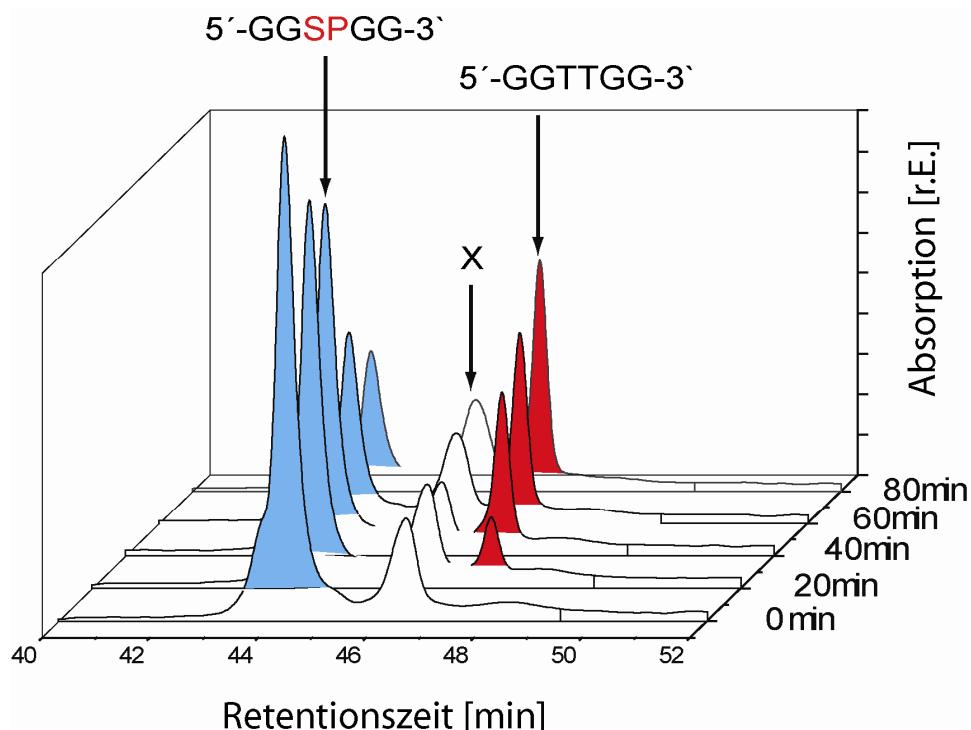


Abbildung 4-24: Reparatur eines Sporenphotoproduktes in Einzelstrang DNA durch das SplG Enzym. Die blaue Peakserie zeigt die abnehmende DNA Menge mit SP. Die rote Peakserie zeigt einen Anstieg an reparierter DNA. Es wurde alle 20 Minuten eine Probe aus der Enzymlösung analysiert. Die mit X markierte Peakserie stammt von einem Pufferbestandteil mit einer Absorption bei 260 nm.

Bei der ansteigenden roten Peakserie handelt es sich um den DNA Strang mit repariertem Sporenphotoprodukt, also zwei normalen Thymidinen. Die abnehmende blaue Peakserie entspricht dem geschädigten DNA Strang mit Sporenphotoprodukt. Der DNA Strang mit Sporenphotoprodukt wird durch die SplG quantitativ repariert. Durch die Reparaturzeit, der Menge an eingesetzter geschädigter DNA und SplG lässt sich eine katalytische Aktivität von 2,6 μ Mol reparierter DNA pro Minute und pro mg SplG berechnen. Dieses ermöglicht die Berechnung einer Wechselzahl von ~100. Ein Mol Sporenphotoproduktlyase reparieren also 100 mol Sporenphotoprodukt pro Minute. Dieses Ergebnis zeigt, dass die SplG in Gegenwart eines SP in DNA katalytisch aktiv ist und in der Lage ist, auch Einzelstrang DNA mit einem SP quantitativ zu reparieren.

4.2.5 AzaSAM Inhibierung der SP Reparatur durch SplG

Um den postulierten Reparaturmechanismus zu überprüfen, wurde AzaSAM anstelle von SAM in die Enzymreaktion mit der SplG und geschädigter DNA eingesetzt. Die Enzymreaktionen wurden identisch zu den unter 4.2.4 beschriebenen Versuchen durchgeführt. Die Enzymreaktion wurde für 16 h inkubiert und wiederum mittels *rp*-HPLC analysiert. Das daraus resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 4-25 dargestellt. Hier sind trotz der sehr langen Inkubationszeit keine neu entstandenen Peaks zu sehen. Die DNA mit SP bleibt unverändert und auch das AzaSAM wird weder durch Eigenhydrolyse noch durch Enzymkatalyse abgebaut. Die mit X markierten Peaks sind in allen Proben auch ohne DNA bzw. AzaSAM vorhanden und resultieren aus dem Puffer.

AzaSAM bleibt in Gegenwart der SplG also auch für eine längere Zeit bei RT stabil. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass SAM ein essentieller Kofaktor für die katalytische Reparatur des SP ist und AzaSAM einen sehr effektiven Inhibitor der Sporenphotoprodukt-Reparatur darstellt.

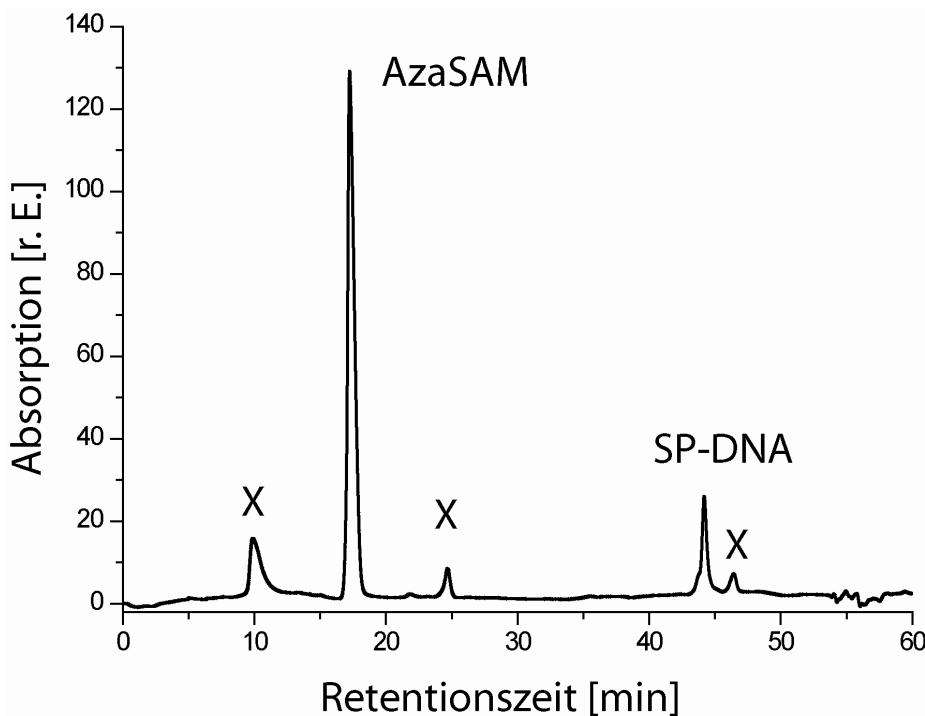


Abbildung 4-25: *rp*-HPLC Chromatogramm zur Inhibierung der SP Reparatur in Einzelstrang DNA mit AzaSAM. Es entstehen keine neuen Reaktionsprodukte aus AzaSAM und SP-DNA; X= Pufferpeaks.

Die nicht stattfindende 5'-Deoxyadenosylradikalbildung verhindert also die H⁺ Abstraktion am SP und damit den Reparaturmechanismus der Sporenphotoproduktlyase.

4.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Bislang gab es keine experimentell belegten Informationen zur Substraterkennung, Mechanismus und Stereoselektivität der enzymatisch katalysierten Reparatur des Sporenphotoproductes durch die Sporenphotoproductlyase. Die in Abschnitt 4.1 beschriebene Reinigung der thermophilen Sporenphotoproductlyase, aus *Geobacillus stearothermophilus* (SplG), ermöglicht den Zugang zu einem stabilen Enzym. Mit diesem konnten detaillierten Reparaturuntersuchungen durchgeführt werden. Die neue Methode zur selektiven und präparativen Herstellung eines SP in Einzelstrang DNA liefert ein definiertes Substrat für bislang nicht durchführbare kinetische Untersuchungen und Substraterkennungsstudien. Der Zugang zu diastereoisomer sauberen SP Minimalsubstraten konnte für die Untersuchung der SplG Stereoselektivität verwendet werden. Die Synthese des Kofaktoranalogs AzaSAM und den Einsatz als Inhibitor in der SP Reparatur liefert Beweise für die Richtigkeit des postulierten Reparaturmechanismuses. Die Ergebnisse dieser umfassenden Studien sind in Abbildung 4-26 grafisch zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die Sporenphotoproductlyase zwischen dem R- und S- Diastereoisomer SP diskriminiert. Nur das 5-S SP wird unter Bildung von 5'-Deoxyadenosin (5'-dAdoH) repariert. Bei dem 5-R SP hingegen, bleibt das Substrat selbst nach einer Inkubationszeit von 16 h unverändert. In Enzymreaktionen mit natürlichem Sporenphotoproduct in DNA konnte eine katalytische Aktivität der SplG mit einer Wechselzahl von ~100 ermittelt werden. Ein Einzelstrangsubstrat genügt also für eine effiziente Reparatur des UV-Licht induzierten SP durch SplG. Diese effiziente Enzymaktivität kann durch die Verwendung des SAM Kofaktoranalogs AzaSAM komplett inhibiert werden. Es kommt nicht zu einer 5'-dAdoH Bildung kommt und damit die Reparatur des SP in DNA unterbunden wird.^[246]

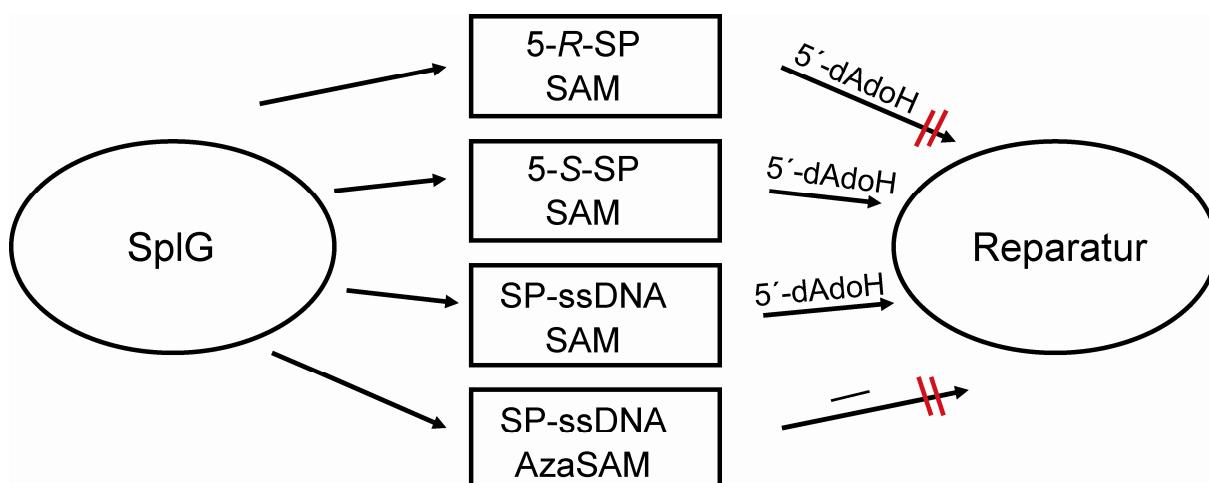


Abbildung 4-26: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus 4.2.

Die Inhibierung der Reparatur durch AzaSAM gibt einen indirekten Beleg für den postulierten Reparaturmechanismus, welcher die Bildung eines 5'-Deoxyadenosylradikals voraussetzt. Der im Rahmen dieser Arbeit ermöglichte Zugang zu einem thermophilen Reparaturenzym (SplG), einem natürlichen Sporenphotoproduct (SP-ssDNA) und einem Kofaktoranalog (AzaSAM) mit Inhibitoreigenschaften (AzaSAM), ermöglicht alle weiteren denkbaren Untersuchungen. In Zukunft können also noch nicht durchgeführte Kompetitionsassays zwischen AzaSAM und SAM begonnen werden, welche eine genauere Untersuchung der Inhibitoreigenschaften ermöglichen.

Die unter 4.1 beschriebenen Kristallisationsversuche können nun in Gegewart von AzaSAM durchgeführt werden, was vermutlich zu einer Stabilisierung des [4Fe-4S] Clusters führt und damit vielleicht zu einer besseren Auflösung. Die Herstellung einer großen Menge an SP-ssDNA kann zur Bestimmung von weiteren kinetischen Daten wie k_{cat} und K_M verwendet werden. Auch für Kristallisationsexperimente von SplG und SP-ssDNA kann die Verwendung von großen DNA Mengen zu einer Kokristallstruktur führen.

Eine Kombination aus Aza-SAM und SP-ssDNA für Kristallisationsexperimente kann zu sehr interessanten Zwischenstufen der Schadenserkennung führen. In diesen Strukturen wird man sehen, ob das Photoproduct, genau wie das CPD bei der Reparatur durch die Photolyase, aus der DNA Doppelhelix herausgeklappt wird. Die Bestimmung von Bindungsaaffinitäten zwischen 5-S und 5-R Diastereoisomeren, natürlichem SP-ssDNA und der SplG können mittels Fluoreszenzpolarisation durchgeführt werden. Diese Experimente können parallel mit und ohne AzaSAM durchgeführt werden, um den Einfluss von Kosubstraten auf die DNA-Protein Bindung zu ermitteln. Trotz der vielen beantworteten Fragen bleiben also noch weitere Aufgaben, die mit den hier erarbeiteten Werkzeugen beantwortet werden können.

4.3 Mutagene Eigenschaften des Sporenphotoproductes

Die Reparatur des Sporenphotoproductes durch die Sporenphotoproduktlyase ist seit wenigen Jahren bekannt und durch diese Arbeit besser charakterisiert worden. Ein vollkommenes „Wissensvakuum“ herrscht jedoch bzgl. der Replikation über das Sporenphotoprodukt. Wird gegenüber dem Sporenphotoprodukt eine nicht komplementäre Base eingebaut? Kommt es zum Replikationsstopp? Unterscheiden sich die Replikationsprofile von *in vitro* und *in vivo* Experimenten? Welcher Polymerasetyp liest am besten über das Sporenphotoprodukt? Allen gestellten Fragen wird in diesem Kapitel nachgegangen und zu einem Großteil beantwortet.

4.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die Replikation von DNA ist eine zwingende Voraussetzung für die Zellteilung von Pro- und Eukaryoten. Die dafür notwendigen Polymerasen müssen in der Lage sein, das jeweilige Genom mit einer hohen Genauigkeit und Geschwindigkeit abzulesen und zu replizieren. Diese beiden Anforderungen sind jedoch prinzipiell gegensätzlich und führten zur Evolution von Polymerasen mit unterschiedlichen Funktionen. Diese werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien und Funktionen in Familien eingeteilt, welche in Tabelle 4-5 mit zugehörigen pro- und eukaryotischen Beispielen dargestellt sind. Geschädigte DNA kann zu einer Änderung oder einem Verlust des Informationsgehaltes sowie zu einer Veränderung der Doppelhelixstruktur führen. Die Replikation dieser geschädigten DNA setzt also eine gewisse Toleranz der beteiligten Polymerasen voraus und führt damit häufig zu einer geringen Replikationstreue. Diese Eigenschaften haben die Polymerasen aus der Familie Y und werden deshalb auch mit dem Namen *error prone* oder *low fidelity*-Polymerasen bezeichnet. Diese Polymerase Familie wurde erst 1999 entdeckt und trägt seitdem zu einem verbesserten Verständnis der Replikation von DNA Schäden bei. Die Eigenschaften der Polymerasen aus der Familie Y stehen im Gegensatz zu den Polymerasen der Familien A-D, welche mit einer Fehlerrate zwischen $1:10^5$ und $1:10^6$ eine hohe Replikationsgenauigkeit aufweisen. Diese Polymerasen werden deshalb auch unter dem Namen der *replikativen* oder *high fidelity* Polymerasen zusammengefasst. Durch die geringere Substrattoleranz dieser Enzyme sind *high fidelity* Polymerasen zudem in der Lage, DNA mit einer höheren Replikationsgeschwindigkeit und Prozessivität zu duplizieren. Zur Familie X gehören Polymerasen, welche am Reparaturmechanismus der DNA Schäden beteiligt sind, jedoch nicht wie die Polymerasen der Familie Y über die DNA Schäden replizieren.

Für die Untersuchungen zur DNA Replikation über das Sporenphotoprodukt wurden zwei Polymerasen aus der Familie Y und eine Polymerase aus der Familie A verwendet. Bei den

Enzymen der Familie Y wurde die Polymerase η aus *S. cerevisea* (Rad30) und die Polymerase DinB aus *G. stearothermophilus* verwendet, welche als prokaryotisches Homolog zur humanen pol κ angesehen wird.^[247]

Tabelle 4-5: Einteilung von pro und eukaryotischen Polymerasen in Familien anhand von Seqnezhomologien.

Familie	Funktion	prok. Polymerasen	euk. Polymerasen
A	Replikation, Lückenauffüllen	Pol I aus <i>E. coli</i> und <i>G. stearothermophilus</i> , T7 Polymerase, <i>Taq</i>	mitochondriale humane Pol γ
B	Replikation	Pol I aus <i>E. coli</i> Pol B aus anderen Prokary., Phagen Pol RB69	humane Pol α , δ , ϵ
C	Replikation	katalytische Untereinheit α der Pol III aus <i>E. coli</i>	Pol C <i>X. laevis</i>
D	Replikation	Pol D aus <i>T. acuaticus</i> und <i>P. abyssi</i>	humane Pol D besteht aus 4 Untereinheiten
X	Reparatur, DNA-Damage Checkpoint control	<i>D. radiodurans</i> Afrikanischer Schweine Fieber Virus	humane Pol β , λ , μ , σ
Y	TLS	Pol V(UmuC), IV (DinB) <i>E. coli</i> u. <i>G. stearothermophilus</i> , Dpo4 und Dph aus Archaeen	humane Pol η , κ , ι , ζ

Als Polymerase aus der Familie A wurde das Große Fragment der Polymerase 1 aus *G. stearothermophilus* verwendet. Die Kombination aus replikativen Polymerasen der Familie A und zwei Vertretern aus der Familie Y sollten detaillierte Ergebnisse über die *translesion synthesis* (TLS) Fähigkeiten der einzelnen Polymerasen und Familien ergeben.

Für die Messung der Replikationsgeschwindigkeit unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady state*) gibt es zwei unterschiedliche Verfahren. Bei der ersten Methode (*Competition Assay*) sind zwei unterschiedliche Desoxynukleotide in der Reaktionslösung vorhanden, und der Einbau der zwei Nukleotide wird quantitativ verglichen. Bei der zweiten Methode werden die kinetischen Parameter unabhängig voneinander gemessen. Es wird dementsprechend nur eines der vier Desoxynukleotide in die Reaktionslösung eingesetzt (*Kinetic Assay*). Beide Verfahren führen theoretisch zum selben Ergebnis, da es sich bei dem zu untersuchenden DNA-Schaden jedoch um einen Dimerschaden handelt, wurde das *Kinetic assay* Verfahren benutzt. Hierbei sind der technische Aufwand geringer und die notwendigen Berechnungen einfacher durchzuführen.

Die Primerverlängerung innerhalb des *Kinetic Assays* kann aufgrund der Primer und Templat Beschaffenheit wiederum in zwei Verfahren eingeteilt werden (Abbildung 4-27). Die Differenzierung erfolgt dabei anhand des Abstandes vom freien 3'-Ende des Primers zum ersten am Schaden beteiligten Nukleotid. Endet der Primer bereits ein oder mehrere Basen von dem Schaden entfernt, handelt es sich um einen *Running Start* (Warmstart) Assay. Dieses bedeutet, dass die jeweilige Polymerase bereits ein oder mehr Basen gegenüber dem Templatstrang inkooperiert hat, bevor sie auf den Schaden im Templatstrang trifft. Das zweite Verfahren wird als *Standing Start* (Kaltstart) bezeichnet. Bei diesem Versuchsaufbau endet das 3'-Ende unmittelbar vor dem ersten am Dimerschaden beteiligten Nukleotid im Templatstrang. Bei den mit dem Sporenphotoprodukt durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich die Kaltstartmethode verwendet.

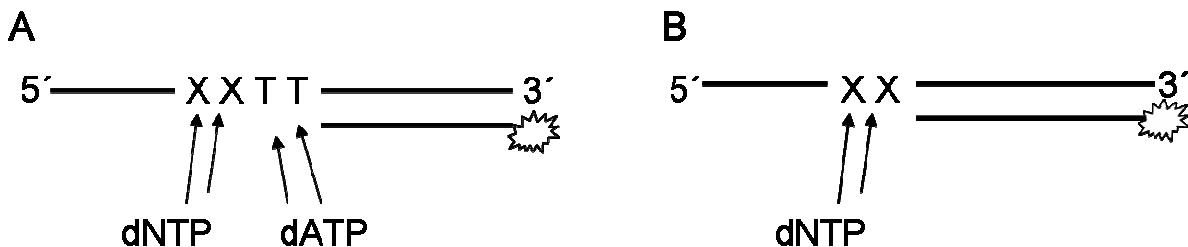


Abbildung 4-27: **A)** Substrataufbau für Warmstart Primerverlängerungsstudien; **B)** Substrataufbau Kaltstart Primerverlängerungsstudien. Der Primer ist jeweils am 5'-Ende mit einem Fluoreszeinmolekül markiert. Die X Buchstaben markieren die am Sporenphotoprodukt beteiligten Thymidine im Templatstrang.

Zu Beginn wurden initiale Experimente mit langer Inkubationszeit, hoher Polymerasekonzentration und jeweils einem der vier dNTP's durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, ob prinzipiell alle dNTP's gegenüber dem Sporenphotoprodukt eingebaut werden können.

Die Kaltstartmethode unterliegt dem *Single Completed Hit Modell* (SCH), welches voraussetzt, dass während des Assays maximal ein Kontakt zwischen Enzym und Substrat stattfinden darf. In allen durchgeführten Kinetikexperimenten wurde deshalb das molare Verhältnis von dsDNA zu Polymerase mindestens auf 50:1 eingestellt, da ansonsten die theoretische Behandlung der experimentellen Ergebnisse sehr schwierig ist, denn hierbei wird immer von einer dNTP Konzentration im Überschuss ausgegangen. Außerdem wurden nur die Daten in die Kinetikberechnung mit einbezogen, bei denen die Menge an verlängertem Primer ($n+1$) unter 20% der insgesamt eingesetzten DNA bleibt. Im Folgenden wird auf das theoretische Modell der Kaltstartmethode eingegangen, mit deren Hilfe die Kinetikparameter der jeweils verwendeten Polymerase berechnet werden konnten.

Kaltstartmethode

Bei der jeweiligen Berechnung wird ausschließlich die Inkooperation des dNTP's gegenüber der 3'-Base (t+1) des Sporenphotoproduktes gemessen und nicht die der 5'-Base (t+2). Der Grund für diese Beschränkung wird auf den nächsten Seiten genauer beschrieben. Das in Abbildung 4-28 dargestellte Kinetikmodell zur Polymeraseaktivität geht von einer Polymerase ohne Exonukleaseaktivität aus, welche auf einen Dimerschaden trifft.

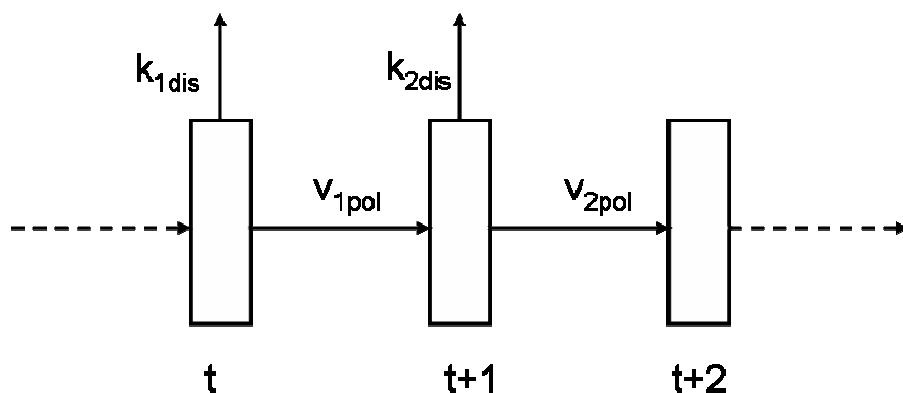


Abbildung: 4-28: Kinetikmodell einer Polymerase ohne Exonukleaseaktivität, welche unter Kaltstartbedingungen auf einen Dimerschaden trifft.

An der Position t, also eine Base vor der 3'-Base des Sporenphotoproduktes (t+1), kann es zu zwei möglichen Szenarien kommen. Entweder die Polymerase dissoziert wieder vom Substrat weg (p_{1dis}) oder es kommt zur Inkooperation eines dNTP's gegenüber der 3'-Base des Sporenphotoproduktes im Templatstrang durch die Polymerase (p_{1pol}). Bestimmt werden diese beiden gegenläufigen Reaktionen durch die Dissoziationskonstante (k_{1dis}) und der Inkorporationsgeschwindigkeit (v_{1pol}). Damit ergibt sich:

$$p_{Dis} = \frac{k_{1Dis}}{v_{1pol} + k_{1Dis}} \quad p_{pol} = \frac{v_{1Dis}}{k_{1pol} + v_{1Dis}} \quad (4.1)$$

Dabei ist die Dissoziationskonstante (k_{1dis}) polymerase- und substratspezifisch aber unabhängig von der dNTP Konzentration. Da die Inkorporationsgeschwindigkeit (v_{1pol}) jedoch von der dNTP Konzentration abhängig ist, können durch die Konzentrationsänderung alle Kinetikparameter bestimmt werden. Zur Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit zur

Nukleotidtriphosphatkonzentration sind die Primer mit Fluorescein markiert und werden durch Polyacrylamidgelektrophorese nach ihrer Länge getrennt. Dabei lassen sich der unverlängerte Primer (t) von dem um eine Base verlängerten Primer ($t+1$) sehr gut voneinander trennen. Die daraus resultierenden Bandenfläche und Intensität aller Primer (I_0) und des um eine Base verlängerten Primers (I_{T+1}) entsprechen p_{dis} und p_{pol} und lassen sich jeweils als Quotienten gleich setzen.

$$\frac{I_{T+1}}{I_0} = \frac{p_{pol}}{p_{dis}} \quad (4.2)$$

Hierbei setzt sich I_0 aus der Summe der Bandenflächen und Intensitäten des um eine Base verlängerten Primers (I_{T+1}) und des unverlängerten Primers (I_T) zusammen. Durch einsetzen ergibt sich aus den Gleichungen 4.1 und 4.2:

$$v_{pol} = k_{dis} \cdot p \quad p = \frac{I_{T+1}}{I_0} \quad (4.3)$$

$$V_{\max} = k_{dis} \cdot p_{\max} \quad p_{\max} = \frac{I_{T+1,\max}}{I_{0,\max}} \quad (4.4)$$

Die gemessene Geschwindigkeit entspricht der Inkorporationsgeschwindigkeit, die durch den Anteil an aktiver Polymerase hervorgerufen wird. Bezieht man diesen Faktor (α) in die Berechnungen mit ein, so ergibt sich für die maximale und jede andere Inkorporationsgeschwindigkeit:

$$v_{pol}^* = v_{pol} \cdot \alpha = \alpha \cdot k_{Dis} \cdot p = \frac{[Pr_o]}{t} \cdot \frac{I_{T+1}}{I_0} \quad (4.5)$$

$$V_{\max}^* = V_{\max} \cdot \alpha = \alpha \cdot k_{Dis} \cdot p_{\max} = \frac{[Pr_o]}{t} \cdot \frac{I_{T+1,\max}}{I_{0,\max}}$$

Dabei entspricht $[Pr_o]$ der Primerausgangskonzentration und t der Reaktionszeit des Assays. Durch das Einsetzen von Gleichungen 4.5 und 4.6 in die Michalis-Menten-Gleichung ergibt sich folgende Berechnungsgrundlage für K_M :

$$v_{pol} = \frac{V_{\max} \cdot [dNTP]}{K_M + [dNTP]} \quad \text{Michaelis-Menten-Gleichung} \quad (4.6)$$

$$\frac{[\text{Pr}_o]}{t} \cdot \frac{I_{T+1}}{I_0} = \frac{V_{\max} \cdot [dNTP]}{K_M + [dNTP]} \quad (4.7)$$

Durch einsetzen aller bekannten und experimentell bestimmten Werte in Gleichung 4.18 konnte die Inkorporationsgeschwindigkeit v_{pol} als Funktion der dNTP Konzentration berechnet werden. Trägt man die berechneten Werte anhand der Lineweaver-Burk Darstellung auf, lässt sich aus dem y-Achsenabschnitt a und der Steigung m V_{\max} und K_M berechnen.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[dNTP]} \quad (4.8)$$

$$y = a + m \cdot x \quad (4.9)$$

Da V_{\max} abhängig von der Polymerasekonzentration ist, wird zusätzlich der k_{kat} -Wert durch Division von V_{\max} durch die Enzymkonzentration bestimmt.

$$k_{\text{kat}} = \frac{V_{\max}}{[E]} \quad (4.10)$$

4.3.2 Expression und Reinigung der DinB Polymerase aus *G. stearothermophilus*

Das *DinB* Gen kodiert in vielen Prokaryoten den einzigen Vertreter aus der *error prone* Polymerase Familie Y. Basierend auf Genomanalysen wurde *DinB* ebenfalls als einzige *low fidelity* Polymerase in *G. stearothermophilus* identifiziert. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Replikationseigenschaften von *DinB* in Gegenwart eines Sporenphotoproductes von großer biologischer Bedeutung.

DinB bzw. PolIV ist das prokaryotische Analog zur eukaryotischen Polymerase κ, allen fehlt die 3'-5' *proofreading* also Exonukleaseaktivität. Die Expression von *DinB* wird durch die SOS Anwort in der Zelle induziert. Bisher konnte gezeigt werden, dass Pol κ bzw. *DinB* über einen *N*²-dG, AAF, benzo(*a*)pyrene-G und Thymin Glykol Schaden, z.T. mit *-1 frameshifts* und Falschinkorporation, replizieren können. Die Replikation über UV-induzierte Photodimerschäden, wie das (6-4) Photoprodukt oder das CPD, führen zum Replikationsstop bei der *E.coli* *DinB* Polymerase. Dasselbe Ergebnis wird durch cis-Platin-Addukte in DNA erzielt, auch hier stoppt *DinB*.^[248] Die Expression wurde unter den in Tabelle 4-6 angegebenen Expressionsbedingungen durchgeführt. Unter diesen Expressionsbedingungen konnten bis zu 100 µg *DinB* pro Liter Medium homogen gereinigt werden. Die Expression wurde in dem *E. coli* K12 Stamm Tuner ((*DE3*) *pLysS* (*CamR*)) durchgeführt. Da das Temperaturwachstumsoptimum von *G. stearothermophilus* bei 55°C liegt, wurde der Zellextrakt nach dem Aufschluss für das *DinB* Protein für 20 min bei 50°C inkubiert. Alle temperaturlabilen *E. coli* Proteine konnten danach als denaturierte Bestandteile abzentrifugiert werden. Dadurch konnte das *DinB* Protein breit durch nur einen Affinitätsreinigungsschritt homogen gereinigt werden (Abbildung 4-29). Leider sind die erhaltenen Proteinmengen für Kristallisierungsansätze zu gering. Für Enzymassays, wie Primerverlängerungsstudien, stand jedoch *DinB* in ausreichender Menge zu Verfügung.

Tabelle 4-6: Bedingungen für eine Expression von *DinB* aus *G. stearothermophilus*.

<i>E. coli</i> K12-Substamm	Tuner(DE 3) <i>pLysS</i>
Wachstumstemperatur	37°C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	0,2
Endkonzentration Anhydrotetracyclin	400µM
Zeitdauer der Induktion	2h
Induktionstemperatur	37°C
Schüttlerumdrehungen	200 rpm

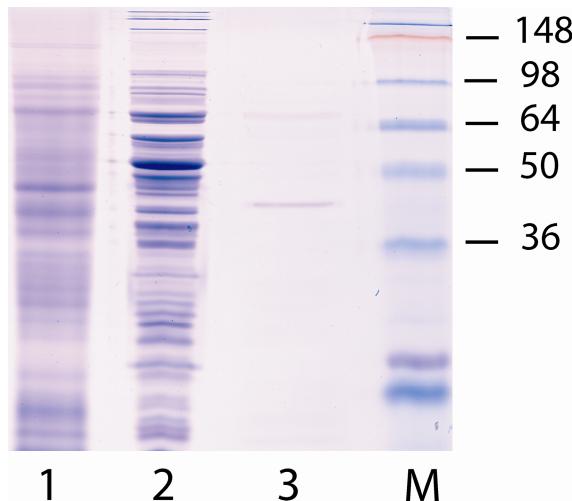


Abbildung 4-29: Spur 1: gesamtes Zellextrakt nach der Induktion mit Anhydrotetracyclin, Spur 2: lösliche Proteinfraktion nach der Hitzedenaturierung, Spur 3: homogen gereinigte Pol η nach Strep-tagII Reinigung, Spur M: Proteingröße marker.

Zur eindeutigen Proteinidentifizierung, wurde die potentiell DinB Protein enthaltende Coomassie gefärbte Bande ausgeschnitten und wie unter 3.6.1 beschrieben weiter analysiert. Dabei wurden die rot markierten Molekulargewichten, wie in Abbildung 4-30 dargestellt, eindeutig den theoretisch zu erwartenden Molekulargewichten zugeordnet. Bei dem isolierten Protein handelt es sich definitiv um DinB aus *G. stearothermophilus*.

MASWSHPQFEKGASTSLYKKAGSDDDDKMSTERESRGRIIFHVDCNSFFASCEIARHP
 TLREKPVVVAGDPKERR**GIVLAANYVAK**QQFGIYTTMPLWEAKRCLDLVVRPPDF
 AFYREMSRR**MFQWLER**FSPVLERASIDEGYLDMTGRTPTVPLAVAHQIQRGLLEQL
 SIPVSIGIAPNKFLAKMASEMKPLGITVLRKRDVPAVLWPLPVEQMHGVGDKTAKK
 LHALGLRMIGDIANADRALLEKTFGVYGLRLQER**ANGIDPRPVDPEATEK**WKSVGNS
 TTLPRDTDDEQELRAVLRKLAESVSRMKQKRVVSRTVQLTIRYRDFRTITRSQTEA
 APLQTADDLFLTAARLLKKHWDGRPVR**LLGVAALHVFDER**EEGKQLDLFR**YEEEAK**
 VEELLKTIEQLRAKFGDRALRTGAELLRGVRSPVPEKKGDVLNPK.

Abbildung 4-30: Proteinidentifizierung durch MALDI-MS; die experimentell bestimmten Massen der rot markierten Peptide wurden eindeutig den theoretischen Massen zugeordnet.

4.3.3 Expression und Reinigung von Pol η aus *S. cerevisiae*

Die low fidelity Polymerasen der Klasse Y erhöhen die Toleranz einer Zelle gegenüber DNA Schäden. Die am Besten untersuchte eukaryotische Polymerase aus dieser Klasse ist Pol η, welche gegenüber einem CPD Schaden zweimal dATP einbaut.^[249] Diese Polymerase ist dementsprechend in der Lage gegenüber einem Photodimerschaden, die richtigen komplementären Nukleotide einzufügen, ohne zu einem Replikationsstop oder Mutationen zu führen. Aus diesem Grund wurde Pol η ausgewählt für die Primerverlängerungsstudien, da hier die Wahrscheinlichkeit einer TLS (*trans lesions synthesis*) am größten ist. Für alle Experimente wurde eine modifizierte Pol η verwendet, die um 101 AS C-terminal verkürzt wurde. Dieser fehlende C-Terminus hat keinen Einfluß auf die Polymeraseaktivität. Diese Maßnahme ermöglicht lediglich eine effiziente und homogene Reinigung der Pol η, da es bei der Vollängenversion immer wieder zu proteolytischen Abbaufragmenten in *E. coli* kommt. Das zugehörige *Rad30* Gen wurde um 303 bp verkürzt und in den pDONR-201 Vektor mit Hilfe der Gatewaytechnologie kloniert. Als Quelle für die genomische DNA wurde der haploide *S. cerevisiae* Stamm YPH499 (ATCC 76625) verwendet. Die Expression wurde in dem *E. coli* K12 Stamm Rosetta ((DE3) *pLysS (CamR)*) durchgeführt. Dieser Bl21 Derivatstamm enthält Plasmide, auf denen zusätzliche eukaryotische tRNAs kodiert sind. Diese zusätzlichen eukaryotischen tRNAs ermöglichen eine effiziente Proteinexpression in *E. coli*, da hierdurch die *CodonUsage* in Prokaryoten durch eukaryotischen tRNAs erweitert wird. Als Expressionsvektor wurde der pExp-007-Pol η verwendet. In Abbildung 4-31 ist ein analytisches Gel dargestellt, in dem die Polymerase η fast 100% des Gesamtproteins nach dem ersten Reinigungschnitt ausmacht. Die Expression wurde unter den in Tabelle 4-6 angegebenen Expressionsbedingungen durchgeführt. Unter diesen Expressionsbedingungen konnten bis zu 3mg/mL Pol η pro Liter Medium homogen gereinigt werden.

Tabelle 4-6: Bedingungen für eine Expression von Pol η aus *S. cerevisiae*.

<i>E. coli</i> K12-Substamm	Rosetta (DE 3) <i>pLysS</i>
Wachstumstemperatur	37°C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	0,6
Endkonzentration Anhydrotetracyclin	400µM
Zeitdauer der Induktion	4h
Induktionstemperatur	22°C
Schüttlerumdrehungen	200 rpm

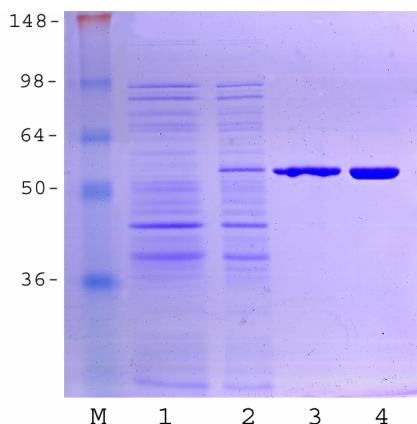


Abbildung 4-31: Spur M: Proteingrößenmarker, Spur 1: gesamtes Zellextrakt vor der Induktion, Spur 2: gesamtes Zellextrakt nach der Induktion mit Anhydrotetracyclin, Spur 3: gereinigte Pol η nach Strep-tagII Reinigung, Spur 4: homogen gereinigte Pol η nach SEC Reinigung .

Nach der Strep-tagII Reinigung wurde das Puffersystem der Pol η für die jeweiligen Experimente mit Hilfe der SEC ausgetauscht. Die Stabilität ist in einem Tris-HCl 100 mM und 20 mM KCl Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 und 10 mM β -Mercaptoethanol am Besten. Für die Kristallisationsexperimente wurde die Polymerase auf 8 mg/mL konzentriert. Für alle anderen Experimente auf 800 μ g/mL. Zur eindeutigen Proteinidentifizierung wurde die potentiell Pol η enthaltende Coomassie-gefärbte Bande ausgeschnitten und wie unter 3.6.1 beschrieben weiter analysiert. Dabei wurden die rot markierten Molekulargewichte, wie in Abbildung 4-32 dargestellt, eindeutig den theoretisch zu erwartenden Molekulargewichten zugeordnet. Bei dem isolierten Protein handelt es sich definitiv um die Polymerase η aus *S. cerevisiae*.

MASWSHPQFEKGASTSLYKKAGSDDDDKMSKFTWKELIQLGSPSKAYESSLACIAHI
 DMNAFFAQVEQMRCGLSKEDPVVCVQWNSIIAVSYAARKYGISRMDTIQEALKKCS
 NLIPIHTAVFKKGEDFWQYHDGCGSWVQDPAKQISVEDHK **VSLEPYRRESRKALKIF**
KSACDLVERASIDEVFLDLGRICFNMLMFDNEYELTGDLKLKDALSNIREAFIGGNYD
 INSHLPLIPEKIKSLK **FECDVFNPEGRD**LITDWDDVILALGSQVCKGIRDSIKDILGYTT
 SCGLSSTKNVCKLASNYKKPDAQTIVKNDCLLDFLDCGKFEITSFWTLGGVLGKELID
 VLDLPHENSIKHIRETWPDNAGQLKEFLDAKVQSDYDRSTSNI~~DPLKTADLA~~AEKLFK
 LSRGRY **GLPLSSRPVVK**SMMSNKNLRGKSCNSIVDCISWLEVCAELTSRIQDLEQYE
 NKIVIPRTVSISLKTKSYEVYRKSGPVAYKGINFQSHELLKVGIFVTDLDIKGKNKSY
 YPLTKLSMTITNFIDIIDLQKTVVDMFGNQV

Abbildung 4-32: Proteinidentifizierung durch MALDI-MS; die experimentell bestimmten Massen der rot markierten Peptide wurden eindeutig den theoretischen Massen zugeordnet.

4.3.4 Inkorporation gegenüber des synthetischen Sporenphotoschadens

Alle Inkorporationsexperimente wurden mit zwei Primer-Templat-Hybriden durchgeführt, einer Kombination mit synthetischem 5S-Isomer Sporenphototprodukt und einer Kombination mit normalen Thymidinen als Kontrolle (Abbildung 4-33). Dabei entspricht das synthetische 5S-Isomer Sporenphototprodukt nicht exakt dem natürlichen Sporenphotoprodukt, da keine Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Thymidinen vorhanden ist. Als Polymerasen wurde Pol η , DinB und das große Fragment der BstPol1 verwendet, welches keine 3'-5' Exonukleaseaktivität hat.

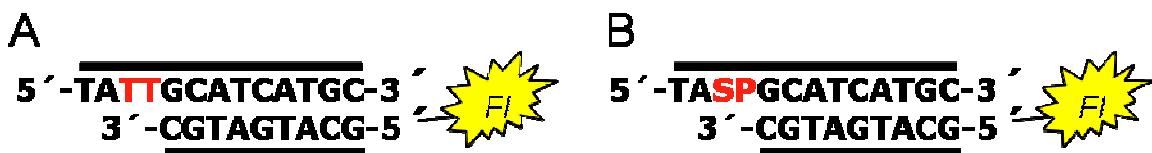


Abbildung 4-33: Templat-Primer-Konstrukte für die Inkorporationsexperimente; **A)** Kontrollkonstrukt **B)** SP Konstrukt Fl= Fluorescein, SP= 5S-SP.

Für die initialen Primerverlängerungsstudien wurden $50 \mu\text{M}$ des jeweiligen dNTPs zusammen mit der jeweiligen Polymerase inkubiert. Dabei sollte geklärt werden, welche Polymerase, welches dNTP prinzipiell gegenüber dem synthetischen Sporenphotoprodukt einbaut. Die Reaktionen wurden abhängig von der jeweiligen Polymerase Reaktionsgeschwindigkeit im Kontrollexperiment mit unterschiedlichen Polymerasekonzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Dabei zeigte sich sehr schnell, dass die Replikationsgeschwindigkeit von BstPol1 im Vergleich zu den beiden *low fidelity* Polymerasen sehr viel höher ist. Alle Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 4-34 dargestellt. Die Inkubationszeiten von DinB und BstBol1 wurden im Falle des Sporenphotoproduktes auf 70 min verlängert, um eine potentielle TLS zu detektieren. Es zeigte sich, dass alle Polymerasen gegenüber der 3'-Base des Sporenphotoproduktes ein dATP eingebaut wird. Diese Präferenz wurde selbst durch sehr lange Inkubationszeiten von über 1 h aufrechterhalten.

Die Inkubationszeiten der *low fidelity* Polymerase Pol η konnten bei diesen initialen Experimenten bei der Kontrolle und dem SP enthaltenden DNA Templat konstant gehalten werden. Bei beiden Messungen zeigte sich bereits nach 5 min eine Primerverlängerung um $n+2$. Die Polymerase η inkorporiert also präferiert zwei dATP gegenüber der 3'-Base und 5'-Base des Sporenphotoproduktes. Die Polymerasen DinB und BstBol1 bleiben nach der ersten Inkorporation eines dATPs stehen. Hier ist $k_{2\text{dis}}$ also größer als $v_{2\text{pol}}$ und führt zu keiner Verlängerung des Primers um $n+2$. DinB und BstBol1 sind damit nicht in der Lage *in vitro*

über das Sporenphotoprodukt zu replizieren. Es wäre nun möglich, die Einbaukinetik des ersten dATP's gegenüber der 3'-Base durch DinB und BstBol1 zu messen. Da beide Polymerasen allerdings nicht vollständig über das Sporenphototprodukt replizieren, wurden diese Versuche nicht durchgeführt.

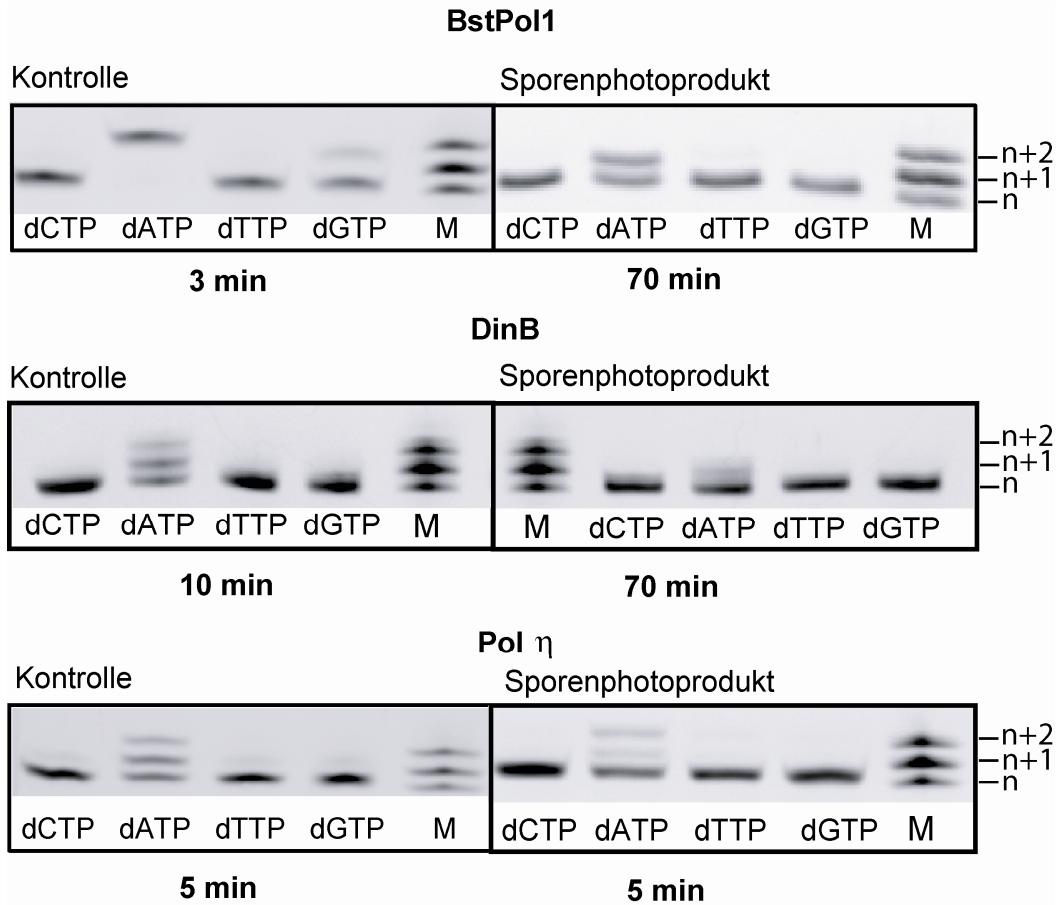
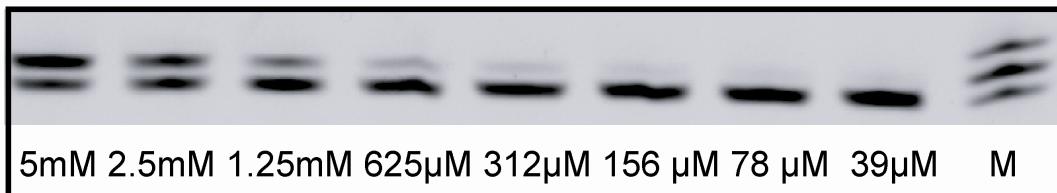


Abbildung 4-34: Replikation über das Sporenphotoprodukt durch die Polymerasen BstPol1, DinB und Pol η (M=Marker).

Um die kinetischen Parameter (K_M , V_{max} , k_{cat}) bzgl. der Pol η Replikation über das Sporenphotoprodukt mit der Kontroll-Primer-Templat Kombination zu vergleichen, wurden kinetische Messungen mit dATP durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe in Wasser bestehend aus 16 Konzentrationsstufen zwischen 0,61 μ M und 20 mM hergestellt und zusammen mit Pol η und den beiden Templat und Primer Kombinationen für 1,5 min inkubiert. Die DNA wurde mit Polyacrylamidgelen nach Länge getrennt und über die fluoreszierenden DNA-Banden mit Hilfe einer Auswertesoftware quantifiziert. Alle Experimente wurden doppelt durchgeführt, um den Messfehler möglichst gering zu halten. Ein typisches Gel einer Kinetikmessung ist in Abbildung 4-35 A abgebildet. Die erhaltenen Werte wurden im Anschluss in die unter 4.3.1 beschriebenen Formeln eingesetzt. Durch diese Messreihe konnten die Michaelis-Menten Kinetik des Einbaus von dATP gegenüber

Thymidin und der 3'-Base des Sporenphotoproduktes in Abbildung 4-35 B graphisch dargestellt werden.

A



Primerverlängerung gegenüber der 3'Base des SP durch Pol η in Abhängigkeit zur dATP Konzentration.

B

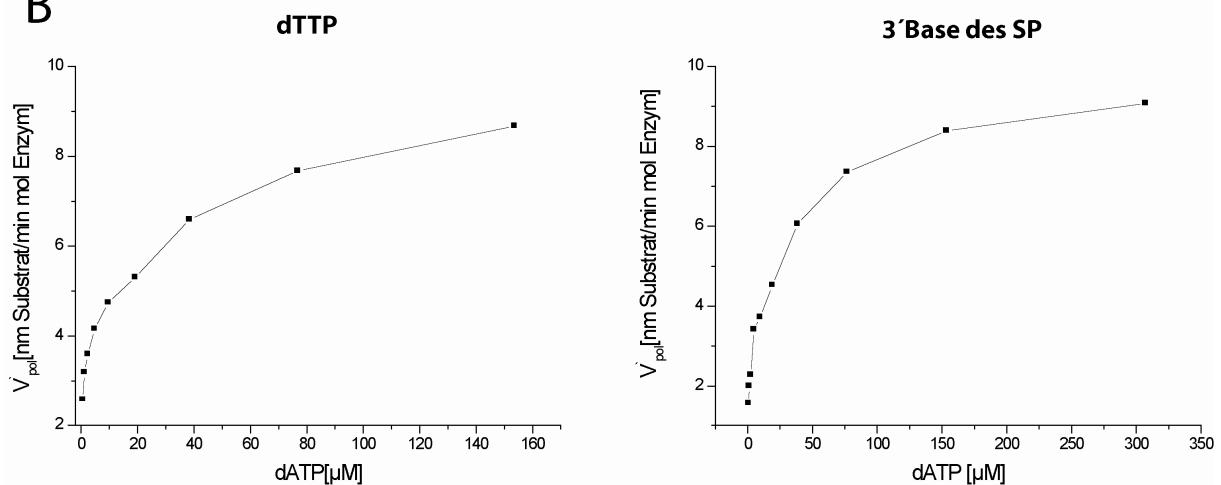


Abbildung 4-35: A) Typisches PAA-Gel zur Analyse der Primerverlängerung gegenüber der 3'-Base des Sporenphotoproduktes. Der Marker (M) besteht aus der Primerlänge (n) und dem um eine bzw. Basen verlängerten Primer n+1, n+2. B) Graphische Darstellung der Michaelis-Mentenkinetik vom dATP Einbau gegenüber Thymidin und der 3'-Base des Sporenphotoproduktes (SP).

Die aus diesen Messdaten berechneten Werte sind in Tabelle 4-7 zusammengefasst. Die Inkorporationseffizienz eines dATPs gegenüber einem normalen Thymidin durch Pol η ist also doppelt so effizient wie der Einbau eines dATPs gegenüber der 3'-Base des Sporenphotoproduktes.

Tabelle 4-7: Kinetischen Parameter der Insertion eines dATPs gegenüber T und der 3'-Base des Sporenphotoproduktes. Der angegebene Fehler ist der Standardfehler der gemittelten Werte aus der Lineweaver-Burk Darstellung.

	k_{cat} [min ⁻¹]	K_M [μmol]	k_{cat}/K_M [μmol ⁻¹ min ⁻¹]
dATP \rightarrow dTTP	$15,3 \pm 1,7$	$0,498 \pm 0,032$	$30,9 \pm 3,3$
dATP \rightarrow 3'Base SP	$12,1 \pm 1,1$	$0,868 \pm 0,021$	$13,9 \pm 2,4$

Die Polymerase Pol η inkorporiert also die richtige Base gegenüber 3'-Base des Sporenphotoproductes. Dieses geschieht jedoch mit einer um ca. 50 % reduzierten Effizienz. Parallel zu diesen Primerverlängerungsstudien wurde in Pol η in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis *Prof. Hopfner* und *Aaron Alt* kristallisiert. Aus diesen neuen Kokristallstrukturen von Pol η zusammen mit einem cis-Pt geschädigten DNA Strang konnten bislang unbekannte *hot spots* identifiziert werden, welche funktionell notwendig für die TLS von Pol η sind. Der Ausschnitt der Kokristallstruktur in Abbildung 4-36 zeigt einen dieser wichtigen AS Reste. Das hier dargestellte Arginin an Position 73 (A73) interagiert durch den positiven Rest der Seitenkette mit dem negativen geladen dNTP und ermöglicht so die Inkorporation gegenüber dem DNA Schaden. Um dieses theoretische Ergebnis experimentell zu belegen, wurde dieses Arginin durch gerichtete Mutagenese gegen ein Leucin ausgetauscht (A73L). Diese Pol η Mutante wurde im Anschluss für Primerverlängerungsstudien mit dem Sporenphotoprodukt verwendet. Das Ergebnis des Inkorporationsexperiments ist in Abbildung 4-37 dargestellt. Bei der Pol η (A73L) Variante kommt es nicht zur TLS über das Sporenphotoprodukt. Es wird lediglich ein dATP gegenüber der 3'-Base des Sporenphotoproductes inkorporiert, dann stoppt die Polymerase. Dieses geschieht auch bei sehr hohen Enzymkonzentrationen und langen Inkubationszeiten.

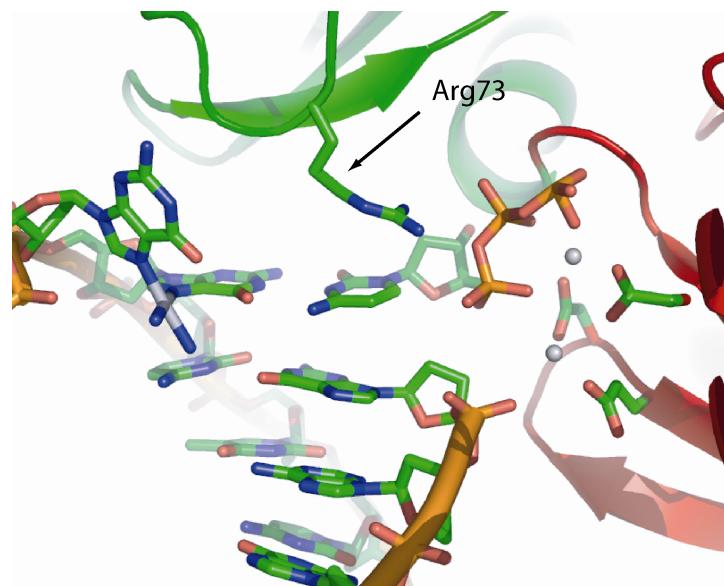


Abbildung 4-36: Ausschnitt aus der Kokristallstruktur von Pol η mit cis-Pt geschädigter DNA. Arg73 interagiert mit dem ankommenden dNTP, welches gegenüber der 3'-Base des Schadens inkorporiert wird.



Abbildung 4-37: Vergleich der TLS über das Sporenphotoprodukt zwischen wildtyp (wt) Pol η und der A73L Mutante. Der Marker (M) besteht aus der Primerlänge (n) und dem um eine bzw. Basen verlängerten Primer n+1, n+2.

4.3.5 *In vivo* Replikation des Sporenphotoproduktes

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels beschreiben die Vorgänge der Replikation des Sporenphotoproduktes *in vitro* durch verschiedene Polymerasen. Um ein Gesamtbild über die Replikation des Sporenphotoproduktes zu bekommen, werden in diesem Abschnitt *in vivo* Ergebnisse dargestellt. Für diese Experimente wurde ein natürliches Sporenphotoprodukt verwendet, welches durch Belichtung von DNA generiert wurde. Die Durchführung dieser Experimente ist in Abbildung 4-38 graphisch dargestellt.

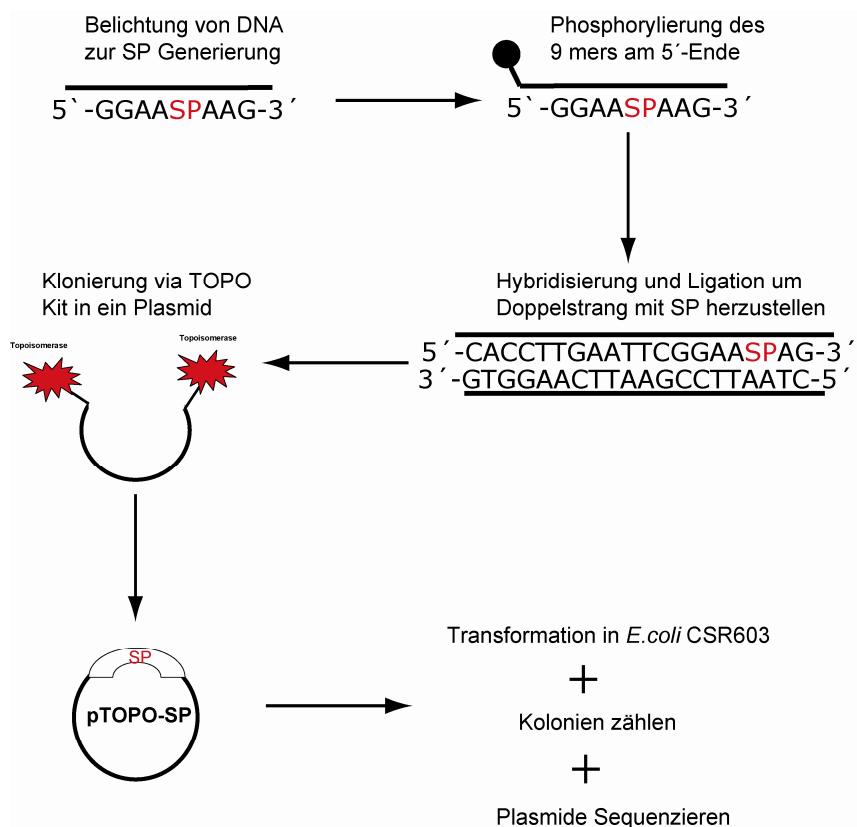


Abbildung 4-38: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die *in vivo* Replikationsstudien des Sporenphotoproduktes.

Als erstes wurde der Einzelstrang belichtet und der Sporenphotoprodukt enthaltende DNA durch präparative *rp*-HPLC für die folgenden Arbeitsschritte gereinigt (4-38). Danach wurde das 9 mer am 5'-Ende phosphoryliert und mit einem komplementären DNA Strang und einer 3'-seitigen Verlängerung hybridisiert. Dieses Hybridisierungsprodukt wurde im Anschluss durch Ligase zu einem 20 bp langen Doppelstrang ligiert. Die Kontrolle dieser Schritte erfolgte mittels FTICR-MS. Dazu wurde die Ligationsreaktion auf einer Membran für mindestens 1 h entsalzt und dann direkt ins Massenspektrometer injiziert. Die berechnete Masse des Ligationsproduktes ist größer als die Masse des eingesetzten Gegenstranges, so dass diese sehr gut voneinander zu unterscheiden sind. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 4-39 dargestellt, in der die Masse des eingesetzten Gegenstranges und auch die Masse des Ligationsproduktes zu sehen ist. Die quantitative Phosphorylierung und Ligation der Sporenphotoprodukt enthaltenden DNA war also erfolgreich.

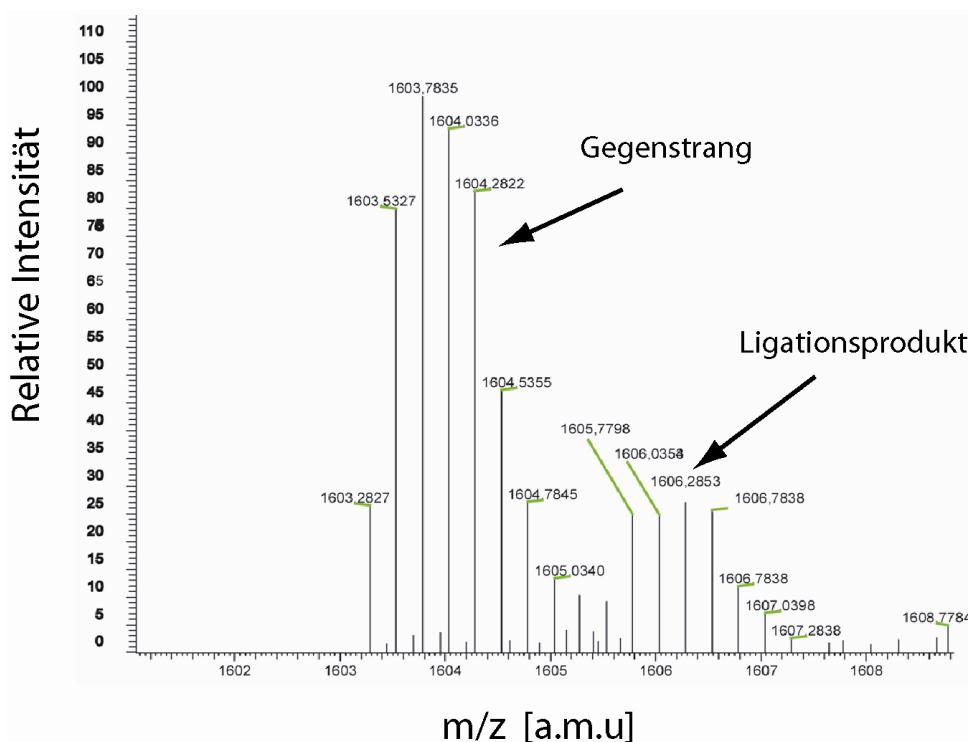


Abbildung 4-39: Massenspektrum von den Produkten (=Isotopenmuster) der Ligationsreaktion.

In dieser hergestellten Doppelstrangform mit der 5'seitigen Sequenz CACC ist es nun möglich das 20 bp Fragment durch die TOPO Reaktion in ein Plasmid zu integrieren. Das entstandene Plasmid pTOPO-SP konnte im Anschluss in den *E. coli* Stamm CSR603 transformiert werden. Dieser *E. coli* Stamm ist defizient bzgl. homologer Rekombination (*recA*⁻), CPD-Photolyase (*phr*⁻) und Nukleotid Excisions Reparatur (*uvrA*⁻). Er hat demnach nicht die Möglichkeit das Sporenphotoprodukt im Plasmid zu reparieren. Dieser Stamm muss

also im Falle der Zellteilung das transformierte Plasmid replizieren. Um sicherzustellen, dass die TOPO Reaktion funktioniert hat, wurden die Plasmide mit der Restriktionsendonuklease EcoR1 verdaut. Da in dem ligierten 20 bp Doppelstrang die Erkennungssequenz von EcoR1 vorhanden ist, kann man durch Linearisierung des pTOPO-SP den Erfolg der Klonierung überprüfen. Ein linearisierte Plasmid mit Insert läuft im Agarosegel weiter oben als die Supercoil Variante. Das Ergebnis eines solchen Kontrollverdaus ist in Abbildung 4-40 dargestellt. Durch diese Analyse konnte sichergestellt werden, dass nur Transformanten mit dem 20 bp Fragment im Plasmid zur Sequenzierung verwendet wurden.

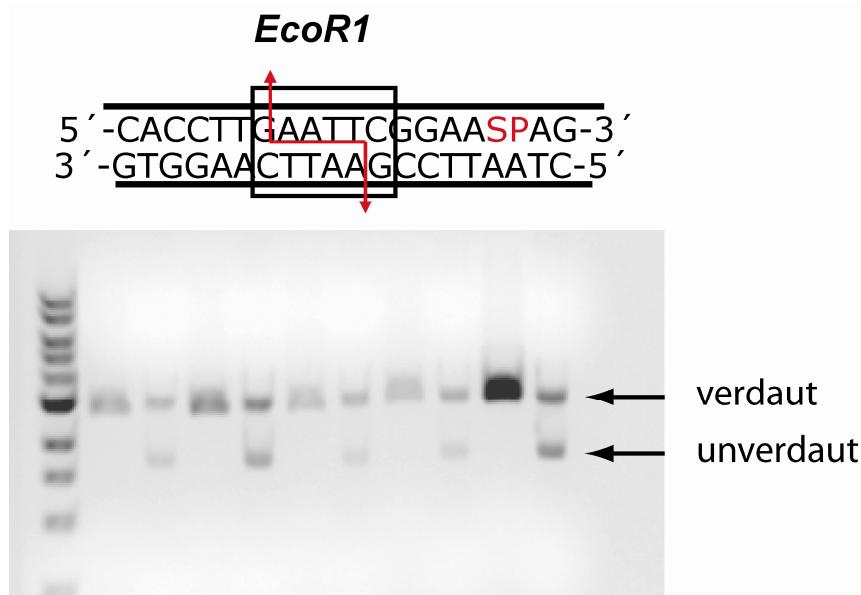


Abbildung 4-40: Anayltisches Agarosegel zur Kontrolle der TOPO-Reaktion.

Für die weitere Analyse stehen zwei Datensätze zur Verfügung. Die Anzahl der erhaltenen Kolonien mit SP im Plasmid konnten mit der Anzahl an Kolonien die mit einem Kontrollinsert gewachsen sind verglichen werden. Das Kontrollinsert hat an der Position des SP zwei Thymidine. Der zweite Datensatz wurde aus den Ergebnissen der Sequenzierreaktion erhalten. Die Ergebnisse aus beiden Analysen sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Tabelle 4-8: *Colony forming units* nach der Transformation in CSR603 und Ergebnisse der anschließenden Sequenzierung.

	3'Base SP	5'Base SP	Kontrolle 3'	Kontrolle 5'
dATP	100%	100%	100%	100%
dCTP	0	0	0	0
dGTP	0	0	0	0
dTTP	0	0	0	0
	Sporenphotoprodukt		Kontrolle	
CFU	112		978	

Die Anzahl der Kolonien (*Colony forming units* = CFU) nach einer Transformation des pTOPO-SP Plasmids ist im Vergleich zum Kontrollplasmid um 88 % reduziert. Es ist davon auszugehen, dass die replikativen Polymerasen durch den SP-Schaden gestoppt wurden und die Zellen danach absterben. *In vivo* führt das natürliche Sporenphotoprodukt auch zu einem hohen Maß zum Replikationstop. Die erhaltenen 112 Kolonien wurden sequenziert und zeigten, identisch zu den Ergebnissen des *in vitro* Assays, die gleichen Resultate. Auch *in vivo* werden zwei dATPs gegenüber dem Sporenphotoprodukt inkorporiert.

4.3.6 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel ist die Entwicklung von zwei Assays beschrieben, mit denen die Replikation durch Polymerasen über das Sporenphotoprodukt *in vitro* und auch *in vivo* genau analysiert werden kann. Für die *in vitro* Studien konnten erfolgreich zwei *low fidelity* Polymerasen der Familie Y kloniert, exprimiert und homogen gereinigt werden. Die Reinigung der Polymerase η konnte soweit optimiert werden, dass Kristallisationsexperimente zu einer Kokristallstruktur mit DNA Schäden führten. Die mit diesen Polymerasen durchgeführten *in vitro* Inkorporationsexperimente zeigten, dass die Polymerase DinB aus *G. stearothermophilus* nicht über das Sporenphotoprodukt replizieren kann. Gegenüber der 3'-Base des Sporenphotoproduktes wird ein dATP eingebaut, die Replikation über die 3'-Base findet nicht statt. Diese Ergebnisse zeigten sich auch bei den Replikationsexperimenten mit der *high fidelity* Polymerase BstPol 1 aus *G. stearothermophilus*. Der Einbau eines dATP gegenüber der 3'-Base kann aus zwei Gründen stattfinden. Die Inkorporation von dATP kann aufgrund der *A-rule* stattfinden.^[36] Diese Regel beschreibt, dass im Falle einer Fehlbase (*AP site*) immer gegenüber ein dATP im Tochterstrang eingebaut wird. Die Existenz des Sporenphotoproduktes muss also nicht zur Inkorporation des homologen dATPs gegenüber der 3'-Base führen. Die 3'-Base kann auch so verdreht vorliegen, dass sie als Fehlbase durch DinB und BstPol1 erkannt wird. Eine Weiterreplikation über die 5'-Base findet aufgrund der sterischen Gegebenheiten zwischen SP und BstPol bzw. DinB nicht statt. Die einzige Polymerase, die im *in vitro* Assay über das SP replizieren kann, ist Pol η . Diese Polymerase repliziert über das Sporenphotoprodukt und inkorporiert die richtigen homologen dATPs gegenüber dem Schaden in den Tochterstrang. Eine detektierbare Falschinkorporation findet nicht statt. Die berechnete Replikationseffizienz vom dATP Einbau gegenüber der 3'-Base ist um ca. 50 % schlechter als bei einem ungeschädigten Thymidin an dieser Stelle.

Die mit dem natürlichen Sporenphotoprodukt durchgeführten *in vivo* Versuche zeigen, dass ein Großteil (~90 %) der Plasmide mit einem Sporenphotoprodukt *in vivo* nicht repliziert

werden können und zum Absterben der Zellen führen. Diese Kolonien wurden sequenziert und zeigen eine fehlerfreie Replikation des SP. Die erhaltenen *in vivo* und *in vitro* Daten liefern zwar dieselben Ergebnisse, ein Vergleich ist aber aufgrund der Verwendung von natürlichem und synthetischem Sporenphotoprodukt, ohne Phosphodiester, wenig sinnvoll. Die *in vivo* Experimente sollten nochmal mit SOS induzierten CSR603 Zellen durchgeführt werden, da die Replikationsfähigkeit über Schäden unter diesen Umständen verbessert ist. Ungeklärt ist weiterhin, welche Polymerase in *E. coli* und damit auch in *G. stearothermophilus* über das SP replizieren kann, da in beiden Prokaryoten nur DinB als *low fidelity* Polymerasen vorkommt. Vermutlich ist hier ein Enzymkomplex an der Replikation beteiligt. Diese Ergebnisse zeigen auch, wie wichtig eine effiziente Reparatur des Sporenphotoproduktes zum Zeitpunkt der Sporengeneration ist, da dieser Schaden zu einem hohen Maße letal auf die Zellen wirkt.

4.4 Ortsspezifische Generierung eines CPD Schadens

In den vorherigen Kapiteln ist deutlich geworden, dass es für *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen bzgl. Replikation, Erkennung und Reparatur von DNA Schäden notwendig ist, diese DNA Schäden an einer definierten Stelle im DNA Molekül zu generieren. Für die Erzeugung eines CPD Schadens in DNA steht bislang ausschließlich die Synthese von Oligonukleotiden mit anschließender Integration in ein großes DNA Molekül zu Verfügung. In diesem Kapitel wird ein Verfahren zur selektiven und sequenzspezifischen Erzeugung eines CPD Schadens in langen Oligonukleotiden und im M13 Phagengenom beschrieben.

4.4.1 Einleitung zum Verfahren

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein im Arbeitskreis durch Clemens Haas ^[230] entwickeltes, neuartiges Verfahren zur selektiven und sequenzspezifischen Erzeugung von CPD Schäden in DNA weiterentwickelt worden. Am Ende sollte es möglich sein, biologische relevante Systeme, wie lange Oligonukleotide oder ganze Genome, gezielt an einer Stelle mit einem CPD Schaden zu versehen. Dieses Verfahren besteht aus der Kombination von zwei DNA Eigenschaften:

1. CPD-Schäden können unter Verwendung von Triplettsensibilisatoren, wie Acetophenon, und Bestrahlung mit UV-A Strahlung selektiv, ohne Nebenreaktionen jedoch nicht ortsspezifisch in DNA generiert werden.
2. Komplementäre PNA bindet besser an DNA, als ein komplementärer DNA Strang, was zur Verdrängung des komplementären DNA Stranges führt.

Die Kombination aus diesen DNA Eigenschaften führte zur Entwicklung von einzigartigen Sonden die beide Eigenschaften vereinen. In Abbildung 4-41 ist eine Übersicht zum eingesetzten Verfahren dargestellt. Die verwendeten PNA Sonden mit dem Acetophenon Baustein wurden von *Dr. Friederike Grolle* und *David Kuch* synthetisiert und im Anschluss mit der zu schädigenden DNA hybridisiert. Danach wurde der PNA-DNA Hybrid mit UV-A Licht (340 nm) durch eine 1kW Lampe für 4 h belichtet. Die Hybride wurden mittels *rp*-HPLC wieder voneinander getrennt und die nun CPD enthaltende DNA mit dem komplementären DNA Strang zur weiteren Analyse hybridisiert.

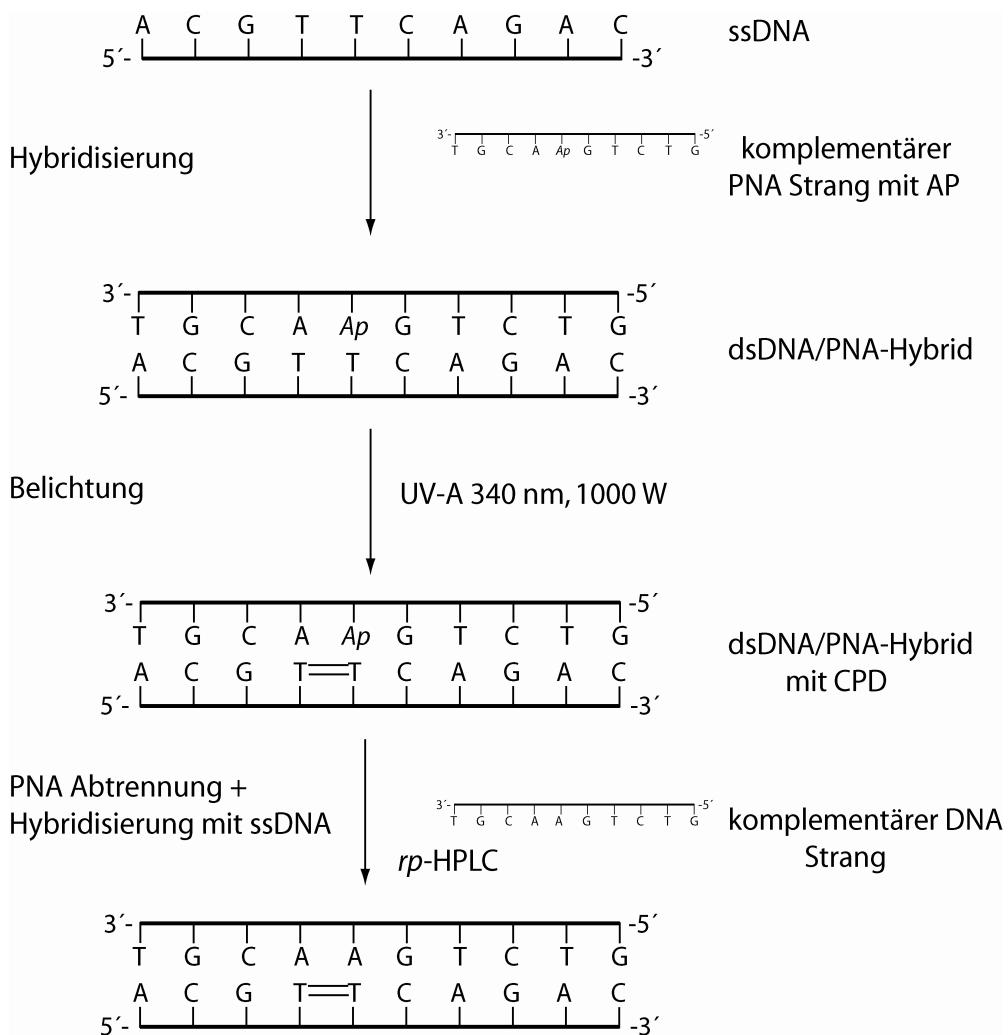


Abbildung 4-41: Verfahren zur selektiven CPD Generierung in DNA, AP=Acetophenon, T=T Pyrimidin Dimer.

4.4.2 Generierung eines CPD Schadens in langen Oligonukleotiden

Nachdem von Clemens Hass gezeigt werden konnte, dass die konstruierten PNA-Sonden geeignete Reagenzien zur Generierung von CPD-Schäden darstellen, sollte die Anwendung zur sequenzspezifischen Schädigung unter Beweis gestellt werden. Hierzu wurde ein

Modellsystem entwickelt, welches aus einem langen Oligonukleotid besteht und an zwei Stellen benachbarte Thymidine besitzt, die potentiell einen CPD-Schaden ausbilden können. Nach den durchgeführten Hybrisisierungen mit der PNA und anschließenden Belichtungen, sollte nur eines der beiden Thymidinpaare in einen CPD Schaden konvertieren, womit sich die Selektivität des Verfahrens testen lässt. Als PNA-Sonde wurde ein 13 Basen langes PNA Oligomer ausgewählt, da diese Länge in vorangegangen Studien zur höchsten Schädigungseffizienz und Sequenzdiskriminierung führte. Die in Abbildung 4-42 dargestellte PNA und DNA wurde in einer Konzentration von jeweils 20 μ M in einem Puffer (10 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄) in einer PCR Maschine hybridisiert und im Anschluss für 240 min mit 340 nm belichtet. Die Abtrennung der PNA erfolgte danach unter denaturierenden Bedingungen bei 55°C mittels *rp*-HPLC. Zur Lokalisierung des CPD-Schaden musste der DNA Strang zunächst wieder mit einem komplementären DNA Strang hybridisiert werden. Im Anschluss wurde der Doppelstrang mit Hilfe des Restriktionsenzymes BstU1 in zwei Fragmente geschnitten. Die Fragmente wurden auf der *rp*-HPLC getrennt und mit dem in Abbildung 4-42 dargestellten analytischen PAA-Gel auf Reinheit überprüft. Die 15 bp und 36 bp Fragmente wurden im Anschluss jeweils einem enzymatischen Totalverdau unterzogen.

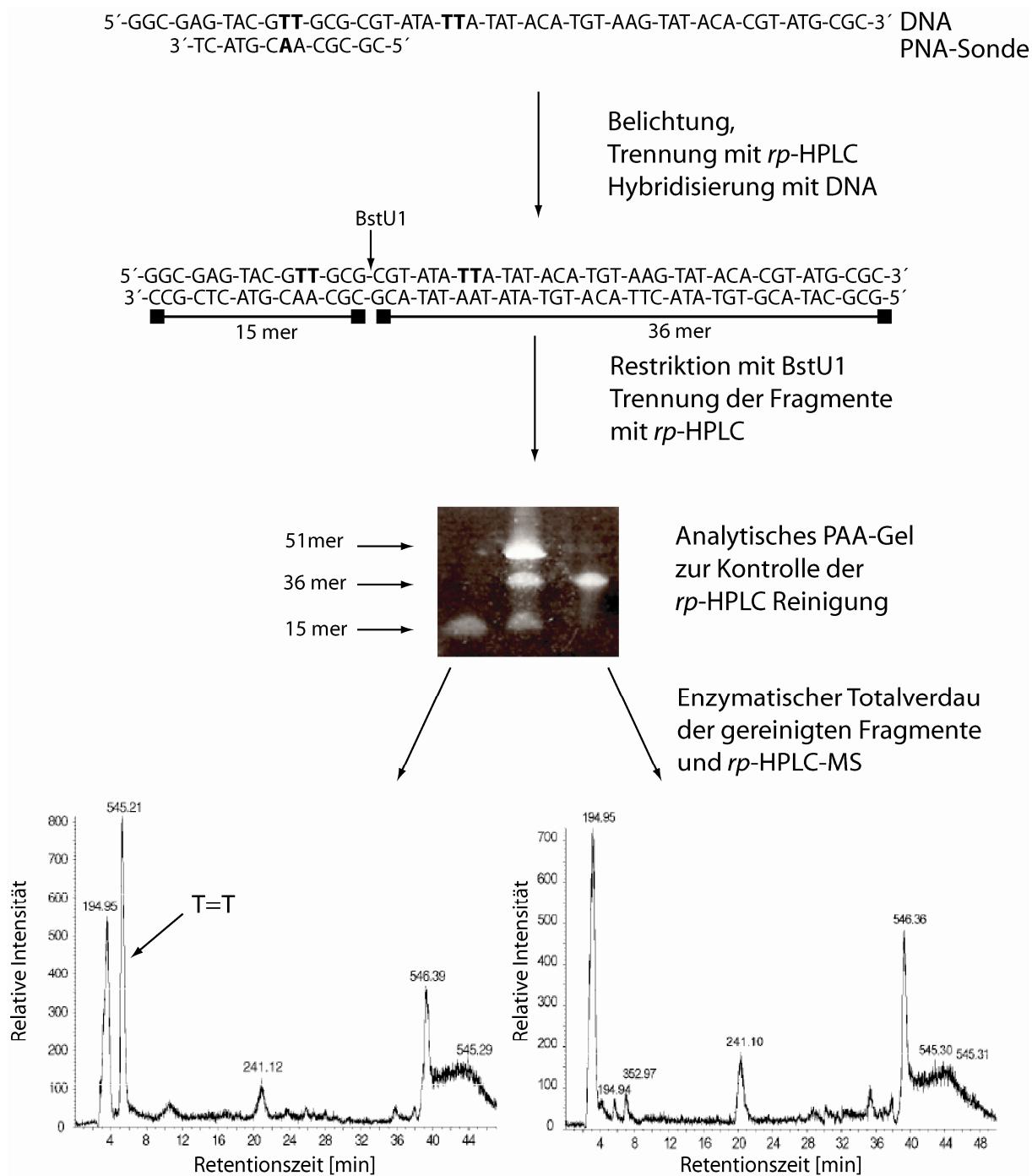


Abbildung 4-42: Selektive Erzeugung eines CPD Schadens in einem 51 Basen Oligonukleotid, (A=Acetophenonbaustein).

Zum Nachweis der selektiven Schädigung wurden die belichteten DNA-Proben nach dem Restriktionsverdau und Totalverdau durch *rp*-HPLC-MS analysiert. Das dabei erhaltene HPLC-Chromatogramm inklusive der gemessenen Massen ist im unteren Abschnitt in Abbildung 4-42 dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass nur im kurzen 15 bp Doppelstrang ein Thymidindimer mit einer Masse von $m/z = 545$ und der zugehörigen Retentionszeit von ca. 5 min vorhanden ist. Dieses Thymidindimer ist im langen 36 bp Fragment nicht vorhanden. Die Sonde bindet also spezifisch an der homologen Sequenz und generiert durch UV-A Belichtung auch nur in

diesem Fragment an gewünschter Stelle ein Thymidindimer. Die Identifizierung des Photodimerschadens erfolgte wieder durch weitere Massenfragmentierung. Dazu wurde der erste Quadrupol auf die Masse (m/z) 545 eingestellt. Das Fragmentierungsmuster des Signals mit der Retentionszeit von 5 min ist in völliger Übereinstimmung mit den Daten von *Cadet et al.*, die für das *cis-syn*-CPD-Phototprodukt erhalten wurden (Abbildung 4-43).^[47] Der selektiv und ortsspezifisch erzeugte Dimerschaden ist also das gewünschte *cis-syn*-CPD.

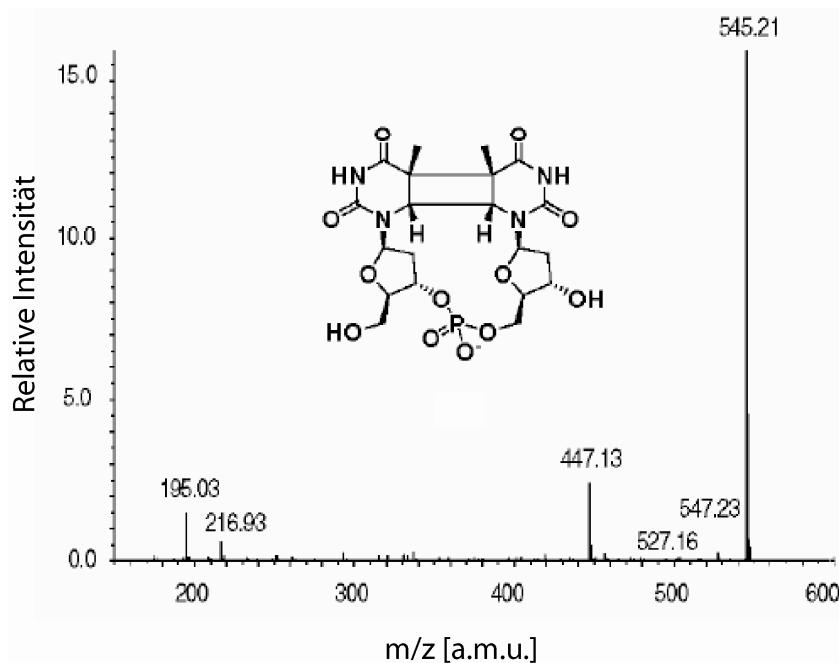


Abbildung 4-43: Fragmentierungsmuster des dTpT *cis-syn* CPD Schadens.

4.4.3 Generierung eines CPD Schadens im M13-Genom

Das unter 4.4.2 beschriebene und etablierte Verfahren wurde im nächsten Schritt auf die Möglichkeit zur CPD Erzeugung in einem kompletten Genom getestet. Für dieses Experiment wurde in großen Mengen einzelsträngige genomische DNA des filamentösen M13 Bakteriophagen, wie unter 3.3.14 beschrieben, präpariert. In Abbildung 4-44 ist die nachfolgende Vorgehensweise zur CPD Erzeugung im M13 Genom schematisch dargestellt. Identisch zur CPD Erzeugung im Oligonukleotid wurde zu Anfang mit der entsprechenden PNA Sonde (5'-KK-GTT-GTC-*AAC*-GCG-C-KK-3') inkl. Acetophenonbaustein (**A**) hybridisiert, belichtet und die genomische DNA durch *rp*-HPLC wieder von der PNA getrennt. Bei dieser Trennung konnte die genomische DNA zusätzlich von RNA Resten gereinigt werden, welche durch die M13 DNA Präparation in die Reaktion gelangen. Anschließend wurde die DNA an der Stelle des erzeugten CPD Schadens mit einem Biotin

(T^B) gelabelten komplementären DNA Oligonukleotid (5'- TCG- CCA- TTC- AGG- CTG- CGC- AAC- TGT- T^BGG -GAA -GGG -CGA -TCG- GT-3') hybridisiert.

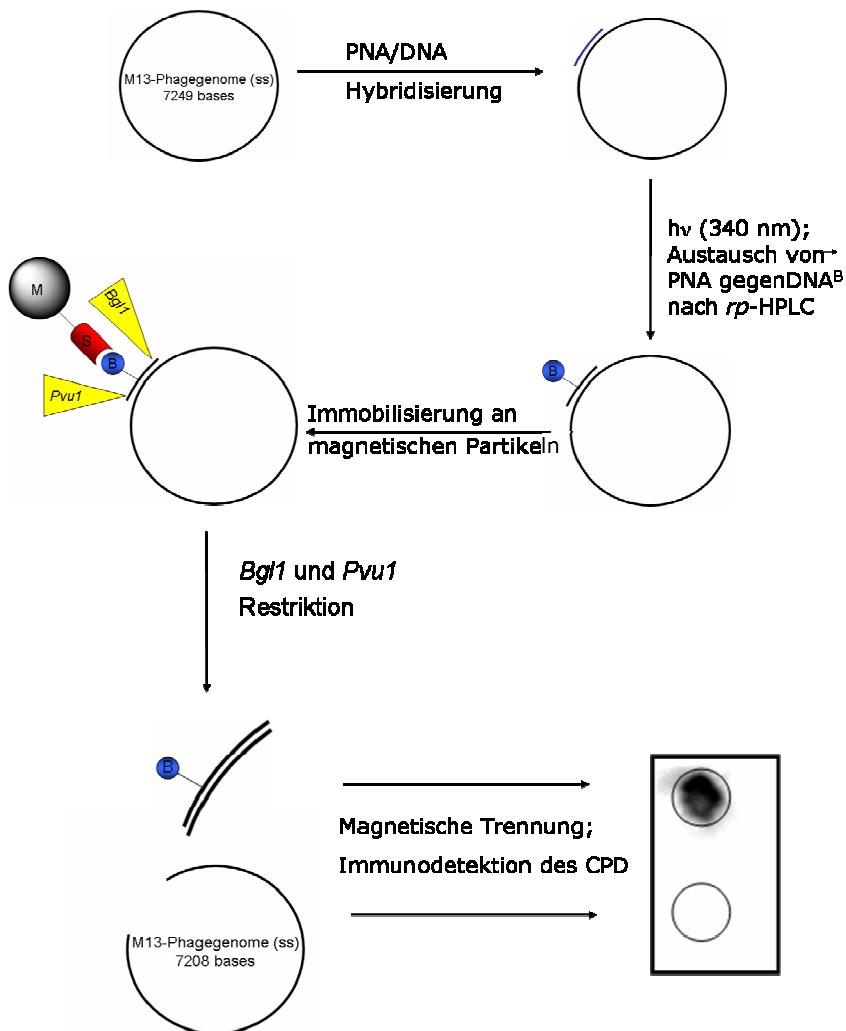


Abbildung 4-44: Schematische Darstellung zur CPD Erzeugung im M13 Genom; B=Biotin; S= Streptavidin.

Durch das Einführen des Biotins ist es in der Folge möglich, das komplette DNA Konstrukt an einem mit Streptavidin beschichteten magnetischen *Bead* zu immobilisieren. An dieser festen Phase wurde nun die DNA mit den Restriktionsenzymen Bgl1 und Pvu1 in zwei Fragmente geschnitten. Das große Fragment besteht aus Einzelstrang DNA, die einen Großteil des M13 Phagengenoms darstellt. In diesem Abschnitt sollte kein CPD-Schaden erzeugt werden. Das kurze Doppelstrangfragment besteht aus einem kurzen Fragment des M13 Phagengenoms und aus dem komplementären Teil des Biotin-markierten Oligonukleotids. Zur Detektion des CPD Schadens wurden beide Teile konzentriert und auf einer positiv gelandeten Nylonmembran durch trockene Hitze immobilisiert. Im Anschluss wurde eine Immunodetektion mit einem Anti-CPD-AK durchgeführt. Hier zeigte sich erneut, dass nur im gewünschten Abschnitt eine ortspezifische CPD Generierung durchgeführt wurde. Die CPD Generierung ist demnach auch in sehr großen DNA Molekülen selektiv möglich.

4.4.2 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neuartige PNA-Acetophenon-Sonden geeignete Reagenzien zur selektiven und sequenzspezifischen Generierung von CPD-Schäden darstellen. In Studien mit langen Oligonukleotiden konnten bei einer Wellenlänge von 340 nm innerhalb von 240 min selektiv und hoch sequenzspezifisch ein *cis-syn*-Cyclobutan-Thymidin-Dimer gebildet werden. Der eindeutige Nachweis des CPD Schadens konnte mittels massenspektrometrischer Untersuchungen und Vergleich der erhaltenen Daten mit den Literaturwerten belegt werden. Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass das etablierte Verfahren auch zur Generierung von CPD Schäden in sehr großen DNA Fragmenten effektiv und sequenzspezifisch eingesetzt werden kann. In einem M13 Bakteriophagengenom konnte an einer spezifischen Stelle innerhalb von 7221 Basen selektiv ein CPD Schaden generiert werden. Dieser konnte mit Hilfe von magnetischen Partikeln und Antikörpern gegen den CPD Schaden eindeutig belegt werden. Um dieses System in zukünftigen Arbeiten für *in vivo* Studien nutzen zu können, muss eine Möglichkeit zur Doppelstrang Integration erarbeitet werden. Da DNA *in vivo* ausschließlich in doppelsträngiger Form vorliegt, müssen Systeme entwickelt werden, die *dsDNA* sequenzspezifisch adressieren können. Mit diesem System wäre lediglich ein Einsatz zum Zeitpunkt der DNA Replikation möglich, in der die DNA für einige Zeit als einzelsträngige DNA mit den PNA Sonden hybridisieren kann.

5. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
	Diamoniumsalz
AdoH	5'-Desoxyadenosin
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
BER	Basenexzisionsreparatur
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CPD	Cyclobutan-pyrimidin-Dimer
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dd	Bidestilliertes Wasser
dGTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreithol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etyldiamintetraessigsäure
ESI	Elektronensprayionisierung
FAD	Flavinadenindinukleotid

Fa.	Firma
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Intensität
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo
konz.	konzentriert
L	Liter
Lsg	Lösung
M	molar
m	Meter
m	milli (10^{-3})
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
min	Minute
MS	Massenspektrum
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
R_f	Retentionfaktor
rp	<i>reversed phase</i>
s	Sekunde
ss	einzelsträngig
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SASP	<i>small acid soluble protein</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
SplG	Sporenphotoproduktlyase aus <i>G. stearothermophilus</i>
SplB	Sporenphotoproduktlyase aus <i>B. subtilis</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TEMED	<i>N,N,N',N</i> '-Tetramethylendiamin
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
v/v	Volumenanteil (volume per volume)
w/v	Massenanteil (weight per volume)

6. Literaturverzeichnis

- [1] L. F. Cavalieri, A. Bendich, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2587–2594.The Ultraviolet Absorption Spectra of Pyrimidines and Purines.
- [2] J.-S. Taylor, *J. Chem. Ed.* **1990**, *67*, 835-841.DNA, sunlight and skin cancer.
- [3] J. S. Taylor, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 183-190.DNA, sunlight and skin-cancer.
- [4] S. Tommasi, M. F. Denissenko, G. P. Pfeifer, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4727-4730.Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases.
- [5] A. Villarino, M. N. Rager, P. A. D. Grimont , O. M. M. Bouvet, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2689-2695.Are UV-induced nonculturable *Escherichia coli* K-12 cells alive or dead.
- [6] M. Tanaka, S. Nakajima, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Yamamoto, *Mutagenesis* **2001**, *16*, 1-6.Effects of photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts on ultraviolet mutagenesis in SOS-induced repair-deficient *Escherichia coli*.
- [7] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2238.Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
- [8] W. Schul, J. Jans, Y. M. A. Rijken, K. H. M. Kleemann, A. P. M. Eker, J. de Wit, O. Nikaido, S. Nakajima, A. Yasui, J. H. J. Hoeijmakers, G. T. J. van der Horst, *EMBO J.* **2002**, *21*, 4719-4729. Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice.
- [9] P. Setlow, *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **1994**, *76*, 49-60.Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species.
- [10] P. Setlow, *Comments Mol. Cell. Biophys.* **1988**, *5*, 253-264.Resistance of bacterial spores to ultraviolet light.
- [11] M. Dalle Carbonare, M. A. Pathak, *J. Photochem. Photobiol.* **1992**, *14*, 105-124.Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging.
- [12] C. Smith, M. J. Hutchinson, O. I. Aruoma, B. Halliwell, *J. Biochem.* **1992**, *286*, 901-905. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions.
- [13] A. Besaratinia, T. W. Synold, H. H. Chen, C. Chang, Xi B, A. D. Riggs, G. P. Pfeifer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10058-10063.DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene.
- [14] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13765-13770.Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation.

- [15] J. Cadet, P. Vigny, in *Bioorganic Photochemistry, Vol. 1* (Ed.: H. Morrison), Wiley, New York, **1990**, pp. 1-272.
- [16] G. P. Pfeifer, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 270-283. Formation and processing of UV photoproducts: Effects of DNA sequence and chromatin environment.
- [17] A. A. Shaw, A. M. Falick, M. D. Shetlar, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10976-10983. Photoreactions of thymine and thymidine with N-acetyltyrosine.
- [18] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *4*, 591-597. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species.
- [19] P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256-4263. Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: Intermolecular energy and electron transfer.
- [20] V. I. Danilov, A. Les, J. L. Alderfer, *J. Biomol. Struc. Dyn.* **2001**, *19*, 179-191. A theoretical study of the cis-syn pyrimidine dimers in the gas phase and water cluster and a tautomer-bypass mechanism for the origin of UV-induced mutations.
- [21] J. Nan, J.-S. Taylor, *Biochemistry* **1993**, *32*, 472-481. In vivo evidence that UV-induced C ? T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products.
- [22] Y. Tu, R. Dammann, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 297-311. Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers *in vivo*.
- [23] M. J. Horsfall, A. Borden, C. W. Lawrence, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2835-2839. Mutagenic Properties of the T-C Cyclobutane Dimer.
- [24] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.
- [25] A. Burger, D. Fix, H. Liu, J. Hays, R. Bockrath, *Mutation Res.* **2003**, *522*, 145-156. *In vivo* deamination of cytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimers in *E. coli*: A feasible part of UV-mutagenesis.
- [26] M. Ruiz-Rubio, R. Bockrath, *Mutation Res.* **1989**, *210*, 93-102. On the possible role of cytosine deamination in delayed photoreversal mutagenesis targeted at thyrrdne-cytosine dimers in *E. coli*.
- [27] G. P. Pfeifer, Y.-H. You, A. Besaratinia, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 19-31. Mutations induced by ultraviolet light.
- [28] S. Person, J. A. McCloskey, W. Snipes, R. C. Bockrath, *Genetics* **1974**, *78*, 1035-1049. Ultraviolet mutagenesis and its repair in an *Escherichia coli* strain containing a nonsense codon.

- [29] D. M. Brown, M. J. E. Hewlins, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 2050-2055.Dihydrocytosine and Related Compounds.
- [30] C. A. Smith, M. Wang, N. Jiang, L. Che, X. D. Zhao, J. S. Taylor, *Biochemistry* **1996**, 35, 4146-4154.Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific *cis*- *syn*, *trans*-*syn*-*I*, (6-4), and dewar pyrimidone photoproducts of thymidylyl-(3'->5')-thymidine in *Escherichia coli* under SOS conditions.
- [31] M. F. Denissenko, J. X. Chen, M. S. Tang, G. P. Pfeifer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 3893–3898.Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human p53 gene.
- [32] G. P. Pfeifer, M. Tang, M. F. Denissenko, *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **2000**, 249, 1-19.Mutation hotspots and DNA methylation.
- [33] B. Vu, V. J. Cannistraro, L. Sun, J. S. Taylor, *Biochemistry* **2006**, 45, 9327-9335.DNA Synthesis Past a 5-MethylC-Containing *cis*-*syn*-Cyclobutane Pyrimidine Dimer by Yeast Pol eta Is Highly Nonmutagenic.
- [34] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, 571, 3-17.Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA.
- [35] Y.-H. You, C. Li, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **1999**, 193, 493-503.Involvement of 5-methylcytosine in sunlight-induced mutagenesis.
- [36] J.-S. Taylor, *Mutat. Res.* **2002**, 510, 55-70.New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions.
- [37] T. Douki, T. Zalizniak, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 66, 171-179.Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: Sequence effects.
- [38] H. Kamiya, S. Iwai, H. Kasai, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 2611-2617.The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells.
- [39] P. E. M. Gibbs, A. Borden, C. W. Lawrence, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 1919–1922.The T-T pyrimidine (6-4) pyrimidinone UV photoproduct is much less mutagenic in yeast than in *Escherichia coli*.
- [40] E. J. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 9685-9689.The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*.
- [41] J.-K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 228, 849-854.The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.

- [42] Y. Fujiwara, S. Iwai, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11050-11050.Thermodynamic studies of the hybridization properties of photolesions in DNA.
- [43] H. E. Johns, M. L. Pearson, J. C. LeBlanc, C. W. Helleiner, *J. Mol. Biol.* **1964**, *9*, 503-524.The ultraviolet photochemistry of Thymidylyl-(3'->5')-thymidine.
- [44] L.-S. Kan, L. Voituriez, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, *12*, 339-357.The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidylyl-(3'-5')-thymidine monophosphate: Formation, alkaline lability and conformational properties.
- [45] P. H. Clingen, C. F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, M. H. L. Green, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2245-2248.Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells.
- [46] D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, E. Sage, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26732-26742.Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells - Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis.
- [47] T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11678-11685.Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
- [48] Y. Q. Jing, J. F. L. Kao, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3845-3853.Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing *cis*-*syn*, (6-4) and Dewar photoproducts of TT.
- [49] J. S. Taylor, D. S. Garrett, M. P. Cohrs, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7206-7215.Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidylyl-(3'-5')-thymidine.
- [50] J. E. Donnellan, R. B. Setlow, *Science* **1965**, *149*, 308-310.Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores.
- [51] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 163-169.Effects of binding of α/β -type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and *in vitro*.
- [52] R. A. Mehl, T. P. Begley, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1065-1066.Mechanistic studies on the repair of a novel DNA photolesion: The spore photoproduct.
- [53] Z. E. V. Phillips, M. A. Strauch, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 392-402.*Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression.
- [54] R. Koch, **1876**.Untersuchungen über Bakterien. V. Die Aetiologie der Milzbrand Krankheit, begründet auf der Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*.
- [55] F. Cohn, *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **1876**, *2*, 249-276.Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der *Bacillen*.

- [56] J. Tyndall, *Phil. Trans. R. Soc.* **1877**, 167, 149-206. Further researches on the department and vital persistence of putrefactive and infective organisms from a physical point of view.
- [57] W. M. Michael, *Curr. Biol.* **2001**, 11, 443-445. Cell cycle: connecting DNA replication to sporulation in *Bacillus*.
- [58] K. Stephenson, J. A. Hoch, *Mol. Microbiol.* **2002**, 46, 297. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay.
- [59] A. I. Aronson, P. C. Fitz-James, *Bacteriol. Rev.* **1976**, 40, 360-402. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat.
- [60] D. Kay, S. C. Warren, *J. Biochem.* **1968**, 109, 819-824. Sporulation in *Bacillus subtilis*.
- [61] A. Driks, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 389-391. Overview: Development in bacteria: Spore formation in *Bacillus subtilis*.
- [62] S. Makino, R. Moriyama, *Med. Sci. Monit.* **2002**, 8, 119-127. Hydrolysis of cortex peptidoglycan during bacterial spore germination.
- [63] P. Setlow, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 550-6, 550-556. Spore Germination.
- [64] W. Donovan, L. Zheng, K. Sandman, R. Losick, *J. Mol. Biol.* **1987**, 196, 1-10. Genes encoding spore coat polypeptides from *Bacillus subtilis*.
- [65] E. M. Lai, N. D. Phadke, M. T. Kachman, R. Giorno, S. Vazquez, J. A. Vazquez, J. R. Maddock, A. Driks, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 1443-1454. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*.
- [66] S. J. Todd, A. J. Moir, M. J. Johnson, A. Moir, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 3373-3378. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium.
- [67] A. Driks, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, 63, 1-20. *Bacillus subtilis* spore coat.
- [68] A. Moir, B. M. Corfe, J. Behravan, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 403-409. Spore germination.
- [69] R. H. Vreeland, W. D. Rosenzweig, D. W. Powers, *Nature* **2000**, 407, 897-900. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal.
- [70] P. Gerhardt, R. E. Marquis, *Spore thermoresistance mechanism*, Am. Soc. Microbiol., Washington DC, **1989**.
- [71] A. E. Cowan, D. E. Koppel, B. Setlow, P. Setlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4209-4214. A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy.

- [72] B. Setlow, A. E. Cowan, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 637–648. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine.
- [73] G. R. Germaine, W. G. Murell, *Photochem. Photobiol.* **1973**, *17*, 145-154. Effect of dipicolinic acid on the ultraviolet radiation resistance of *Bacillus cereus* spores.
- [74] B. Setlow, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 640-643. Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation.
- [75] K. Ragkousi, P. Eichenberger, C. van Ooij, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2315-2329. Identification of a new gene essential for germination of *Bacillus subtilis* spores with Ca²⁺-dipicolinate.
- [76] S. Ablett, A. H. Darke, P. J. Lillford, D. R. Martin, *Int. J. Food. Sci. Technol.* **1999**, *34*, 59–69. Glass formation and dormancy in bacterial spores.
- [77] R. G. K. Leuschner, P. J. Lillford, *Int. J. Food. Microbiol.* **2003**, *80*, 131–143. Thermal properties of bacterial spores and biopolymers.
- [78] M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5505-5512. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid.
- [79] P. Setlow, *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, *42*, 319-338. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: Structure, synthesis, genetics, function and degradation.
- [80] W. L. Nicholson, B. Setlow, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6900-6906. Binding of DNA in vitro by small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effect of this binding on DNA topology.
- [81] J.-L. Sanchez-Salas, M. L. Santiago-Lara, B. Setlow, M. D. Sussman, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 807–814. Properties of mutants of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* which lack the protease that degrades small, acid-soluble proteins during spore germination.
- [82] C. S. Hayes, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2662-2666. An α/β-type, small, acid-soluble spore protein which has very high affinity for DNA prevents outgrowth of *Bacillus subtilis* spores.
- [83] B. Setlow, K. A. McGinnis, K. Ragkousi, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6906-6912. Effects of major spore-specific DNA binding proteins on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties.
- [84] R. Tennen, B. Setlow, K. L. Davis, C. A. Loshon, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *89*, 330–338. Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid.
- [85] B. Setlow, C. A. Loshon, P. C. Genest, A. E. Cowan, C. Setlow, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 362-375. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol.

- [86] D. Frenkiel-Krispin, R. Sack, J. Englander, E. Shimon, M. Eisenstein, E. Bullitt, R. Horowitz-Scherer, C. S. Hayes, P. Setlow, A. Minsky, S. G. Wolf, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 3525-3530. Structure of the DNA-SspC complex: Implications for DNA packaging, protection, and repair in bacterial spores.
- [87] J. Kosman, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 6095-6103. Effects of carboxy-terminal modifications and pH on binding of a *Bacillus subtilis* small, acid-soluble spore protein to DNA.
- [88] S. Levin-Zaidman, J. Englander, E. Shimon, A. K. Sharma, K. W. Minton, A. Minsky, *Science* **2003**, *299*, 254-256. Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: A key to radioresistance?
- [89] J. Englander, E. Klein, V. Brumfeld, A. K. Sharma, A. J. Doherty, A. Minsky, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5973-5977. DNA toroids: Framework for DNA repair in *Deinococcus radiodurans* and in germinating bacterial spores.
- [90] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, P. Setlow, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 548-572. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.
- [91] P. Setlow, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *1995*, 29-54. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species.
- [92] N. Munakata, Y. Ikeda, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1968**, *33*, 469-475. A mutant of *Bacillus subtilis* producing ultraviolet-sensitive spores.
- [93] D. L. Popham, S. Sengupta, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3633-3638. Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins.
- [94] T. A. Slieman, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 199-205. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA.
- [95] G. W. Gould, *Mechanisms of resistance and dormancy.*, Vol. 2, Academic Press, London, U.K., **1983**.
- [96] C. Tauscher, A. C. Schuerger, W. L. Nicholson, *Astrobiol.* **2006**, *6*, 592-605. Survival and germinability of *Bacillus subtilis* spores exposed to simulated Mars solar radiation: implications for life detection and planetary protection.
- [97] P. Setlow, *Environ. Mol. Mutagen.* **2001**, *38*, 97-104. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light.
- [98] W. L. Nicholson, A. C. Schuerger, P. Setlow, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 249-264. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight.
- [99] J. M. Mason, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1986**, *167*, 174-178. Essential role of small, acid-soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light.

- [100] B. Setlow, S. Atluri, R. Kitchel, K. Koziol-Dube, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3740–3747. Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins.
- [101] B. Setlow, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *59*, 640-643. DPA Greatly Enhance Production of Spore Photoproduct in Bacterial Spores upon UV Irradiation.
- [102] E. Melly, P. C. Genest, M. E. Gilmore, S. Little, D. L. Popham, A. Driks, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 1105–1115. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures.
- [103] G. R. Bender, R. E. Marquis, *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *50*, 1415–1421. Spore heat resistance and specific mineralization.
- [104] R. G. K. Leuschner, P. J. Lillford, *Microbiol.* **2000**, *146*, 49–55. Effects of hydration on molecular mobility in phase bright *Bacillus subtilis* spores.
- [105] A. D. Warth, *J. Bacteriol.* **1980**, *143*, 27–34. Heat stability of *Bacillus cereus* enzymes within spores and in extracts.
- [106] A. Sohail, C. S. Hayes, P. Divvela, P. Setlow, A. S. Bhagwat, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11325-11330. Protection of DNA by α/β -type small, acid-soluble proteins from *Bacillus subtilis* spores against cytosine deamination.
- [107] G. Alderton, N. Snell, *Appl. Microbiol.* **1969**, *17*, 745–749. Chemical states of bacterial spores: dry-heat resistance.
- [108] L. del Carmen Huesca Espitia, C. Caley, I. Bagyan, P. Setlow, *Mutat. Res. - Fund. Mol. M.* **2002**, *503*, 77-84. Base-change mutations induced by various treatments of *Bacillus subtilis* spores with and without DNA protective small, acid-soluble spore proteins.
- [109] G. R. Weller, B. Kysela, R. Roy, L. M. Tonkin, E. Scanlan, M. Della, S. K. Devine, J. P. Day, A. Wilkinson, F. d'Adda di Fagagna, K. M. Devine, R. P. Bowater, P. A. Jeggo, S. P. Jackson, A. J. Doherty, *Science* **2002**, *297*, 1686-1689. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria.
- [110] P. C. Genest, B. Setlow, E. Melly, P. Setlow, *Microbiol.* **2002**, *148*, 307–314. Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxy nitrite appears to be caused by membrane damage.
- [111] E. Melly, A. E. Cowan, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *93*, 316–325. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide.
- [112] S. B. Young, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 54–67. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide.
- [113] A. O. Henriques, L. R. Melsen, C. P. J. Moran, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2285–2291. Involvement of superoxide dismutase in spore coat assembly in *Bacillus subtilis*.

- [114] C. Redmond, L. W. Baillie, S. Hibbs, A. J. Moir, A. Moir, *Microbiol.* **2004**, *150*, 355–363. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*.
- [115] L. Casillas-Martinez, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 7420–7425. Alkyl hydroperoxide reductase, catalase, MrgA, and superoxide dismutase.
- [116] P. Gerhardt, R. Scherrer, S. H. Black, *Molecular sieving by dormant spore structures.*, American Society for Microbiology, Washington, DC, **1972**.
- [117] D. E. Cortezzo, K. Koziol-Dube, B. Setlow, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 838–852. Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes the spores to subsequent stress.
- [118] D. E. Cortezzo, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *98*, 606–617. Analysis of factors influencing the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals.
- [119] C. A. Loshon, P. C. Genest, B. Setlow, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *87*, 8–14. Formaldehyde kills spores of *Bacillus subtilis* by DNA damage and small, acid-soluble spore proteins of the a/b-type protect against this DNA damage.
- [120] B. Setlow, K. J. Tautvydas, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1958–1962. Small, acid-soluble spore proteins of the α/β type do not protect the DNA in *Bacillus subtilis* spores against base alkylation.
- [121] S. McCready, L. Marcello, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 694–698. Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*.
- [122] K. Malhotra, S. T. Kim, C. Walsh, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15406–15411. Roles of FAD and 8-Hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase.
- [123] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. 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.
- [124] S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1707*, 1–23. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: A review of recent biophysical studies on photolyase.
- [125] L. O. Essen, T. Klar, *Cell Mol. Life. Sci.* **2006**, *63*, 1266–1227. Light-driven DNA repair by photolyases.
- [126] A. Sancar, *Science* **1996**, *272*, 48–49. No "end of history" for photolyases.
- [127] D.-A. Schuster, Bachelor thesis, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2005**.
- [128] S. Gaali, Bachelor thesis, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2005**.
- [129] C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17696–17700. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity.

- [130] Y. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17701–17706. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity.
- [131] N. Munakata, C. S. Rupert, *J. Bacteriol.* **1972**, *111*, 192-198. Genetically controlled removal of "spore photoproduct" from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores.
- [132] N. Munakata, C. S. Rupert, *Mol. Gen. Genet.* **1974**, *130*, 239-250. Dark repair of DNA containing "spore photoproduct" in *Bacillus subtilis*.
- [133] Y. M. Xue, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2221-2227. The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation.
- [134] P. Fajardo-Cavazos, C. Salazar, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 1735-1744. Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase (*spl*) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination.
- [135] M. Pedraza-Reyes, F. Gutierrez-Corona, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 3983-3991. Temporal regulation and forespore-specific expression of the spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA-polymerase during *Bacillus subtilis* sporulation.
- [136] W. L. Nicholson, L. Chooback, P. Fajardo-Cavazos, *Mol. Gen. Genet.* **1997**, *255*, 587-694. Analysis of spore photoproduct lyase operon (*splAB*) function using targeted deletion-insertion mutations spanning the *Bacillus subtilis ptsHI* and *splAB* operons.
- [137] R. Rebeil, W. L. Nicholson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9038-9043. The subunit structure and catalytic mechanism of the *Bacillus subtilis* DNA repair enzyme spore photoproduct lyase.
- [138] P. Babitzke, *Mol. Microbiol.* **1997**, *26*, 1-9. Regulation of tryptophan biosynthesis: trp-ing the TRAP or how *Bacillus subtilis* reinvented the wheel.
- [139] R. Rebeil, Y. B. Sun, L. Chooback, M. Pedraza-Reyes, C. Kinsland, T. P. Begley, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4879-4885. Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases.
- [140] J. Cheek, J. B. Broderick, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 209-226. Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: versatile clusters in a radical new role.
- [141] P. Fajardo-Cavazos, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 331-335. Essential cysteine residues in *bacillus subtilis* spore photoproduct lyase identified by alanine scanning mutagenesis.

- [142] T. A. Slieman, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6412-6417. Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thyminyl-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA.
- [143] Y. Sun, K. Palasingam, W. L. Nicholson, *Anal. Biochem.* **1994**, *221*, 61-65. High-pressure liquid chromatography assay for quantitatively monitoring spore photoproduct repair mediated by spore photoproduct lyase during germination of UV-irradiated *Bacillus subtilis* spores.
- [144] J. Cheek, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2860-2861. Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: Evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate.
- [145] J.-D. Guo, Y. Luo, F. Himo, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11188-11192. DNA repair by spore photoproduct lyase: A density functional theory study.
- [146] O. A. Lukianova, S. S. David, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 145-151. A role for iron-sulfur clusters in DNA repair.
- [147] R. B. Setlow, W. L. Carrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *51*, 226-231. The disappearance of thymine dimers from deoxyribonucleic acid (DNA): an error-correcting mechanism.
- [148] R. P. Boyce, P. Howard-Flanders, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *51*, 293. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA [deoxyribonucleic acid] in *Escherichia coli* K-12.
- [149] P. C. Hanawalt, R. H. Haynes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *19*, 462. Repair replication of DNA in bacteria; irrelevance of chemical nature of base defect .
- [150] P. Howard-Flanders, R. P. Boyce, L. Theriot, *Genetics* **1966**, *53*, 1119. Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA .
- [151] B. van Houten, *Microbiol Rev.* **1990**, *54*, 18-51. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*.
- [152] S. Mazur, L. Grossman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4432-4443. Dimerization of *Escherichia coli* UvrA and its binding to undamaged and ultraviolet light damaged DNA .
- [153] D. K. Orren, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5237-5241. The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex.
- [154] B. Van Houten, A. Snowden, *Bioassays* **1993**, *15*, 51-59. Mechanism of action of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease: clues to the damage recognition problem.

- [155] M. J. DellaVecchia, D. L. Croteau, M. Skorvaga, S. V. Dezhurov, O. I. Lavrik, B. Van Houten, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 45245-45256. Analyzing the Handoff of DNA from UvrA to UvrB Utilizing DNA-Protein Photoaffinity Labeling.
- [156] D. K. Orren, A. J. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15796-15803. Formation and enzymic properties of the UvrB-DNA complex.
- [157] G. F. Moolenaar, M. F. Herron, V. Monaco, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Visse, N. Goosen, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 8044-8050. The role of ATP binding and hydrolysis by UvrB during nucleotide excision repair.
- [158] J. J. Lin, A. M. Phillips, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17693-17700. Active site of (A)BC excinuclease. II. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision.
- [159] J. J. Lin, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17688-17692. Active site of (A)BC excinuclease. II. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision.
- [160] J. J. Truglio, D. L. Croteau, B. Van Houten, C. Kisker, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 233 - 252. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair: The UvrABC System .
- [161] I. G. Minko, Y. Zou, R. S. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 1905-1909. Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair.
- [162] D. Chandrasekhar, B. Van Houten, *Mutat. Res.* **2000**, 450, 19-40. In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in Escherichia coli.
- [163] W. A. Franklin, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 814, 3821-3824. Removal of UV light-induced pyrimidine-pyrimidone(6-4) products from Escherichia coli DNA requires the uvrA, uvrB, and uvrC gene products.
- [164] A. T. Yeung, W. B. Mattes, E. Y. Oh, L. Grossman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 6157-6161. Enzymic properties of purified Escherichia coli uvrABC proteins.
- [165] D. L. Mitchell, C. A. Haipek, J. M. Clarkson, *Mutat. Res.* **1985**, 143, 109.(6-4) Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res.* 1985 Jul;143(3):109-112.
- [166] R. E. Yasbin, D. Cheo, D. Bol, *DNA repair systems*, American Society of Microbiology, Washington, D.C., **1993**.
- [167] B. Setlow, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 3486-3495. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance.
- [168] N. Munakata, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1969**, 104, 258-263. Genetic analysis of a mutant *Bacillus subtilis* producing ultraviolet-sensitiv spores.
- [169] N. Munakata, *Mol. Gen. Genet.* **1977**, 156, 49-54. Mapping of the genes controlling excision repair of pyrimidine photoproducts in *Bacillus subtilis*.

- [170] K. K. Bowman, K. Sidik, C. A. Smith, J.-S. Taylor, P. M. Doetsch, G. A. Freyer, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3026-3032. A new ATP-independent DNA endonuclease from *Schizosaccharomyces pombe* that recognizes cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts.
- [171] H. Yajima, M. Takao, S. Yasuhira, J. H. Zhao, C. Ishii, H. Inoue, A. Yasui, *EMBO J.* **1995**, 14, 2393-2399. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light.
- [172] A. M. Avery, B. Kaur, J. S. Taylor, J. A. Mello, J. M. Essigmann, P. W. Doetsch, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 2256-2264. Substrate specificity of ultraviolet DNA endonuclease (UVDE/Uve1p) from *Schizosaccharomyces pombe*.
- [173] R. Yonemasu, S. J. McCready, J. M. Murray, F. Osman, M. Takao, K. Yamamoto, A. R. Lehman, A. Yasui, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1553-1558. Characterization of the alternative excision repair pathway of UV-damaged DNA in *Schizosaccharomyces pombe*.
- [174] G. A. Freyer, S. Davey, J. V. Ferrer, A. M. Martin, D. Beach, P. W. Doetsch, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 4572-4577. An alternative eukaryotic DNA excision repair pathway.
- [175] M. Takao, R. Yonemasu, K. Yamamoto, A. Yasui, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 1267-1271. Characterization of a UV endonuclease gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and its bacterial homolog.
- [176] C. Kunza, O. Fleck, *J. Mol. Biol.* **2001**, 313, 241-253. Role of the DNA repair nucleases Rad13, Rad2 and Uve1 of *Schizosaccharomyces pombe* in mismatch correction.
- [177] J. L. Alleva, S. Zuo, J. Hurwitz, P. W. Doetsch, *Biochemistry* **2000**, 39, 2659-2666. In Vitro Reconstitution of the *Schizosaccharomyces pombe* Alternative Excision Repair Pathway.
- [178] T. Lindahl, *Nature* **2004**, 427, 598. Ensuring error-free DNA repair.
- [179] S. E. Luria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1947**, 33, 253-264. Reactivation of irradiated bacteriophage by transfer of self-reproducing units.
- [180] W. Harm, *Virology* **1963**, 19, 66-71. Mutants of phage T4 with increased sensitivity to ultraviolet.
- [181] W. Harm, *Mutat. Res.* **1968**, 6, 175-179. Recovery of UV-inactivated *E. coli* cells by the v-gene action of phage T4.
- [182] S. Riazuddin, L. Grossman, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 6280-6628. *Micrococcus luteus* correndonucleases. I. Resolution and purification of two endonucleases specific for DNA containing pyrimidine dimers.

- [183] S. Riazuddin, L. Grossman, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6287–6293. *Micrococcus luteus* correnonucleases. II. Mechanism of action of two endonucleases specific for DNA containing pyrimidine dimers.
- [184] D. A. Vasquez, S. G. Nyaga, R. S. Lloyd, *Mutat. Res.* **2000**, *459*, 307–316. Purification and characterization of a novel UV lesion-specific DNA glycosylase/ AP lyase from *Bacillus sphaericus*.
- [185] S. G. Nyaga, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23569–23576. Two glycosylase/abasic lyases from *Neisseria mucosa* that initiate DNA repair at sites of UVinduced photoproducts.
- [186] M. Furuta, J. O. Schrader, H. S. Schrader, T. A. Kokjohn, S. Nyaga, A. K. McCullough, R. S. Lloyd, D. E. Burbank, D. Landstein, L. Lane, J. L. Van Etten, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 1551–1556. Chlorella virus PBCV-1 encodes a homolog of the bacteriophage T4 UV damage repair gene dnV.
- [187] A. K. McCullough, M. T. Romberg, S. Nyaga, Y. Wei, T. G. Wood, J. S. Taylor, J. L. Van Etten, M. L. Dodson, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13136–13142. Characterization of a novel cis-syn and trans-syn-II pyrimidine dimer glycosylase/AP lyase from a eukaryotic algal virus, *Paramecium bursaria chlorella virus-1*.
- [188] R. D. Schrock III, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17631–17639. Reductive methylation of the amino terminus of endonuclease V eradicates catalytic activities. Evidence for an essential role of the amino terminus in the chemical mechanisms of catalysis.
- [189] R. D. Schrock III, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 880–886. Site-directed mutagenesis of the NH₂ terminus of T4 endonuclease V. The position of the aNH₂ moiety affects catalytic activity.
- [190] J. Kim, S. Linn, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 1135-1141. The mechanisms of action of *E. coli* endonuclease III and T4 UV endonuclease (endonuclease V) at AP sites.
- [191] K. McCullough, A. Sanchez, M. L. Dodson, P. Marapaka, J.-S. Taylor, R. S. Lloyd, *Biochemistry* **2001**, *40*, 561–568. The reaction mechanism of DNA glycosylase/AP lyases at abasic sites.
- [192] K. Morikawa, O. Matsumoto, M. Tsujimoto, K. Katayanagi, M. Ariyoshi, T. Doi, M. Ikehara, T. Inaoka, E. Ohtsuka, *Science* **1992**, 523– 526. Xray structure of T4 endonuclease V: an excision repair enzyme specific for a pyrimidine dimer.
- [193] D. G. Vassylyev, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka, K. Morikawa, *Cell* **1995**, *83*, 773–782. Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with aDNAsubstrate: structural basis for damaged DNA recognition.
- [194] G. Golan, D. O. Zharkov, A. P. Grollman, M. L. Dodson, A. K. McCullough, R. S. Lloyd, G. Shoham, *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 241-258. Structure of T4 Pyrimidine Dimer Glycosylase in a Reduced Imine Covalent Complex with Abasic Site-containing DNA.

- [195] I. G. Minko, Y. Zou, R. S. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1905–1909. Incision of DNA–protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair.
- [196] I. G. Minko, A. J. Kurtz, D. L. Croteau, B. Van Houten, T. M. Harris, R. S. Lloyd, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3000–3009. Initiation of repair of DNA polypeptide crosslinks by the UvrABC nuclease.
- [197] P. Modrich, R. Lahue, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *1996*, 101–133. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology.
- [198] O. D. Schärer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3052–3082. Chemie und Biologie der DNA-Reparatur.
- [199] K. G. Au, K. Welsh, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12142–12148. Initiation of methyl-directed mismatch repair.
- [200] J. Lederberg, *Genetics* **1947**, *32*, 505–525. Gene recombination and linked segregations in *Escherichia coli*.
- [201] A. J. Clark, M. Chamberlin, R. P. Boyce, Howard-Flanders. P., *J. Mol. Biol.* **1966**, *19*, 442–454. Abnormal metabolic response to ultraviolet light of a recombination deficient mutant of *Escherichia coli* K12.
- [202] A. Kuzminov, *Microbiol Rev.* **1999**, *63*, 751–813. Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage I.
- [203] C. A. Bonner, P. T. Stukenberg, M. Rajagopalan, R. Eritja, M. O'Donnell, K. McEntee, H. Echols, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11431–11438. Processive DNA synthesis by DNA polymerase II mediated by DNA polymerase III accessory proteins.
- [204] T. Horii, T. Ogawa, Ogawa. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 313–317. Organization of the recA gene of *Escherichia coli*.
- [205] A. K. Ganesan, P. C. Seawell, *Mol. Gen. Genet.* **1975**, *141*, 189–205. The effect of *lexA* and *recF* mutations on post replication repair and DNA synthesis in *Escherichia coli* K12.
- [206] K. Zahradka, S. Simic, M. Buljubasic, M. Petranovic, D. Dermic, D. Zahradka, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 7562–7571. *sbcB15* And *DeltasbcB* mutations activate two types of *recF* recombination pathways in *Escherichia coli*.
- [207] Z. Livneh, O. Cohen-Fix, R. Skaliter, T. Elizur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 465–513. Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis.
- [208] W. D. Rupp, P. Howard-Flanders, *J. Mol. Biol.* **1968**, *31*, 291–304. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation.

- [209] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, Buchardt O., *Science* **1991**, *254*, 1497-1500. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide.
- [210] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules.
- [211] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone.
- [212] S. Sforza, R. Corradini, S. Ghirardi, A. Dossena, R. Marchelli, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2905-2913. DNA Binding of A D-Lysine-Based Chiral PNA: Direction Control and Mismatch Recognition.
- [213] B. Norden, M. Ardhämmer, P. E. Nielsen, B. G. Malmstrom, P. Wittung-Stafshede, *J. Biomol. Struc. Dyn.* **1999**, *17*, 33-40. In vitro membran penetration of modified peptide nucleic acid (PNA).
- [214] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954-2983. PNAs: synthetische Polyamidnucleinsäuren mit außergewöhnlichen Bindungseigenschaften.
- [215] B. M. Tyler, D. J. McCormick, C. V. Hoshall, C. L. Douglas, K. Jansen, B. W. Lacy, B. Cusack, E. Richelson, *FEBS Lett.* **1998**, *421*, 280-284. Specific Gene Blockade shows that Peptide Nucleic Acids readily enter Neuronal Cells in vivo.
- [216] B. M. Tyler, K. Jansen, D. J. McCormick, C. L. Douglas, M. Boules, J. A. Stewart, L. Zhao, B. Lacy, B. Cusack, A. Fauq, E. Richelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7053-7058. Peptide Nucleic Acids targeted to the Neurotensin Receptor and administered i.p. cross the Blood-Brain Barrier and specifically reduce Gene Expression.
- [217] N. E. Møllegaard, O. Buchardt, M. Egholm, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3892-3895. Peptide Nucleic Acid-DNA Strand Displacement Loops as Artificial Transcription Promoters.
- [218] W. Mier, R. Eritja, A. Mohammed, U. Haberkorn, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2012-2015. Peptid-PNA-Konjugate: Gezielter Transport von Antisense-Therapeutika in Tumoren.
- [219] U. Soomets, M. Hälbrik, Ü. Langel, *Front. Biosci.* **1999**, *4*, 782-786. Antisense Properties of Peptide Nucleic Acids. *Frontiers in Bioscience*.
- [220] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 197-200. Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA.

- [221] C. Carlsson, M. Jonsson, B. Nordén, M. T. Dulay, R. N. Zare, J. Noolandi, P. E. Nielsen, L.-Z. Tsui, J. Zielinski, *Nature* **1996**, *380*, 207. Screening for Genetic Mutations.
- [222] R. F. Borkman, D. R. Kearns, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3467-3475. Triplet-State Energy Transfer in Liquid Solutions. Acetone-Photosensitized cis-trans Isomerization of Pentene-2.
- [223] T. Atlung, A. Nielsen, L. J. Rasmussen, L. J. Nelleman, F. Holm, *Gene* **1991**, *107*, 11-17. A versatile method for integration of genes and gene fusions into the lambda attachment site of *Escherichia coli*.
- [224] R. F. W. Jackson, J. L. Fraser, N. Wishart, B. Porter, M. J. Wythes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1998**, 1903-1912. Synthesis of alpha-amino acids using amino acid gamma-anion equivalents: synthesis of 5-oxo -amino acids, homophenylalanine derivatives and pentenylglycines.
- [225] M. Yang, W. Ye, S. W. Schneller, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3993-3996. Preparation of Carbocyclic S-Adenosylazamethionine by a Practical Synthesis of (-)-Aristeromycin.
- [226] M. J. Thompson, A. Mekhalfia, D. P. Hornby, G. M. Blackburn, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7467-7473. Synthesis of Two Stable Nitrogen Analogues of S-Adenosyl-L-methionine.
- [227] M. T. Washington, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36835-36838. Fidelity and processivity of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta.
- [228] R. A. Perlow-Poehnelt, I. Likhterov, D. A. Scicchitano, N. E. Geacintov, S. Broyde, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36951-36961. The spacious active site of a Y-family DNA polymerase facilitates promiscuous nucleotide incorporation opposite a bulky carcinogen-DNA adduct: elucidating the structure-function relationship through experimental and computational approaches.
- [229] P. Zhuang, A. Kolbanovskiy, S. Amin, N. E. Geacintov, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6660-6669. Base sequence dependence of in vitro translesional DNA replication past a bulky lesion catalyzed by the exo- Klenow fragment of Pol I.
- [230] C. Haas, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2004**.
- [231] F. Grolle, LMU München (München), **2005**.
- [232] J. C. Pieck, D. Kuch, F. Grolle, U. Linne, C. Haas, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1404 -1405. PNA-Based Reagents for the Direct and Site-Specific Synthesis of Thymine Dimer Lesions in Genomic DNA.
- [233] J. Hein, 6.1 ed., DNAsstar, Madison, **1993-2005**.
- [234] R. W. Phillips, J. Wiegel, C. J. Berry, C. Fliermans, A. D. Peacock, D. C. White, Shimkets L. J., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52*, 933-938. *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, gram-positive bacterium.

- [235] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1097 -1106. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods.
- [236] P. Fajardo-Cavazos, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 555-560. The TRAP-like SplA protein is a *trans*-acting negative regulator of spore photoproduct lyase synthesis during *Bacillus subtilis* sporulation.
- [237] H. Beinert, R. H. Holm, E. Münck, *Science* **1997**, 277, 653-659. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures.
- [238] S. Ollagnier, C. Meier, E. Mulliez, J. Gaillard, V. Schuenemann, A. Trautwein, T. Mattioli, M. Lutz, M. Fontecave, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6344-6350. Assembly of 2Fe-2S and 4Fe-4S Clusters in the Anaerobic Ribonucleotide Reductase from *Escherichia coli*.
- [239] S. Ollagnier-de Choudens, Y. Sanakis, K. S. Hewitson, P. Roach, J. E. Baldwin, Münck E., M. Fontecave, *Biochemistry* **2000**, 39, 4165-4173. Iron-Sulfur Center of Biotin Synthase and Lipoate Synthase.
- [240] N. B. Ugulava, B. R. Gibney, J. T. Jarrett, *Biochemistry* **2000**, 39, 5206-5214. Iron-Sulfur Cluster Interconversions in Biotin Synthase: Dissociation and Reassociation of Iron during Conversion of [2Fe-2S] to [4Fe-4S] Clusters.
- [241] W. H. Orme-Johnson, N. R. Orme-Johnson, *Iron Sulfur Proteins*, Wiley-Interscience, New York, **1982**.
- [242] T. Imai, K. Taguchi, Y. Ogawara, D. Ohmori, F. Yamakura, H. Ikezawa, A. Urushiyama, *J. Biochem.* **2001**, 130, 649-655. Characterization and Cloning of an Extremely Thermostable, Pyrococcus furiosus-Type 4Fe Ferredoxin from *Thermococcus profundus*.
- [243] J. P. Gayda, J. F. Gibson, R. Cammack, D. O. Hall, R. Mullinger, *Biochim. Biophys.* **1976**, 434, 154-163. Spin lattice relaxation and exchange interaction in a 2-iron, 2-sulphur protein.
- [244] T. Douki, J. Cadet, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 433-436. Formation of the spore photoproduct and other dimeric lesions between adjacent pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA.
- [245] M. G. Friedel, O. Berteau, J. C. Pieck, M. Atta, S. Olliagnier-de-Choudens, M. Fontecave, T. Carell, *Chem. Commun.* **2006**, 4, 445-447. The spore photoproduct lyase repairs the 5S- and not the 5R- configured spore photoproduct DNA lesion.
- [246] J. C. Pieck, U. Hennecke, A. J. Pierik, M. G. Friedel, T. Carell, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 36317-36326. Characterization of a New Thermophilic Spore Photoproduct Lyase from *Geobacillus stearothermophilus* (SplG) with Defined Lesion Containing DNA Substrates.

- [247] V. L. Gerlach, W. J. Feaver, P. L. Fischhaber, E. C. Friedberg, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 92-98. Purification and characterization of pol kappa, a DNA polymerase encoded by the human DINB1 gene.
- [248] V. L. Gerlach, W. J. Feaver, P. L. Fischhaber, E. C. Friedberg, *J. Biol. Chem.* **2007**, *Manuscript M004413200*. Purification and Characterization of pol k, a DNA Polymerase Encoded by the Human DINB1 Gene.
- [249] R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, *Science* **1999**, 283, 1001-1004. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by Yeast DNA polymerase, Pol η .

7. Anhang

Tabelle 7-1: Bestimmung der PCR Primer-Annealingtemperatur anhand der empirisch ermittelten Schmelzpunkte in °C.

GC	bp																	
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	28.7	31.2	33.5	35.5	37.2	38.9	40.3	41.6	42.8	43.9	44.9	45.9	46.7	47.6	48.3	49.0	49.7	50.3
2	31.4	33.8	35.9	37.7	39.4	40.9	42.3	43.5	44.6	45.6	46.6	47.5	48.3	49.0	49.7	50.4	51.0	51.6
3	34.2	36.4	38.3	40.0	41.6	43.0	44.2	45.3	46.4	47.3	48.2	49.0	49.8	50.5	51.1	51.7	52.3	52.8
4	36.9	38.9	40.7	42.3	43.7	45.0	46.2	47.2	48.2	49.1	49.9	50.6	51.3	51.9	52.5	53.1	53.6	54.1
5	39.6	41.5	43.1	44.6	45.9	47.1	48.1	49.1	50.0	50.8	51.5	52.2	52.8	53.4	54.0	54.5	54.9	55.4
6	42.4	44.1	45.5	46.9	48.0	49.1	50.1	50.9	51.7	52.5	53.1	53.8	54.3	54.9	55.4	55.8	56.3	56.7
7	45.1	46.6	47.9	49.1	50.2	51.2	52.0	52.8	53.5	54.2	54.8	55.3	55.9	56.3	56.8	57.2	57.6	58.0
8	47.8	49.2	50.4	51.4	52.4	53.2	54.0	54.7	55.3	55.9	56.4	56.9	57.4	57.8	58.2	58.6	58.9	59.2
9	50.6	51.7	52.8	53.7	54.5	55.3	55.9	56.5	57.1	57.6	58.1	58.5	58.9	59.3	59.6	59.9	60.2	60.5
10	53.3	54.3	55.2	56.0	56.7	57.3	57.9	58.4	58.9	59.3	59.7	60.1	60.4	60.7	61.0	61.3	61.6	61.8
11	56.0	56.9	57.6	58.2	58.8	59.4	59.8	60.3	60.6	61.0	61.3	61.6	61.9	62.2	62.4	62.7	62.9	63.1
12	58.8	59.4	60.0	60.5	61.0	61.4	61.8	62.1	62.4	62.7	63.0	63.2	63.4	63.7	63.9	64.0	64.2	64.4
13	61.5	62.0	62.4	62.8	63.1	63.5	63.7	64.0	64.2	64.4	64.6	64.8	65.0	65.1	65.3	65.4	65.5	65.6
14	64.2	64.6	64.8	65.1	65.3	65.5	65.7	65.8	66.0	66.1	66.3	66.4	66.5	66.6	66.7	66.8	66.8	66.9
15	67.0	67.1	67.2	67.4	67.5	67.6	67.6	67.7	67.8	67.8	67.9	68.0	68.0	68.1	68.1	68.2	68.2	68.2
16	69.7	69.7	69.7	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5
17	72.4	72.2	72.1	71.9	71.8	71.7	71.5	71.4	71.3	71.3	71.2	71.1	71.0	71.0	70.9	70.9	70.8	70.8
18	75.2	74.8	74.5	74.2	73.9	73.7	73.5	73.3	73.1	73.0	72.8	72.7	72.6	74.4	72.3	72.2	72.1	72.1

ATGAAACCGTTGTGCCAAAACCTGTGTATTCGAACCGGAGGCCTGTCGTACC
CGCTCGGGCAGGAACGTATGAGAAATTACGCAAATGGGAATTGAGATTCGCG
AGACGACATCGCACAAACCAAGTGCAGCGGCATTCCGGGAGAGACGGAGCTGGCCC
GGTATCGAAATGCGAAATCGACGCTCGTTGGCGTGCAGCGGACGCTGAAATT
TGATTATCGAAGCCGTCAAGCCATTGCCATTCCGTGGCAACCGGATGCATG
GGCCATTGCCATTATTGCTATTGCAAACGACATTAGGAAGCAAGCCATATATCC
GCGTGTATGTCAACTTGGACGACATTTCGCTCAAGCGAAAAGTATATTGACGA
GCGCGCACCCGAGATCACTCGCTTCGAGGCAGCATGCACGTCCGACATTGTCGGG
ATCGATCATTTGACCCATTGCGTGAACCGGTTTCGCTTCAGCGTCAACTCCGCTATGTG
ATCAACCATTGAGCCGGAAACGCTCCCTTGACGCGCGCTCAAGCAGCGC
GCAAAGTGGCCGGTGCCTGGCTATAAGCTGGCTTGTGTCGCGGCCGATTACCG
GCATGACGGCTGGGAACAAGGGTATTGAAATTGTTGAGCTCAGGAGCTGCCGGCAA
TTGGAAGGGGTGGACTTATCTGATTGACGTTGAGCTCATCCAGCATCGGTTAC
CAAGCCGGCCAAGCGGGTCATCGAGCAGCGTTACCGAAAAGCTCGATT
GGACGAATCGAAGCGAAATATAAGTGGGGCGGTACGGCATCGGCAAATATGT
GTACCGTGACAAGGAAGCGCGGGAGCTGGAGGAAACCATGTGCTCGTATATTGC
TCGCTTTTCCATCGGCCAAGTGCAGTATTACGTAA

Abbildung 7-1: DNA Sequenz des *splG* Gens (Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilus*).

ATGTCAACAGAGCGTGAATCCCGTGGACGGATCATTTCACGTCGACTGCAATT
CGTTTTGCCAGCTGCGAGATCGCCGCCATCCGACGCTCAGGGAAAAGCCGGT
GGTCGTAGCAGGGGACCCGAAAGAGCGGAGGGGGATCGTGCCTGGCGCGAAGTA
TGTGGCAAAGCAACAGTTGGCATTATACGACGATGCCGCTCTGGGAAGCGAAA
AAACGCTGCTTGGACCTTGTGCGGCCGCCGGATTCGCCTTTACCGCGAGA
TGAGCCGCCGATGTTCCAATGGCTCGAGCGTTCTGCCTGTTGGAGCGCGCC
TCGATCGATGAAGGCTATTGGACATGACGGGCCGACGCCAACCGTCCCCCGC
TGGCTGTGGCCCATTAGATCCAGCGCGGGCTGTTGGAGCAGCTGTCCATTCCAGT
GAGCATCGGCATGCCCGAATAAGTTTGGCGAAAATGGCAAGTGAGATGAA
AAAGCCGCTCGGCATCACCCTGCTGCGTAAACGTGACGTGCCGCCGTGCTATGG
CCGCTTCCGGTCAACAGATGCATGGCGTCGGTACAAAACCGCAAAGAAGTTG
CATGCGTTGGGCCTGCGCATGATCGCGATATCGCAACGCCGACCGGCGCTTC
TTGAGAAGACGTTGGCGTCTATGGCCTGCGCCTGCAGGAGCGGGCGAACGGCAT
CGACCCCGTCCGGTTGACCCGGAAGCAACGGAGAAATGGAAATCGGTGGGAA
CTCAACGACGCTGCCCGCGATACAGACGAAACAAGAACTGCGGGCGTTT
GCGCAAGCTGGCCGAATCTGTCAGCGTACGGATGAAACAAAAGCGTGTGTC
GCGGACTGTCCAGTTGACGATCCGCTACCGCGATTTCGCACGATCACTCGCAGC
CAAACCGAGGCGGCCGCGTTGCAAACGGCGACGACCTCTTTGACGGCAGCG
CGGCTGTTGAAAAAGCATTGGGACGGCCGCCGGTGCCTCTGGCGTCGCCG
CGCTCCATGTGTTGACGAACGGGAAGAAGGAAAACAGCTCGATTGTTGTTGTTA
TGAAGAAGAAGCGAAAGTGGAAAGAACTTTGAAGACGATCGAACAGCTGCGGGC
CAAATTGGCGATCGGCCCTCGAACAGCGCTGAGCTGTTGCGTGGCGTCCGT
TCGGTGCCAGAAAAAAAGGGTATGTTCTGAATCCAAAGTAG

Abbildung 7-2: DNA Sequenz des *dinB* Gens (Polymerase DinB aus *G. stearothermophilus*).

ATGTCAAAATTACTTGGAAAGGAGTTGATTCAAGCTTGGTCCCCAGTAAAGCATA
CGAGTCCTCCTAGCATGTATGCCACATAGATATGAATGCCTTTTGACAGGGT
GAGCAGATGCGATGTGGCTT
AAGCAAAGAAGATCCGGTAGTCTGCCTCAGTGGATTCCATTATTGCA
GAGTCTCTTATGCAGCAAG
AAAGTATGGTATATCAAGGATGGATACGATTCAAGGAAAGCA
TTTTAAAGGGAGAAGATTTGGCAATATCATGATGGATGTGGATCTT
GGGTGCAGGATCCTGCAAAGCAGATAAGTGTGGAAGATCATA
AAAGTATCAGGGTACTGGAAAC
TATGATATAATTCCCATCTACCTCTTACCCAAAAGATA
AAAGTCTCTGAAGTTGAAGGGCGAGTAT
TGATGAAGTATTCTGATTGGCCGGATTGTTCAATATGCTA
ATGTTGATAATGAGTACGAG
CTTACAGGCGACTTGAAACTGAAAGATGCATTAAAGCA
ATATTCTGAGGCTTTATAGGGGGCAAC
TATGATATAATTCCCATCTACCTCTTACCCAAAAGATA
AAAGTCTCTGAAGTTGAAGGGCGAGTAT
GTTTCAATCCAGAGGGCAGAGATCTGATCACAGATTGGAC
GATGTAATACTGCACTAGGATCT
CAGGTATGCAAGGGTATCAGAGATAGCATA
AAAGATAATTCTCGTTACTACTTCG
TCTAGCACCAAAATGTTGCAAGTTGGCTCTAATT
ACAAAAACCTGATGCCAAACAATTGTG
AAAAATGATTGTTATTAGATTGCGGAAAGTTGAAATT
ACATCATTCTGGACCTTAG
GCGCGTTCTGGCAAAGAACTAATTGACGTATTGG
ATCTCCACGAAAACAGTATTAAACACA
TCAGAGAGACGTGGCCTGATAATGCTGGCCAGCT
TAAGGAATTAGATGCTAAAGTTAAG
CTGATTATGATCGCTCAACCAGCA
ATATCGACCC
TTGAAAACAGCAGATTAGCAGAAAAGTTG
TTAAATTAAAGTAGAGGCCGGTACGGTCTGCC
CTTAAGTTCTGCC
CTGTGAAAAAGTATGATGTC

AAACAAAAATCTTAGAGGAAAATCGTCAATTCCATCGTGGACTGTATTCTTGGCTTGAGGTCTT
CTGCGCTGAGCTTACGTCCAGGATTCAAGGATCTGGAACAGGAGTATAACAAGATCGTAATACCAAG
AACAGTATCTATCTTAAAAACAAAATCCTACGAAGTATATCGAAAATCAGGTCCAGTTGCGTA
CAAGGGCATCAATTCCAGAGTCACGAACCTCCTAAAGTAGGCATAAAATTGTCACGGACCTGA
TATTAAAGGAAAGAACAAAAGTTATTACCCTTAACAAAACTAAGTATGACAATTACTAATTGCA
TATTATAGATTACAAAAACTGTTAGATATGTTGGCAATCAGGTCCATACTTCAAAAGCTCA
GCAGGCTGA

Abbildung 7-3: DNA Sequenz des *Rad30* Gens (Polymerase η aus *S. cerevisiae*).

Curriculum vitae

Geburtsdatum/-ort: 25 September 1978 in Siegen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG/ ZIVILDIENST

08/85- 06/89	Grundschule, Wilnsdorf
08/89- 06/95	Realschule, Wilnsdorf
08/95- 05/98	Peter-Paul-Rubens Gymnasium, Siegen
27.05.98	Abitur
07/98-08/99	Zivildienst im Altenheim „Sophienheim“

HOCHSCHULSTUDIUM

09/99- 06/03	Studium Biotechnologie an der Fachhochschule Gießen-Friedberg
07/02- 12/02	Praxissemester bei Prof. Dr. Gassen an der TU-Darmstadt
01/03- 06/03	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Gassen an der TU-Darmstadt (Thema: Identifizierung und Charakterisierung eines Transportmechanismus im Blut-Hirn-Schranke Zellkulturmodell)
23.06.03	Hochschulabschluss: Dipl.- Ing. für Biotechnologie

PROMOTION

08/03- 11/03	Promotionsstudium an der Philipps-Universität Marburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Carell, Fachbereich Chemie und Biochemie
12/03- 02/07	Fortsetzung des Promotionsstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Carell Promotion am Department für Chemie und Biochemie