

# *Engineering* der LAGLIDADG Homingendonukleasen

## **Inauguraldissertation**

Zur Erlangung des Grades  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
-Dr. rer. nat.-

Des Fachbereichs Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

**Dipl. Biol. Eva Günther**

Giessen, 2014

*„Der Horizont der meisten Menschen ist ein Kreis mit dem Radius 0  
und das nennen sie ihren Standpunkt.“*

(Albert Einstein)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie des Fachbereiches 08 (Biologie und Chemie) der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred Pingoud durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Alfred Pingoud  
Institut für Biochemie, FBo8  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Koreferent: PD. Dr. Gregor Meiss  
Institut für Biochemie, FBo8  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die in der Dissertation angegeben sind. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Eva Günther

Gießen, den 24. 06. 2014

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alfred Pingoud für die Betreuung und die Bereitstellung eines Laborplatzes bedanken.

Bei meinen Koreferent Dr. Gregor Meiss für das Erstellen des Zweitgutachtens, für die gelegentliche Unterstützung und den vielen Anregungen.

Dr. George Silva für die Einstellung als wiss. Hilfskraft und die Betreuung im ersten Jahr meiner Dissertation.

Dr. Wolfgang Wende danke ich für die weitere Betreuung, die stetige Hilfe und wissenschaftliche Unterstützung und Anregungen für meine Doktorarbeit.

Ich danke Dr. Anja Drescher, Karina Urbach und Ina Stingel für die tatkräftige Hilfe bei jeglichen organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten.

Bei Katja und Birgit für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung und den Spaß den wir zusammen hatten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, dass sie immer hinter mir standen und mich unterstützt haben wo sie nur konnten. Danke für euer Vertrauen und Verständnis.

Vielen Dank an die restlichen lieben Menschen die mir entweder direkt oder auch indirekt an der Fertigstellung meiner Doktorarbeit geholfen haben.

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
%(v/v)	Volumenprozent pro Volumen
%(w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Ampère
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
bzw.	Beziehungsweise
d	Tag
Da	Dalton
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	Und Andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
ggf.	Gegebenenfalls
h	Stunde
HE	Homingendonuklease
HGP	Humangenomprojekt
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HR	Homologe Rekombination
I-Cre*	I-CreI Variante durch Aminosäuresubstitution G19S
I-Cre <sup>t</sup>	Inaktive I-CreI Variante durch Aminosäuresubstitution D20N
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
I-Sce*	Inaktive I-SceI-Variante durch Aminosäuresubstitution D44N/D145A
k	Kilo
KGB-Puffer	Physiologisch naher Puffer für Aktivitätstests, siehe Verwendete Puffer und Lösungen (Tab. 2.11)
KGBB-Puffer	Physiologisch naher Puffer für EMSA, siehe Verwendete Puffer und Lösungen (Tab. 2.11)

LB	Luria-Bertani
m	Milli
M	Molar
min	Minute
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
<i>ori</i>	Replikationsursprungsort
ORF	<i>Open reading frames</i>
PNK	Polynukleotidkinase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>Pfu</i>	Thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
Sc <sup>e</sup> * <sub>2</sub> Cre*	Fusionsprotein in dimerisierter Form (von Dr. Silva entwickelt)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SOC	<i>Super-optimal broth with catabolite repression</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALE	<i>Transcription activator-like effector</i>
<i>Taq</i>	Thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TB( <i>low</i> )E	Tris-Borsäure(niedrig)-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Teramethylethylendiamin
TFO	<i>Triple-helix-forming-oligo</i>
T-Puffer	Tris-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
Ü.N.	Über Nacht
V	Volt
W	Watt
Wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZFN	Zinkfingernukleasen

Als Dezimaltrennzeichen wurde in dieser Arbeit ein Komma verwendet. Aminosäuren werden mit den international üblichen Drei-Buchstaben- bzw. Ein-Buchstaben-Codes abgekürzt. Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind alle Oligodesoxynukleotide. Abkürzungen von SI-Einheiten werden nicht näher erläutert.

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung Seite 1 - 21

---

1.1 Gentherapie	1
1.2 Hochspezifische Designernukleasen	3
1.2.1 Zinkfingernukleasen	4
1.2.2 Homingendonukleasen	6
1.2.3 TALE-Nukleasen	8
1.2.4 TFO-Nukleasen	9
1.2.5 CRISPR/Cas-System	10
1.3 Protein <i>engineering</i> von LAGLIDADG-HE	11
1.3.1 Protein <i>engineering</i> an Fusionsproteinen	14
1.3.2 Sce* <sub>2</sub> Cre*	15
1.3.2.1 I-SceI	17
1.3.2.2 I-CreI	17
1.3.3 <i>Directed evolution</i> von Meganukleasen	18
1.3.3.1 Selektions/ <i>Screening</i> -Assay	18
1.4 Zielsetzung	21

## 2. Material & Methoden Seite 22 - 57

---

2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Kits	23
2.1.3 Säulen	24
2.1.4 Enzyme	24
2.1.5 Primer/Oligonukleotide	25
2.1.6 Plasmide	31
2.1.7 Marker	33
2.1.8 <i>E. coli</i> -Stämme	33
2.1.9 Puffer und Medien	34



2.2 Methoden	36
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.2.1.3 Plasmid/DNA-Reinigung	37
2.2.1.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
2.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration	37
2.2.1.6 DNA-Restriktionsspaltung	38
2.2.1.7 Annealing von Oligonukleotiden	38
2.2.1.8 PCR	38
2.2.1.8.1 <i>Screening</i> -PCR	40
2.2.1.8.2 <i>Rolling cycle</i> -PCR	40
2.2.1.8.3 <i>SOEing</i> -PCR	41
2.2.1.8.4 [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP <i>labeling</i> -PCR	43
2.2.1.9 Protein <i>engineering</i> von $\text{Sc}e^*_2\text{Cre}^*$ -Varianten	44
2.2.1.10 Protein <i>engineering</i> von I-CreI-Varianten	45
2.2.1.11 Klonieren der Target-Plasmide	45
2.2.1.12 Klonieren der Endo-Plasmide	48
2.2.1.13 Selektion von Klonen mit richtiger DNA	49
2.2.1.14 <i>Directed evolution</i>	49
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	49
2.2.2.1 Nährmedien zum kultivieren von <i>E. coli</i>	49
2.2.2.2 Selektionsagarplatten	50
2.2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	50
2.2.2.4 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	51
2.2.2.5 Elektrotransformation	51
2.2.2.6 Kotransformation	51
2.2.3 Biochemische Methoden	52
2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.2.3.2 Coomassie-Färbung	52
2.2.3.3 Expression und Reinigung von Proteinen	52
2.2.3.3.1 I-CreI & $\text{Sc}e^*_2\text{Cre}^*$ -Proteinaufreinigung	53
2.2.3.3.2 $\text{Sc}e^*_2\text{Cre}^*$ -Varianten Proteinaufreinigung	53
2.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	54

2.2.3.4.1 Bradford Assay	54
2.2.3.5 Aktivitätstest	55
2.2.3.5.1 Aktivität mit linearisierten Plasmiden	55
2.2.3.5.2 Aktivität mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten	55
2.2.3.6 Bindungstest EMSA	57

**3. Ergebnis** **Seite 58 - 84**

---

3.1 Protein <i>engineering</i> am Fusionsprotein Sce* <sub>2</sub> Cre*	58
3.1.1 Varianten von Sce* <sub>2</sub> Cre*	59
3.1.2 Aktivität unter verschiedenen Salzkonzentrationen	63
3.1.3 Aktivität unter physiologischen Bedingungen	65
3.1.4 Optimierung der Bedingungen für quantitative Analysen von Sce* <sub>2</sub> Cre*K139M;Y33C	66
3.1.5 Vergleich der enzymatischen Aktivität von Sce* <sub>2</sub> Cre* und Sce* <sub>2</sub> Cre*K139M;Y33C	69
3.1.6 Bindung der Zielsequenzen	72
3.2 <i>Directed Evolution</i> von I-CreI	76
3.2.1 Prinzip des Bindungs-Assays	76
3.2.2 Validierung der alpha-Komplementation <i>in vivo</i>	79
3.2.3 Zwei-Plasmidsystem	80
3.2.4 Bindungs-Assay mit I-Cre <sup>t</sup> -Varianten	84

**4. Diskussion** **Seite 85 - 95**

---

4.1 Fusionsprotein Sce* <sub>2</sub> Cre*	85
4.2 Bindungs-Assay	90
4.3 Schlussfolgerung	93

**5. Zusammenfassung**

**Seite 96 - 97**

---

**6. Literaturverzeichnis**

**Seite 98 - 104**

---

**7. Anhang**

**Seite 105**

---

**7.1 EMSA mit I-Cret<sup>t</sup>**

**105**

# 1. Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1 Gentherapie

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms war ein Meilenstein der modernen Biowissenschaften. Als Höhepunkte zur Entschlüsselung des humanen Genoms können die Publikationen des Humanengenomprojektes (HGP) [1] sowie der Venter-Gruppe [2] angesehen werden. Ausgehend von den heute bekannten Genomsequenzen kann nun die Funktion der Gene besser untersucht werden. Dadurch erhält man auch Informationen darüber, welches Krankheitsbild von welchen Mutationen verursacht wird. Voraussetzung für das Verändern dieser genetischen „Fehlinformation“, sind genaue Kenntnisse über Sequenz, Struktur und Funktion der Gene.

Die Gentherapie ist eine vielversprechende Möglichkeit, vererbte oder erworbene Krankheiten, die durch ein defektes Gen ausgelöst werden, zu behandeln. Dabei kann die genetische Information mit Hilfe eines „therapeutischen Gens“ in die Erbsubstanz einer Zelle integriert werden, um einen defekten Genabschnitt zu supplementieren oder auch vollständig zu ersetzen.

Mit Hilfe der somatischen Gentherapie soll bei einer Krankheit die durch einen monogenetischen Gendefekt ausgelöst wird (z.B. siehe Abbildung 1.1) das mutierte Gen so verändert werden, dass der krankhafte Phänotyp aufgehoben wird. Hierzu wird das „therapeutische Gen“ unter Zuhilfenahme verschiedener Vektoren in die entsprechenden Zellen eingeschleust und mittels verschiedener Strategien ins Genom integriert. Problematisch ist jedoch eine mögliche unkontrollierte Insertion dieses Gens ins Genom, da dies einen Defekt, Hyperaktivierung oder Inaktivierung eines anderen Gens (mutagene Folgen) verursachen kann.

Eine der vielversprechendsten Strategien der Gentherapie ist die homologe Rekombination (HR). In ihrem natürlichen Kontext bewirkt HR gewöhnlich einen Austausch an genetischer Information zwischen endogenen Sequenzen in der Meiose [3], die Umwandlung des *mating type* bei Hefe [4] und das „*homing*“ der Klasse-I-Introns und Inteine in dem Allel, welches die jeweilige Sequenz nicht enthält [5, 6]. Für gentherapeutische Zwecke kann die HR genutzt werden, um einen Austausch zwischen einer endogenen chromosomalen Sequenz und einem exogenen DNA-Konstrukt einzuleiten. Das Einzige, was innerhalb dieses Prozesses benötigt

## 1. Einleitung

wird, sind etwa 100 Basenpaare (Bp) für eine Sequenzhomologie zwischen dem DNA-Konstrukt und dem Ziellokus. Dabei bilden DNA-Enden den Stimulus [7].

Die HR zeigt in der Praxis aber relativ ineffiziente Resultate in den meisten Organismen oder Zelltypen. In embryonalen Stammzellen (ES) von Mäusen konnte z.B. lediglich eine Effizienz von 1/100 bis 1/1.000 erreicht werden [8, 9].

Gentherapeutische Behandlungen am Menschen führten häufig zu einer unspezifischen Integration des therapeutischen Gens, was zu Problemen führte. So wurde z.B. die HR erstmals beim Menschen mit der Immunschwächeerkrankung ADA-SCID angewendet (vergleiche Abbildung 1.1). Als Vektor zum Transfer des therapeutischen Gens diente ein Retrovirus. Dabei zeigten sich die Probleme mit der unspezifischen Integration darin, dass dies häufig bei den behandelten Patienten Leukämien auslöste [10, 11].



**Abbildung 1.1: Beispiel eines monogenetischen Gendefekts**

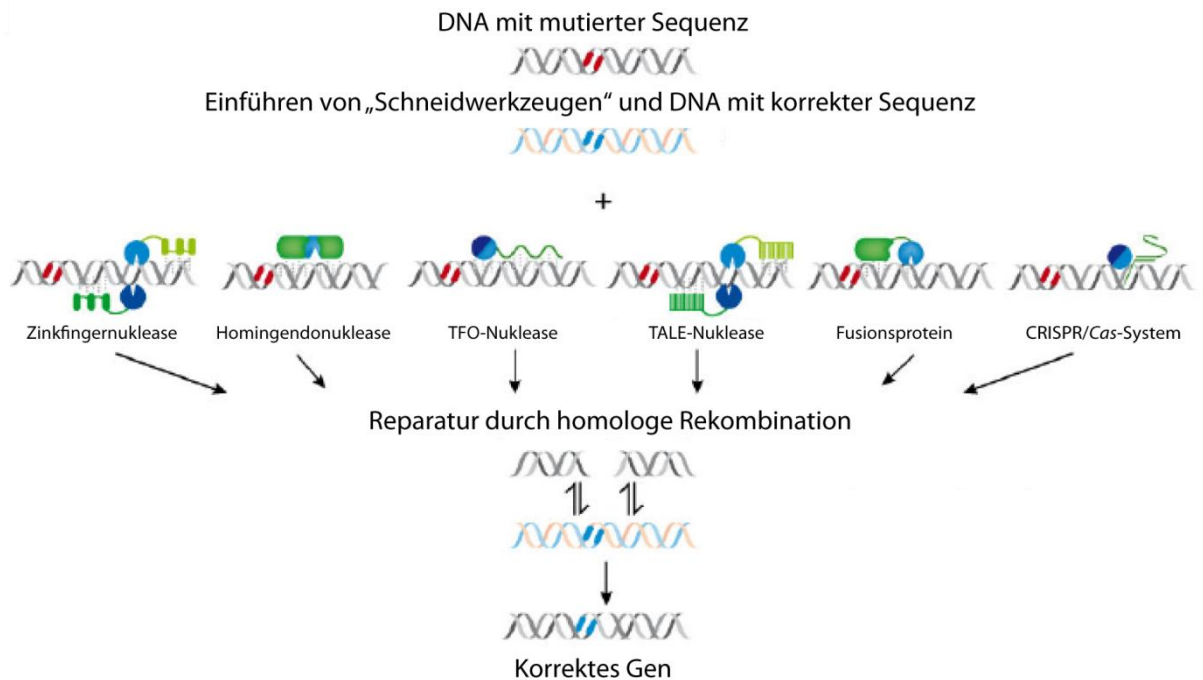
*Severe Combined Immunodeficiency (SCID)* ist eine Krankheit, die z.B. auf eine Mutation im Interleukin-Rezeptor zurückzuführen ist. Dadurch können sich aus hämatopoetischen Stammzellen keine Vorläufer-T-Lymphozyten und keine NK-Zellen bilden. Das gesamte adaptive Immunsystem ist nicht arbeitsfähig. Betroffene sind daher anfällig für Infektionen jeglicher Art und müssen den Kontakt mit ihrer Umwelt vermeiden.

[David Vetter, Baylor college of medicine; <http://www.mirror.co.uk/news/real-life-stories/david-vetter-boy-bubbles-legacy-3196559>]

Durch einen Doppelstrangbruch (DSB) an oder in der Nähe einer definierten Stelle im Genom (*homolog directed repair*, HDR) kann die Frequenz der HR bis zu 1.000-fach erhöht werden und eine zielgerichtete Integration des therapeutischen Gens an einer gewünschten Stelle ermöglichen [12]. Somit sollte ein direkter Austausch des defekten Gens mit dem therapeutischen Gen gewährleistet sein und sich eventuelle mutagene Folgen ausschließen lassen. Deshalb ist es ein Hauptanliegen bei der Etablierung der Gentherapie, ein Werkzeug zu finden, das hochspezifisch und adressiert im Genom spalten kann. Diese hochspezifische Adressierung bedarf deshalb Erkennungssequenzen, welche so lang sind, dass sie nur einmal im Genom vorkommen.

# 1. Einleitung

Derzeit werden hochspezifische Nukleasen wie die Zinkfingernukleasen (ZFN), *triple-helix-forming-oligo* (TFO)-Nukleasen, *transcription activator-like effector* (TALE)-Nukleasen, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas-Systeme, Homingendonukleasen (HE) und Fusionsproteine untersucht, die diese DSB-induzierte Rekombination an einer definierten Stelle im Genom auslösen können [13] (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2: Übersicht der spezifischen Nukleasen**

Durch einen spezifischen Doppelstrangbruch an oder in der Nähe einer mutierten Sequenz (rot) können diese "Schneidewerkzeuge" (Zinkfingernuklease, Homingendonuklease, TALE-Nuklease, TFO-Nuklease, Fusionsprotein und das CRISPR/Cas-System) den zelleigenen Wirtsmechanismus der homologen Rekombination auslösen. Das "defekte" Gen (rot) wird durch eine exogen eingeführte DNA (blau) repariert. [13]

In der Praxis wurden solche Designernukleasen schon in über 10 Modellorganismen wie z.B. Pflanzen [14, 15], Invertebraten [16], Fischen [17] und Säugetieren [18] erfolgreich getestet.

## 1.2 Hochspezifische Designernukleasen

Nukleasen, die hochspezifisch im Genom schneiden sind meist künstlich generierte Nukleasen, die aus einem Spaltmodul, häufig die unspezifische Nukleasedomäne der Typ IIS-Restriktionsendonuklease von FokI und einem spezifischen DNA-Bindungsmodul bestehen. Die einzigen natürlich vorkommenden

# 1. Einleitung

hochspezifischen Nukleasen sind die HE, denn sie haben von Natur aus eine sehr lange Erkennungssequenz und können daher an einer definierten Stelle in der DNA einen DSB induzieren. Durch die lange Erkennungssequenz im Bindungsmodul der generierten Nukleasen können diese ähnlich sequenzspezifisch spalten wie die HE. Allerdings haben andere Designernukleasen im Vergleich zu den HE durch Verwendung der unspezifischen Nukleasedomäne von FokI oft eine höhere „*off-site*“-Spaltungsrate. Durch dieses unspezifische Schneiden von DNA-Sequenzen entstehen bei der „*off-site*“-Spaltung unerwünschte „Nebenprodukte“ [19, 20]. Aber durch die Möglichkeit des gezielten „Programmierens“ auf eine adressierte Zielsequenz, wie später näher erläutert wird, haben einige dieser spezifischen Nukleasen einen Vorteil.

Alle Designernukleasen besitzen eine adressierte, bzw. „spezifische“ Erkennungssequenz und können so eine präzise Spaltung in ihre Zielsequenz einleiten. Dabei wird die präferierte zelluläre HR ausgelöst, um so einen zielgerichteten Genaustausch ermöglichen zu können (siehe Abbildung 1.2). In manchen Fällen, bevorzugt wenn keine Reparatur-Matrix, d.h. keine DNA-Sequenz mit langen homologen Sequenzen (z.B. externe DNA oder diploider Chromosomensatz) zur Verfügung steht, kann der DSB durch *non-homologous end-joining* (NHEJ) repariert werden, welches in den meisten Fällen zu Insertionen oder Deletionen im jeweiligen Gen führt [21], und hier, beim zielgerichteten Genaustausch, unerwünscht ist. Positiver Nebeneffekt des NHEJ an minder erfolgreichen Gentherapieversuchen an ES von Mäusen waren unzählige *knock out* (KO)-Stämme [8, 9].

Die verschiedenen Typen der spezifischen Nukleasen wurden bereits im vorausgegangenen Abschnitt benannt und sollen nun im Weiteren näher betrachtet werden. Auf die Entwicklung von Fusionsproteinen wird erst im nächsten Kapitel eingegangen.

## 1.2.1 Zinkfingernukleasen

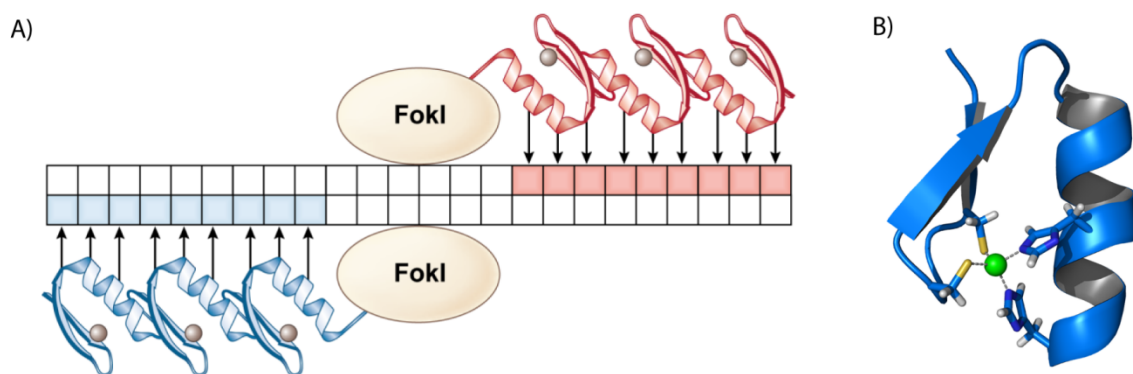
Durch Fusion der Nukleasedomäne von FokI, einem Typ IIS-Restriktionsenzym, mit drei bis vier Zinkfingern konnte eine Zinkfingernuklease (ZFN) hergestellt werden, die einen zielgerichteten DSB in der DNA hervorrufen kann (siehe Abbildung 1.3). Jeder dieser fusionierten Zinkfinger besteht aus ~30 Aminosäureresten und kann ein DNA-Triplet als Zielsequenz erkennen [22]. Durch Koordination von einem Zink-Ion,

# 1. Einleitung

zwischen zwei Cystein- und zwei Histidinresten, erhält die Zinkfingerdomäne seine charakteristische  $\beta\alpha$ -Struktur (siehe Abbildung 1.3 B) [23, 24].

Jedes Nukleotid einer Zinkfinger-Erkennungssequenz steht im gebundenen Zustand, mit einem Aminosäurerest in der  $\alpha$ -Helix der Zinkfingerdomäne in Kontakt. Durch einen Austausch der Aminosäurereste, welche eine Bindung in der großen Furche der DNA ermöglichen, kann die Spezifität einer Zinkfingerdomäne geändert werden. Inzwischen wurden Zinkfinger hergestellt, die alle der 64 ( $4^3$ ) möglichen Basentriplets erkennen können. Durch das Zusammenfügen dieser neu generierten Zinkfinger kann somit eine Vielfalt an Zielsequenzen erkannt werden. Ein Gelingen der Programmierung ist häufig sequenzabhängig, da sich die ZF der Nachbarmodule gegenseitig beeinflussen [22, 25-27].

Mit dem Dimerisieren der Untereinheiten des Enzyms über die FokI-Nukleasedomäne kann die ZFN eine DNA-Sequenz von 18 bis 24 Bp erkennen (siehe Abbildung 1.3A), je nachdem ob drei oder vier Zinkfingerdomänen pro Untereinheit vorliegen [28].



**Abbildung 1.3: Schema einer Zinkfingernuklease (ZFN)**

A) ZFN bestehen aus einer Fusion aus der katalytischen Domäne von FokI und drei Zinkfingerdomänen, die zusammen 9 Bp einer DNA-Sequenz erkennen können. Die Untereinheiten von FokI dimerisieren im aktiven Zustand des Proteins und erkennen dann eine Tandemwiederholungssequenz von insgesamt 18 Bp.

B) Typische  $\beta\alpha$ -Struktur einer Zinkfingerdomäne. Das Zink-Ion (grün) wird von zwei Histidinresten und zwei Cysteinresten gebunden. [27]

Allerdings wurde schnell festgestellt, dass das Schneiden an „*off-site*“ Zielsequenzen hoch ist. So musste das Entstehen von unspezifisch geschnittenen „Nebenprodukten“ unterbunden werden. Neben den gewollten Heterodimeren entstanden nebenbei Homodimere, die ihre palindromische Zielsequenz mit der gleichen Effektivität spalten können [29]. Durch Mutationen an den Interaktionsdomänen an den



# 1. Einleitung

jeweiligen Untereinheiten der FokI-Dimere konnte durch Austausch von negativ bzw. positiv geladenen Aminosäureresten, bei Homodimerformation eine Abstoßung und bei Heterodimerbildung eine erhöhte elektrostatische Anziehung zwischen den Interaktionsdomänen der Heterodimer erzielt und damit die gleiche Effizienz wie bei der HE I-SceI, die als Kontrolle eingesetzt wurde, erzielt werden [30, 31].

## 1.2.2 Homingendonukleasen

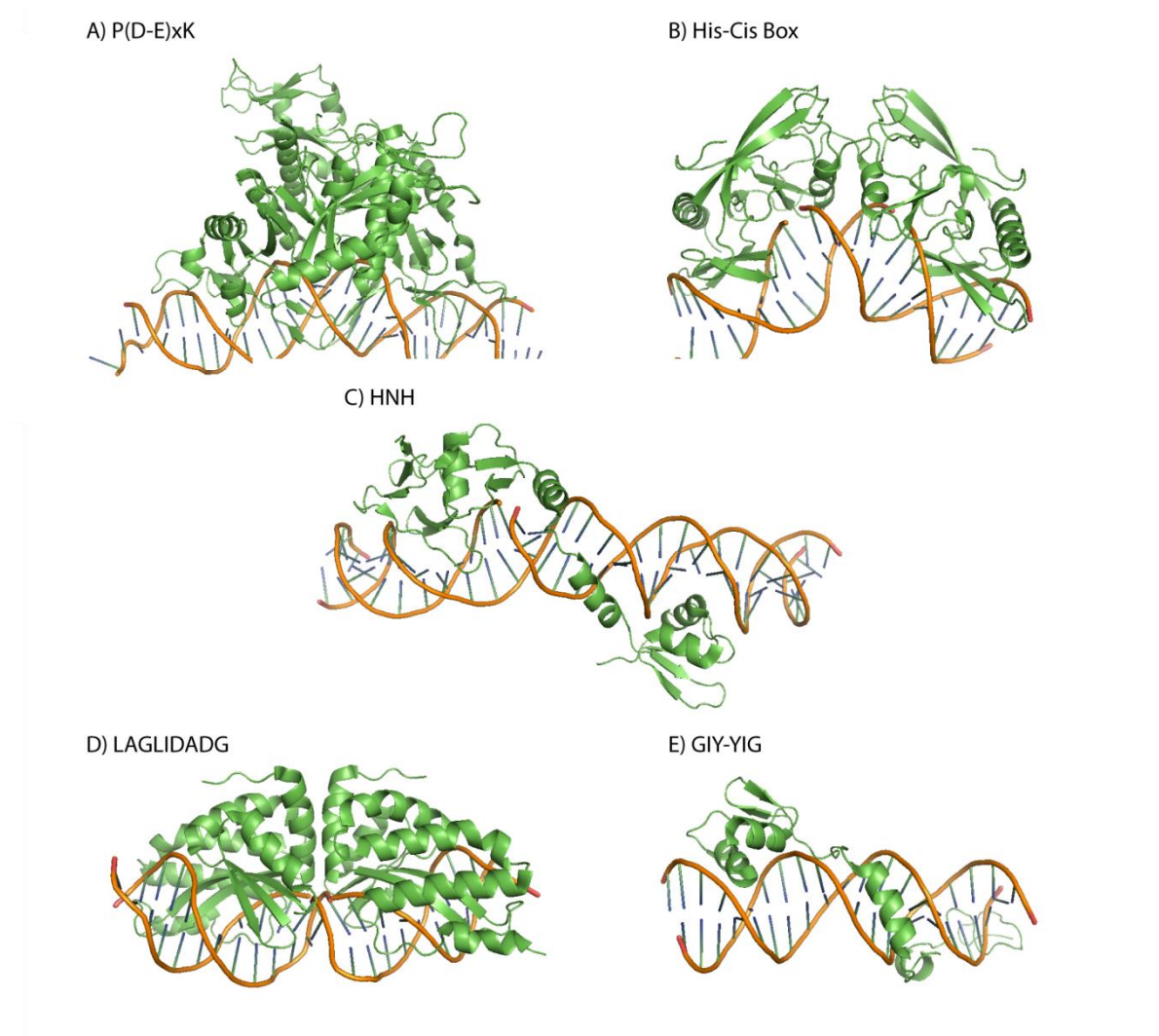
HE sind natürlich vorkommende, hochspezifische Endonukleasen mit langen Erkennungssequenzen (14-40 Bp), die erst in den 70er Jahren entdeckt wurden [32]. Sie sind bisher in Prokarya, Archaea und Eukarya gefunden worden und werden überwiegend durch *open reading frames* (ORF) kodiert, die innerhalb der Gruppe-I, Gruppe-II und archealen Introns vorkommen. Darüber hinaus werden manche HEs als Inteine exprimiert. Einige HEs werden durch eigenständige Gene kodiert, dementsprechend werden sie von mRNAs translatiert. Sie werden ggf. durch RNA-*splicing* freigesetzt oder entstehen aus Vorläuferproteinen durch den an HE entdeckten Prozess des Protein-*splicings* [33-35].

HE können in ihrem Wirtsorganismus hochspezifische DSB in den DNA-Strang, dessen Allel die zu kodierende Sequenz der jeweiligen HE nicht enthält, induzieren [36]. Durch diesen eingeführten DSB kommt es zur HR, wobei das Allel, das die kodierende Sequenz enthält, als Matrize für die Reparatur dient. Eine exogene DNA kann ebenfalls als Matrize zur DNA-Reparatur dienen [5] (siehe Abbildung 1.2). Die Integration der kodierenden Sequenz erfolgt immer innerhalb der Spaltstelle, so dass die Erkennungssequenz der HE zerstört wird. Diese Genkonversion wird auch als *homing* bezeichnet, was diesen Endonukleasen ihren Namen gegeben hat.

Während Restriktionsendonukleasen als Teil eines Restriktions-Modifikationssystems für die Abwehr von Fremd-DNA einen sequenzspezifischen DSB induzieren, haben HE vermutlich keine biologische Funktion. Sie sind lediglich für die Verbreitung ihrer eigenen Sequenz verantwortlich [37]. Die für sie kodierenden Gene sind also Paradebeispiele für „egoistische Gene“. HE werden in fünf Familien eingeteilt, die nach charakteristischen Sequenzmotiven, nämlich LAGLIDADG, HNH, His-Cys box, GIY-YIG und PD-(D/E)XK, benannt werden (siehe Abbildung 1.4). Diese unterscheiden sich im Wesentlichen in ihren konservierten Motiven, dem Katalyse-Mechanismus und in ihrer Verbreitung.

# 1. Einleitung

Durch die Möglichkeit des Protein *engineering* der LAGLIDADG-Familie können viele DNA-Sequenzen in einem Genom durch das Herstellen neuer Meganukleasen anvisiert und repariert werden (weiteres unter Kapitel 1.3). Durch Substitutionen von Aminosäureresten in der Bindungsdomäne dieser Enzyme, gekoppelt mit gezielter Selektion, können HE generiert werden, die eine neue Zielsequenz erkennen [12, 38].



**Abbildung 1.4: Die 5 Familien der Homingendonukleasen (A-E)**

Aus jeder Familie ist ein repräsentativer Vertreter als strukturelles Beispiel ausgewählt worden. A) I-Ssp68031 aus der P(D-E)xK-Familie B) I-Ppol aus der His-Cis-Box-Familie C) I-Hmul aus der HNH-Familie D) I-Crel aus der LAGLIDADG-Familie E) I-TevI aus der GIY-YIG-Familie.

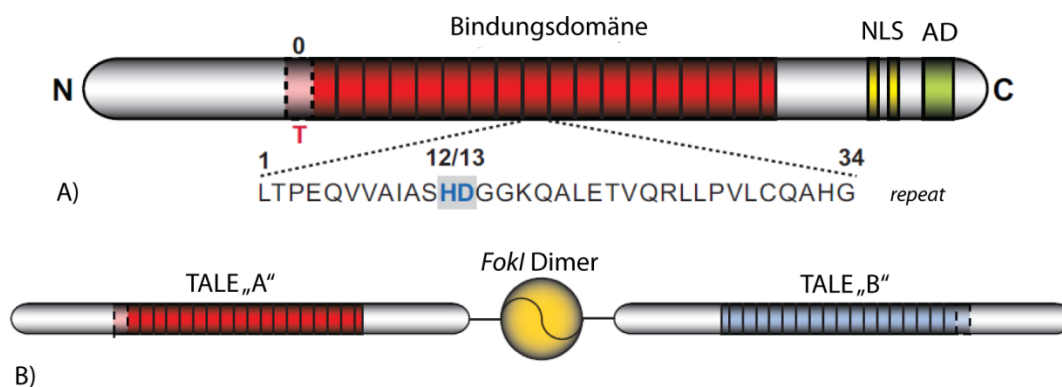
Ein weiterer Ansatz ist die Herstellung von Heterodimeren. Wie zuvor bei den Zinkfingern erwähnt, gibt es hier ebenso durch Homodimerformation die Möglichkeit einer nichtadressierten Spaltung. Durch Einfügen eines *linker*, zwischen den zwei Untereinheiten des Heterodimers kann ein Monomer hergestellt und so die unerwünschte „*off-site*“-Spaltung vermieden werden [39]. Ebenso könnte durch

# 1. Einleitung

Austausch von negativ bzw. positiv geladenen Aminosäureresten in der Interaktionsdomäne des Dimers eine erhöhte Abstoßung der Homodimerformation und eine erhöhte elektrostatische Anziehung der Heterodimerformation, ähnlich wie bei den ZFN, erreicht werden [29].

## 1.2.3 TALE-Nukleasen

*Transcription activator-like effector* (TALE)-Proteine wurden aus dem pflanzenpathogenem Bakterium des Genus *Xanthomonas* isoliert. Sie gelten als wichtige Schlüssel-Virulenzfaktoren, die in der Lage sind die Wirtszelle neu zu programmieren, indem sie eukaryotische Transkriptionsfaktoren mimen. Sie agieren als Transkriptionsaktivatoren im Nukleus, indem sie mit ihrer Zentralsdomäne, welche ein sich wiederholendes Sequenzmotiv aufweist, hochspezifisch an DNA binden [40-42]. Dadurch kann es zu Störungen in der Zellteilung kommen, was zur Erkrankung der Pflanze führt [43]. TALE sind bausteinartige Proteine, bestehend aus zentralen Wiederholungssequenzen, die eine sequenzspezifische DNA-Bindung einleiten können und einer C-terminalen Domäne, die sowohl ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) sowie eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) enthält.



**Abbildung 1.5: Organisation von TALEN**

A) Einzelne TALE-Domäne und dessen Bindungskodierung. TALE bestehen aus einer Kernlokalisationssequenz (NLS, gelb) und einer Aktivierungsdomäne (AD, grün). Die zentrale Wiederholungssequenz (rot) ist für die Spezifität der DNA-Bindung zuständig und besteht aus 12-30 dieser *repeats*. Darunter ist ein Beispiel eines *repeat* dargestellt, welches jeweils aus 33-35 konservierten Aminosäureresten besteht. Die spezifischen Bindungen werden von den Aminosäuren 12 und 13 (blau) vermittelt.

B) Schematische Darstellung einer TALE-Nuklease (TALEN). Durch Fusion der FokI-Nukleasedomäne mit TALE entsteht eine spezifische Nuklease. Mit der Dimerisierung von FokI kann das Schneiden der Erkennungssequenz (von TALE „A“, rot plus TALE „B“, blau) eingeleitet werden. [45]

# 1. Einleitung

Die DNA-Bindungsdomäne besteht aus 12-30 langen, regelmäßig angeordneten Sequenzwiederholungen (*repeats*), die jeweils 33-35 konservierte Aminosäurereste enthalten [44, 45]. Polymorphismen zwischen den Wiederholungssequenzen sind vor allem in den Positionen 12 und 13 gefunden worden (siehe Abbildung 1.5 A) [46]. Diese zwei Positionen werden auch als *repeat variable di-residues* (RVD) bezeichnet und erkennen vorzugsweise eine von den vier Basen in der Zielsequenz der DNA. Ausgehend von dieser Eigenschaft sind die DNA-Bindungsdomänen von TALE sehr gut auf die Erkennung von gewünschten Gensequenzen zu programmieren [47]. Im Gegensatz zu den generierten HE oder ZFN ist eine langwierige Selektion auf spezifische DNA-Erkennungssequenzen nicht mehr nötig.

Durch Fusion der Nukleasedomäne von FokI (Typ IIS-Restriktionsenzym) mit einem neuprogrammierten TALE wurde eine sogenannte TALE-Nuklease (TALEN) hergestellt (siehe Abbildung 1.5 B) [45, 48-51].

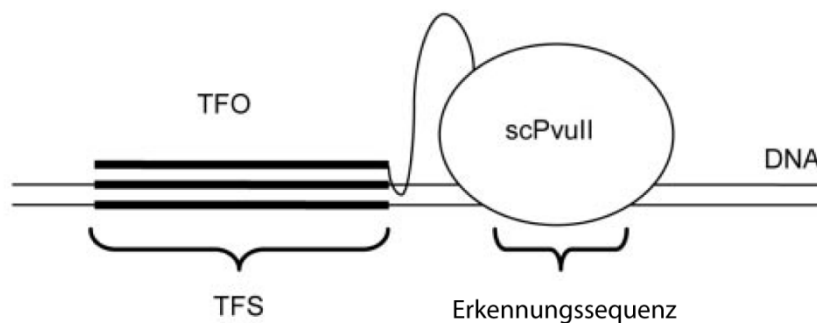
Im direkten Vergleich zu den ZFN zeigen die TALEN eine ähnliche Effizienz ihre Zielsequenz zu spalten. Die Generierung neuer Erkennungssequenzen ist aber für TALEN wesentlich schneller zu bewerkstelligen und zeichnet sich durch ein geringeres Maß an „*off-site*“-Spaltung aus, was diese jüngere Kategorie der Designernukleasen weniger toxisch für Zellen macht [52].

## 1.2.4 TFO-Nukleasen

Durch Fusion eines spezifischen Restriktionsenzym mit einem Tripel-Helix bildenden Oligonukleotid (TFO, *triple forming oligo*) konnte eine chimäre Restriktionsendonuklease erzeugt werden, die die Sequenzspezifität des Restriktionsenzym erhöht. Das TFO, welchem vier verschiedene synthetische Nucleotide zugrunde liegen, könnte unter physiologischen Bedingungen alle vier Bp durch Ausbildung einer Tripel-Helix erkennen. 2'Aminoethoxy-5-(3-aminoprop-1-ynyl)uridin erkennt mit hoher Affinität AT-Basenpaare, 3-Methyl-2-aminopyridin bindet GC-Basenpaare bei höherem pH als Cytosin, während 6-(3-Aminopropyl)-7-methyl-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-2(7H)-one und N-(4-(3-acetamidophenyl)thiazol-2-yl-acetamid) jeweils CG- und TA-Basenpaare binden [53]. Mit einem so „programmierbaren“ Restriktionsenzym könnte im Prinzip jede beliebige Zielsequenz erkannt werden, soweit sie in der Nähe der Erkennungssequenz der gekoppelten Restriktionsendonuklease liegt.

## 1. Einleitung

Bislang konnte dieses Schema *in vitro* mit der *single chain*-Variante der Restriktionsendonuklease PvuII (scPvuII), gekoppelt an ein 16 Bp-langes TFO, demonstriert werden [54]. Das so entstandene chimäre Restriktionsenzym kann nun seine Erkennungssequenz, bestehend aus der 16 Bp-langen TFO-Bindestelle und der in nächster Nachbarschaft liegenden Erkennungssequenz von scPvuII, binden und eine spezifische Tripel-Helix ausbilden (siehe Abbildung 1.6). Die Ausbildung der Tripel-Helix ist jedoch im Vergleich zur katalytischen Aktivität von scPvuII sehr langsam. Weshalb *in vitro* eine spezifische Spaltung nur durch Vorinkubation des chimären Enzyms mit der DNA, in Abwesenheit von Metallionen als Kofaktoren (d.h. im inaktiven Zustand) hervorgerufen werden kann. Bei Anwesenheit dieser Kofaktoren direkt zu Inkubationsbeginn, kann scPvuII auch die „nichtadressierten“ scPvuII-Erkennungssequenzen in der DNA schneiden. Daher könnte diese artifizielle Nuklease *in vivo* sehr toxisch für die Zellen sein [54].



### Abbildung 1.6: Schema einer TFO-Nuklease

Diese chimäre Restriktionsendonuklease entsteht durch Fusion einer spezifischen Restriktionsendonuklease (hier scPvuII) mit einem Tripel-Helix bildenden Oligonukleotid (triple forming oligo, TFO). Die gesamte Erkennungssequenz ergibt sich aus der TFO-Erkennungssequenz (triple-helix forming side, TFS) und der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym. [53]

Ein Verhindern dieser Toxizität könnte eine Kontrolle der enzymatischen Aktivität schaffen. Hierbei wird das Enzym erst durch eine Fotostimulation in seine katalytisch aktive Form gebracht und wäre damit regulierbar [55, 56].

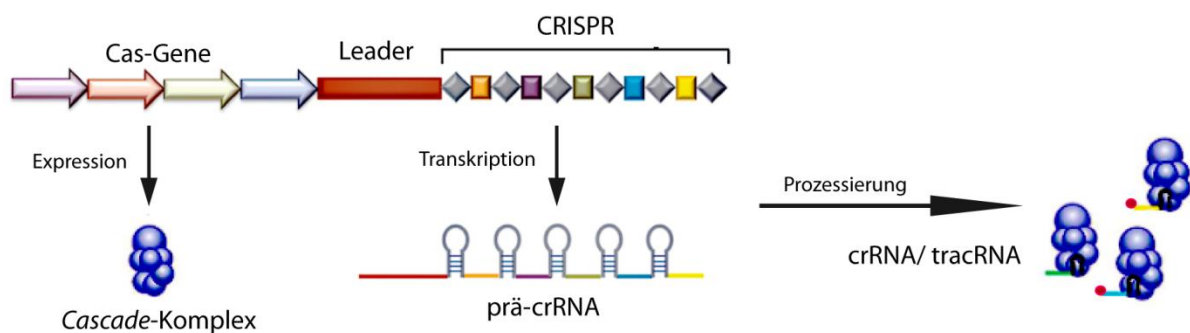
### 1.2.5 CRISPR/Cas-System

Das *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas-System dient einem Immunitätsmechanismus in Bakterien und

# 1. Einleitung

Archeen, der das Eindringen von fremder DNA durch Phagen oder Plasmide verhindert.

CRISPR sind Abschnitte mit oft palindromen Sequenzwiederholungen (*repeats*) die von ähnlich langen variablen DNA-Sequenzen (*spacer*) getrennt werden (siehe Abbildung 1.7) [57]. Erstmals wurden sie 1987 in *E. coli* entdeckt [58]. Das *repeat* stammt von der eingedrungenen Fremd-DNA, die erfolgreich abgewehrt werden konnte. Cas-Proteine schneiden die fremde DNA in einzelne Sequenzabschnitte (Protospacer), die dann zwischen Leaderregion und dem ersten *repeat* eingebaut werden. Durch den *repeat* wird eine adaptive Immunantwort aufgebaut und wiederum als RNA-Matrize gegen invasive DNA-Fragmente verwendet. Die kurzen RNA-Sequenzen (tracrRNA und crRNA) binden spezifisch an die Fremd-DNA und markieren diese für den Abbau durch die Cas-Endonuklease z.B. Cas9 [59, 60].



**Abbildung 1.7: Genereller Aufbau des CRISPR/Cas-Systems**

CRISPR enthalten unterschiedliche *spacer* (farbige Quaträte) zwischen den palindromisch wiederholenden Sequenzen, dem *repeat* (graue Routen). In der Leaderregion wird die Transkription der prä-crRNA gestartet. Davor befinden sich die Cas-Gene, die meisten bilden nach Expression einen Cascade-Komplex aus durch diesen die crRNAs und tracrNAs prozessiert werden. Diese erkennen fremde DNA und die dazugehörige Endonuklease (pink, z.B. Cas9) spaltet diese. [Wagner, R. und Pul, Ü., BIOSpectrum 04.11; 393-395]

Da die gezielte Adressierung und Spaltung multipler Sequenzen auf komplementärer Bindung durch Watson-Crick-Basenpaarung vermittelt wird, ist das Herstellen einer RNA-vermittelnden Nuklease relativ schnell zu ermöglichen [61, 62]. Erste Versuche im zellulären System zeigten eine minimal höhere Effizienz für das CRISPR/Cas-System bei der zielgerichteten Adressierung von DNA-Sequenzen im Vergleich zu den TALE-Nukleasen [61, 63]. Allerdings zeigten erste Versuche an humanen Zellen eine wesentlich höhere „*off-site*“-Spaltung [63-65].

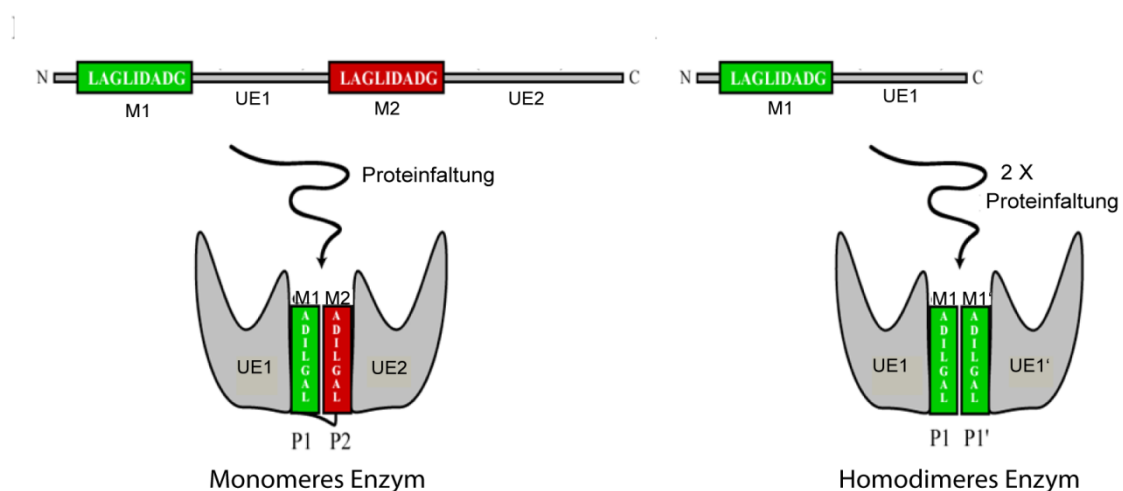
# 1. Einleitung

## 1.3 Protein engineering von LAGLIDADG-HE

Die bekannteste und größte Familie der HE ist die LAGLIDADG-Familie. Es handelt sich hierbei um Enzyme, die typischerweise bei einzelligen Eukaryoten im Mitochondrien- bzw. Chloroplasten-Genom zu finden sind [66].

Alle LAGLIDADG-Enzyme haben eine typische  $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Sekundärstruktur und ein konserviertes Sequenzmotiv, welches aus zehn charakteristischen Aminosäureresten in der ersten  $\alpha$ -Helix besteht. Die  $\beta$ -Faltblätter sind für das spezifische Binden ihrer Zielsequenz zuständig und können eine sattelähnliche Struktur über der DNA bilden [67].

Es sind zwei verschiedene Typen von LAGLIDADG-HE bekannt (siehe Abbildung 1.8). Bei den Homodimeren liegt das LAGLIDADG-Motiv einzeln, bezogen auf die Polypeptidkette, vor und sie erkennen eine (nahezu) palindromische Zielsequenz [68, 69]. Bei den Monomeren liegt dagegen ein doppeltes LAGLIDADG-Motiv mit pseudodimerer Struktur vor und sie erkennen asymmetrische DNA-Sequenzen [66, 70, 71].



**Abbildung 1.8: Die zwei verschiedenen Arten der LAGLIDADG-Homingendonukleasen**

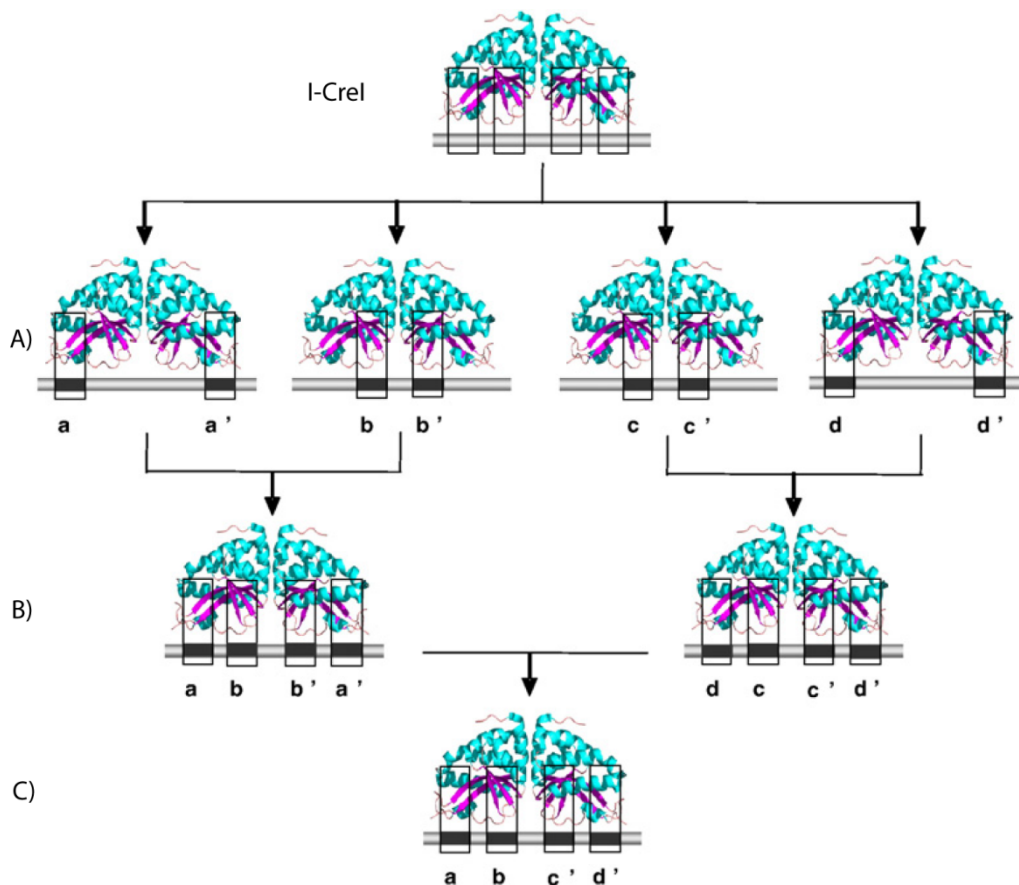
Die Polypeptidkette des monomeren Enzyms besteht aus zwei Untereinheiten (UE1 und UE2) und zwei LAGLIDADG-Motiven (M1 und M2). Die homodimeren Enzyme bestehen aus nur einer Untereinheit mit einem LAGLIDADG-Motiv (M1). Das LAGLIDADG-Motiv (M1 und M2) liegt bei den monomeren Enzymen doppelt und bei den homodimeren Enzymen einzeln (M1) in der Polypeptidkette vor. Durch Dimerisierung der LAGLIDADG-Domänen besitzen die homodimeren Enzyme ebenfalls zwei LAGLIDADG-Motive (UE1 und UE1').

Beide Enzymarten haben ein aktives Zentrum mit zwei Sätzen von katalytisch relevanten Aminosäureresten zum Schneiden beider DNA-Stränge [67, 72]. Das LAGLIDADG-Motiv hat aber nicht nur eine katalytische Aufgabe (das Aspartat ist an

# 1. Einleitung

der Bindung des katalytisch essentiellen Kofaktors  $Mg^{2+}$  beteiligt), sondern auch eine strukturelle, indem es die Untereinheit-Untereinheit- bzw. Domänen-Domänen-Wechselwirkung durch eine *coiled-coil*-Struktur stabilisiert. Bei einer Spaltung ihrer Erkennungssequenz kommt es zu einem DSB mit einem 4 Bp-Überhang am 3'-Ende der DNA [73].

Enzyme aus der LAGLIDADG-Familie binden und schneiden zahlreiche DNA-Zielsequenzen [66] und können durch Protein *engineering* so verändert werden, dass neue DNA-Substrate spezifisch erkannt und ein DSB induziert wird [38, 74]. Solche Meganukleasen sind „maßgeschneiderte“ Proteine und könnten ihre Einsatzmöglichkeiten etwa im zielgerichteten Genaustausch (z.B. in der Gentherapie), bei der Detektion von seltenen genetischen Sequenzen und bei der Genom-Kartierung haben.



**Abbildung 1.9: Überblick der kombinatorischen Methode von Collectis**

A) In einem Selektionstest wurden I-Crel-Varianten mit veränderter Erkennungssequenz hergestellt. Diese lokalen Veränderungen von I-Crel wurden zuerst in homodimeren B) und dann in heterodimeren C) Proteinen kombiniert. [76]



## 1. Einleitung

Die französische Firma Collectis (Romainville) entwickelte eine hochinteressante Methode, um spezifische I-CreI-Varianten aus der LAGLIDADG-Familie mit geänderter Erkennungssequenz durch ein *screening* erkennen zu können [74-76]. Dafür wurden I-CreI-Varianten hergestellt, die zwei bis vier Mutationen an Aminosäureresten, die für DNA-Proteininteraktionen relevant sind, aufweisen. Diese verschiedenen Sets von Aminosäuresubstitutionen wurden dann in jeweils einer Meganuklease kombiniert und so verschiedenste Enzymvarianten entwickelt. Neben Homodimer isolierten sie anschließend auch Heterodimer, so dass eine größere Sequenzvariabilität entstand und so nicht nur pseudopalindromische Erkennungssequenzen, sondern auch asymmetrische Sequenzen erkannt werden konnten (siehe Abbildung 1.9).

Mit dieser kombinatorischen Methode konnte Collectis eine Sammlung von mehr als 30.000 I-CreI-Varianten mit geänderten Erkennungssequenzen herstellen. Bislang konnten aus dieser Sammlung z.B. I-CreI-Varianten für den zielgerichteten Genaustausch an menschlichen Genen selektiert werden. Darunter *XPC*, welches bei der Krankheit *Xeroderma Pigmentosum* [38] und *RAG1*, welches bei *X-chromosome linked severe combined immunodefency* (X-SCID) eine wichtige Rolle spielt, [77, 78].

### 1.3.1 Protein engineering an Fusionsproteinen

Im Laufe der Evolution haben sich Enzyme durch Fusion von Domänen oder Untereinheiten von existierenden Proteinen weiterentwickelt, um sich optimal an neue Bedingungen anzupassen (z.B. Schneiden neuer Erkennungssequenzen).

Das erste beschriebene Fusionsprotein, das aus Untereinheiten bzw. Domänen von HE hergestellt wurde, war E-DreI und zeigte erstmals, dass eine Fusion von LAGLIDADG-HE überhaupt möglich ist. Diese neu entwickelte, hochspezifische Endonuklease E-DreI besteht aus Untereinheiten bzw. Domänen der LAGLIDADG-HE I-CreI und I-DmoI (siehe Abbildung 1.10). Es schneidet eine neue Erkennungssequenz, die aus Teilen der vorherigen Erkennungssequenzen besteht [79].

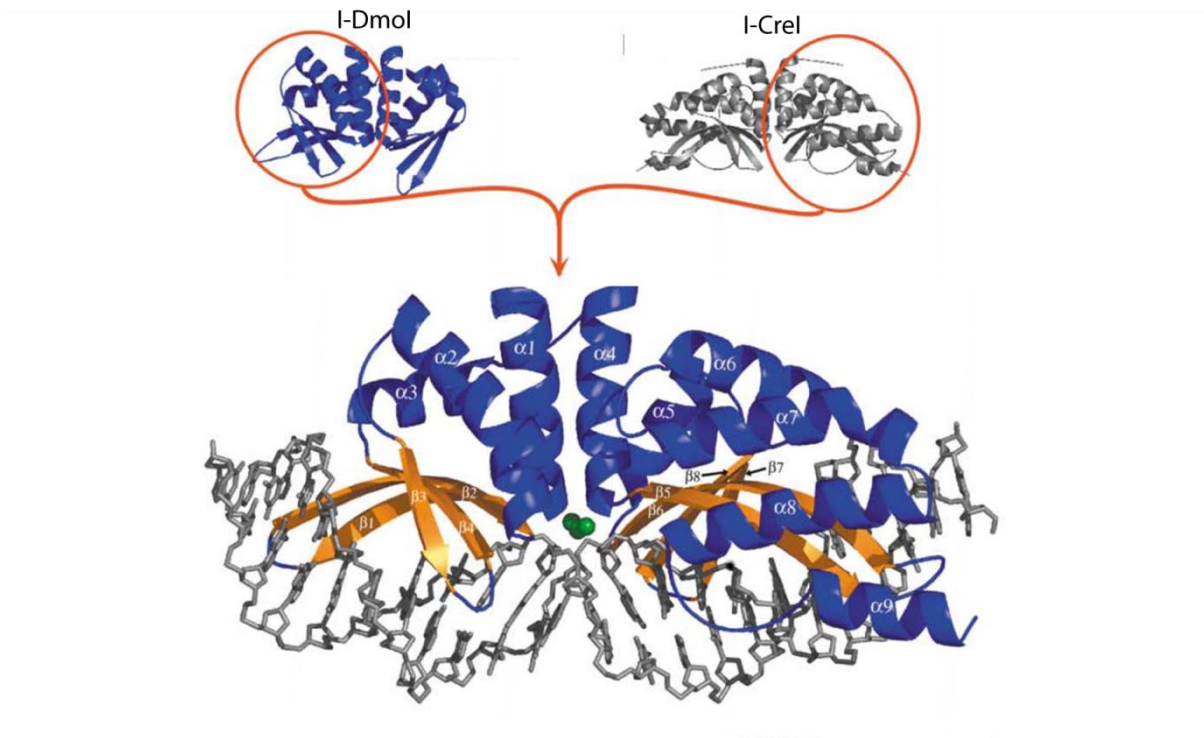
Weitere Fusionen von LAGLIDADG-HE bzw. deren Untereinheiten oder Domänen folgten, um mit veränderter Erkennungssequenz eine erhöhte Aktivität und Spezifität zu erreichen [39, 80].

Viele spezifische Designernukleasen (z.B. ZFN und TALEN) basieren auf einer Fusion mit der unspezifischen Nukleasedomäne von FokI als Spaltdomäne und einer jeweils

## 1. Einleitung

hochspezifischen Bindungsdomäne. Da Restriktionsenzyme aber eine geringe Spezifität für ihre Erkennungssequenz besitzen kann die Spaltdomäne allein, ohne Bindung der kompletten Designernuklease, nichtadressiert schneiden und so „*off-site*“-Spaltung begünstigen [20].

In den meisten Fällen sind Fusionsproteine in heterodimerer Form erwünscht und können durch Bildung von Homodimeren ebenfalls eine „*off-site*“-Spaltung begünstigen. Mit Vergrößerung der Erkennungssequenz in der Spaltdomäne könnte man theoretisch die Toxizität dieser Designernukleasen herabsetzen. Durch das Fusionieren von Proteinen, die gleichzeitig als Spalt- wie auch als Bindungsmodul agieren und lange Erkennungssequenzen besitzen, wie z.B. HE, könnte eine solche Vergrößerung der Erkennungssequenz generiert werden.



**Abbildung 1.10: Herstellung und Struktur von E-Drel**

Die N-terminale Domäne von I-Dmol wurde mit einem I-Crel-Monomer fusioniert und mit einem Peptid-linker verbunden um ein monomeres Enzym zu erzeugen. Das *interface* (LAGLIDADG-Helix) wurde optimiert, um eine optimale Proteinfaltung zu erhalten und die Anziehung der beiden Untereinheiten des neuen Proteins zu stärken. [79]

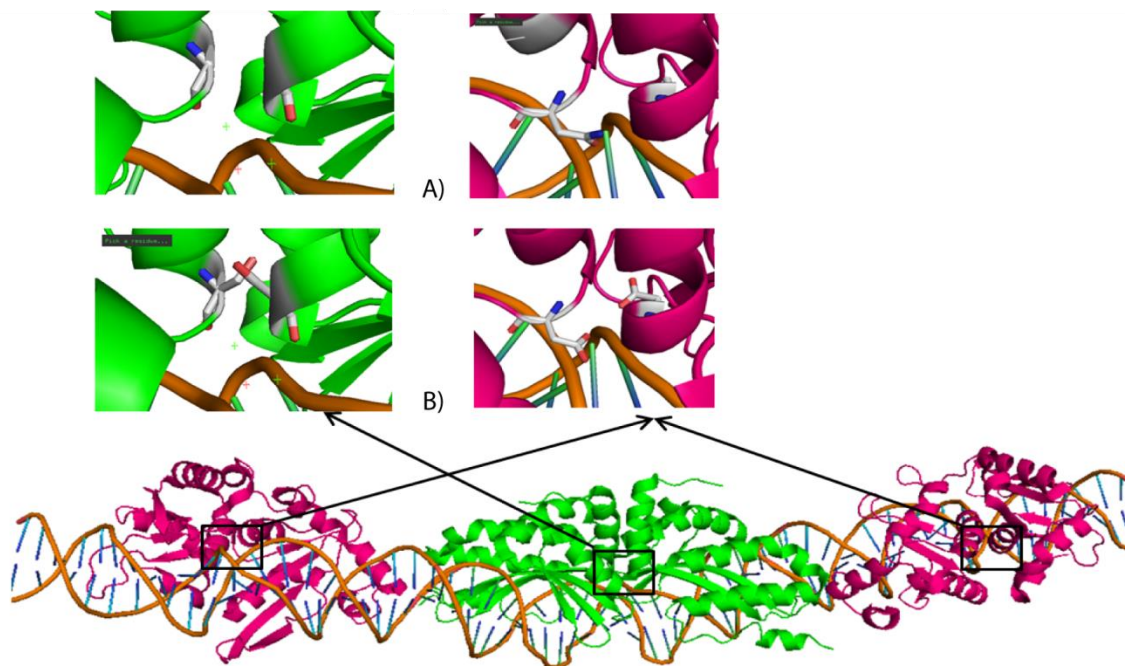
### 1.3.2 Sce\*<sub>2</sub>Cre\*

In den letzten Jahren wurde von meinem ehemaligen Betreuer (Dr. George Silva) die hochspezifische Designernuklease Sce\*<sub>2</sub>Cre\* durch Fusion von zwei bzw. drei

## 1. Einleitung

verschiedenen Proteinen entwickelt. Das Fusionsprotein besteht aus der monomeren I-SceI, einer 6 Aminosäuren-langen (Lys-Ser-Lys-Ile-Ser-Gly) *linker*-Region aus der HE I-TevI und einer Untereinheit eines Homodimer bildenden I-CreI (siehe Abbildung 1.11).

Alle Proteine sind HE der LAGLIDADG-Familie. Das komplette Enzym ist 91 kDa, enthält insgesamt sechs LAGLIDADG-Motive und ist in der Lage, über die I-CreI-Interaktionsdomänen (LAGLIDADG-Helix) ein Homodimer auszubilden. Das aktive Zentrum von I-SceI wurde durch die Mutationen D44N/D145A (I-SceI\*) deaktiviert [20], so dass I-SceI\* in diesem Fall lediglich als erweiterte Bindungsdomäne fungiert und jegliche Nukleaseaktivität von der Spaltdomäne (I-CreI) im Fusionsprotein ausgeht. Dadurch entstand eine neue Erkennungssequenz, die insgesamt 60 Bp umfasst (siehe 7.2). Außerdem wurde der Aminosäurerest Glycin 19 in der Spaltdomäne durch ein Serin ausgetauscht (I-CreI\*).



**Abbildung 1.11: Modell der Dimerisierten Meganuklease Sce\*<sub>2</sub>Cre\***

Dieses hochspezifische Fusionsprotein besteht in Dimerer Form aus einer I-CreI-Variante (grün) die jeweils von beiden Seiten von einer I-SceI-Variante flankiert wird (pink). Die Bindedomäne besteht aus der katalytisch inaktiven I-SceI-Variante I-Sce\* (pink), die durch Austausch der aktiven Asparaginsäurereste an Position 44 und 145 (pink, A) zu Asparagin bzw. Alanin (pink, B) hergestellt wurde. Die Aktivität der Spaltdomäne (grün) wurde durch die Aminosäuresubstitution an Position 19 von einem Glycin (grün, A) zum Serin (grün, B) erhöht .

Position 19 befindet sich N-terminal unmittelbar „oberhalb“ des aktiven Zentrums in der LAGLIDADG-Helix. Serin ähnelt dem Glycin soweit, dass es die Proteinstruktur

## 1. Einleitung

nicht zerstört, aber die Struktur des Rückgrats leicht verändert. Diese Änderung soll eine geringe Verschiebung der Reste im aktiven Zentrum erzeugen und damit evtl. eine Erhöhung der Aktivität des Fusionsproteins hervorrufen [38].

Mit dem hergestellten Fusionsprotein Sce\*<sub>2</sub>Cre\* konnte gezeigt werden, dass die neu generierte Meganuklease unter Hochsalzbedingungen (ab 800 mM NaCl) einen sehr spezifischen DSB in ihrer Zielsequenz bewirken kann. Bei niedrigen Salzbedingungen konnte gezeigt werden, dass es zu einem „unspezifischen“ Schneiden bzw. zu nichtadressierter Spaltung kommt, womit ein zielgerichteter DSB *in vivo* unmöglich ist (persönlich mitgeteilt von Dr. George Silva).

### 1.3.2.1 I-SceI

Seit den 90er Jahren wird I-SceI für Genommodifikationen und zur Einleitung der HR in verschiedenen Zellen und Organismen genutzt [81-86]. Durch diese relativ lange Forschungsphase im Vergleich zu anderen Meganukleasen wird I-SceI sehr häufig als „*gold standard*“ für den Vergleich zu neu generierten Designernukleasen verwendet [87].

I-SceI ist eine LAGLIDADG-HE und wird in einem Intron der mitochondrialen 21S-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* kodiert [88]. Es ist ein monomeres Enzym mit einer Masse von ca. 28 kDa und erkennt eine 18 Bp-lange, pseudosymmetrische Sequenz [89, 90]. I-SceI neigt dazu an einem Ende der DNA nach Spaltung gebunden zu bleiben, was zu einem langsamen *turnover* des Enzyms führt [91]. Im aktiven Zentrum des LAGLIDADG-Motivs gibt es zwei katalytisch wichtige Aminosäurereste, die Aspartate 44 und 145 (siehe Abbildung 1.11, pink) [92]. I-SceI bindet seine Erkennungssequenz mit einem  $K_D$  von ungefähr 10 nM [93].

### 1.3.2.2 I-CreI

I-CreI ist ebenfalls eine LAGLIDADG-HE und wird in dem Gruppe I-Intron der Chloroplasten-23S-rRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* kodiert [94]. Sie fungiert in aktiver Form als Homodimer aus zwei gleichen  $\alpha/\beta$ -Domänen und erkennt eine 22 Bp-lange, pseudopalindromische Sequenz. Jedes Monomer ist 18 kDa „groß“, womit das Enzym ein Homodimer mit einer Masse von 36 kDa darstellt (siehe Abbildung 1.11, grün) [68]. Im aktiven Zentrum, des C-terminalen Endes der LAGLIDADG-Helix, sind zwei Aminosäurereste an der Koordination von divalenten Metallionen und dem Hydrolysieren der spezifischen Phosphodiesterbindungen in

## 1. Einleitung

der DNA beteiligt [95]. Im Falle von I-CreI sind es in jedem Monomer die Aspartatreste D20. Das Schneiden der Zielsequenz ist  $Mg^{2+}$ - (oder  $Mn^{2+}$ -) abhängig und wird durch das divalente Kation  $Ca^{2+}$  im aktiven Zentrum inhibiert [69, 95]. Die Bindungsdomäne besteht aus einem konkaven  $\beta$ -Faltblatt innerhalb eines jeden Monomers des Enzyms und kontaktiert den jeweiligen DNA-Strang. Die Erkennungssequenz von 22 Bp Länge wird über direkte Kontakte zu Aminosäureresten des Proteins gebunden. Dabei interagiert jedes Monomer von I-CreI über neun Aminosäurereste spezifisch mit sieben Basen in der großen Furche der DNA. [96]. I-CreI hat einen  $K_D$  von 0,1 – 1 nM [95] und bildet durch seine *single turnover*-Eigenschaft *in vitro* mit der Zielsequenz einen so starken Protein/DNA-Komplex aus, dass SDS dazugegeben und es erhitzt werden muss, um diesen zu lösen [69, 97]. I-CreI zeigt ein erstaunlich hohes Temperaturoptimum von über 50°C und ist selbst bei einer Temperatur von 70°C noch voll aktiv [69].

### 1.3.3 *Directed Evolution* von Meganukleasen

Im Laufe von Millionen von Jahren haben sich auf unserer Erde viele Enzyme durch natürliche Selektion entwickelt und kontinuierlich bestimmte Eigenschaften verbessert (wie Aktivität, Bindung, Interaktion, Spezifität, Löslichkeit etc.). Diese Eigenschaften versucht man auch in Forschung und Industrie durch *directed evolution* über verschiedene *in vivo*-Selektionsmethoden für den jeweiligen Anwendungsfall zu optimieren. Ziel ist es große Datenbanken von Sequenzen neu entwickelter Enzyme direkt im Organismus zu analysieren und auszusortieren [98-100]. Diese Datenbanken von Sequenzen der neu generierten Enzyme werden gewöhnlich durch *error-prone*-PCR oder *DNA-shuffling* hergestellt [101, 102]. Wenn aber die Struktur eines gezielten Proteins bekannt ist und der Forschungsstand es zulässt, können auch durch Protein *engineering* neue Varianten hergestellt werden [103].

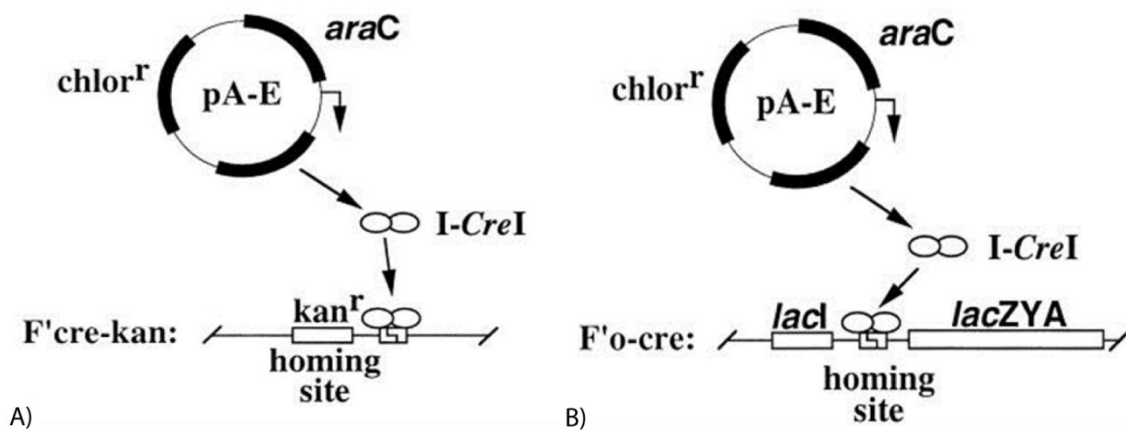
#### 1.3.3.1 Selektions/*Screening*-Assay

Der erste Selektionstest, der durchgeführt wurde, um neu generierte Enzyme der HE I-CreI zu selektieren, war ein *in vivo*-Aktivitätstest (siehe Abbildung 1.12 A) [97]. Das Plasmid pA-E, welches die HE I-CreI mit Arabinose-induzierbarem Promoter kodiert, wurde in *E. coli*-Zellen mit implizierten F'*cre*-kan-Allelen transformiert, die eine

# 1. Einleitung

I-CreI-Erkennungssequenz in unmittelbarer Nähe eines Kanamycin-Resistenz-Gens enthalten. Die durch Arabinose-induzierte Expression aktiver I-CreI-Varianten führte zu einem DSB in der Erkennungssequenz und so zu einem Verlust der Kanamycin-Resistenz und die Zellen starben. Die Varianten, die dagegen wesentlich inaktiver waren, behielten ihre Kanamycin-Resistenz. Damit konnte gezeigt werden, welche Aminosäurereste besonders wichtig für die Aktivität des Enzyms sind und weitere Untersuchungen unternommen werden. Aber es konnten durch diese Art von Assay keine neuen I-CreI-Varianten mit gesteigerter Aktivität oder Spezifität selektiert werden.

Im Laufe der letzten Jahre wurden weitere Selektionsmethoden für HE auf der Basis von toxischen Reportern, der Barnase (RNase von *Bacillus amyloliquefaciens*) oder des *control of cell death B* (CcdB)-Toxins [93, 104, 105] entwickelt. Dabei ist das Überleben der Zellen direkt mit der Aktivität und Spezifität des jeweiligen Enzyms verbunden und bei Expression des toxischen Reporters sterben die Zellen ab. Eine weitere Selektionsmethode ist das Wiederherstellen des *lac*-Operons für eine blau/weiß-Selektion [74, 76, 106].



**Abbildung 1.12: Erste *in vivo* Aktivitätstests von I-CreI**

Das Plasmid pA-E wurde in *E. coli*-Zellen mit F'cre-kan- bzw. F'o-cre-Allelen transformiert und kodiert die, unter einem Arabinose-induzierbaren Promotor (araC) stehende, HE I-CreI.

A) Beim F'cre-kan-Assay enthalten die F'cre-kan-Allele die Erkennungssequenz von I-CreI (*homing site*) und ein Kanamycin-Resistenzgen. Durch Expression aktiver I-CreI-Varianten kommt es zur Spaltung der Erkennungssequenz, zum Verlust der Kanamycin-Resistenz und einem Absterben der Zellen.

B) Der F'o-cre-Assay basiert auf einer blau/weiß-Selektion. Die F'o-cre-Allele beinhalten das lac-Operon mit einer I-CreI Erkennungssequenz (*homing site*) anstelle des lac-Operators. Kommt es zur Spaltung der Erkennungssequenz werden die Bakterienkolonien weiß statt sich blau zu färben. [108]

# 1. Einleitung

Besonders zu erwähnende Assays, die durch eine blau/weiß-Selektion funktionieren, ist das oben, in Kapitel 1.3, erwähnte *screening* von Collectis [76, 107], das in Hefezellen durchgeführt und in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen kontrolliert wurde, um sehr schnelle Antworten über Spezifität und Aktivität von neu hergestellten Varianten zu bekommen (Abbildung 1.9) und der F'o-cre Assay von Seligmann *et al.*, der in *E. coli*-Zellen durchgeführt wurde (siehe Abbildung 1.12B) [108].

Bei dem F'o-cre Assay kodiert das Plasmid für die HE I-CreI. Die Zellen enthalten die F'o-cre-Allele mit *lac*-Operon und einer Erkennungssequenz für I-CreI anstelle des *lac*-Operators. Durch Schneiden der Erkennungssequenz können die *lacZ*-Gene nicht transkribiert werden und die Kolonien bleiben weiß. Sind aber die hergestellten I-CreI-Varianten inaktiver oder schneiden unspezifischer, kann die DNA transkribiert werden und die Kolonien werden durch Expression von  $\beta$ -Galaktosidase überwiegend blau. Mit Hilfe des F'o-cre Assays konnten neue Mutanten hergestellt werden, die mit einer höheren Spezifität mit ihrer Erkennungssequenz interagieren [108].

Um die Spezifität und Aktivität der HE weiter zu untersuchen, wäre es interessant, einen funktionierenden Bindungs-Assay zu entwickeln. Rein theoretisch könnte ein Bindungs-Assay dazu verhelfen, noch aktivere und spezifischere Enzyme mit veränderten Erkennungssequenzen herzustellen.

Essentiell für einen Bindungs-Assay wäre ein katalytisch inaktives Enzym, welches aber dadurch nicht an Affinität zu seiner Erkennungssequenz einbüßt. Zurzeit steht aber ein Bindungs-Assay in Bezug auf HE nicht zur Verfügung. Bisher ist nicht erwiesen, ob eine spezifischere Bindung prinzipiell auch einen schnelleren Spaltvorgang erzielt. Die Angaben in der Literatur, die ansatzweise zu diesem Thema beitragen, sind widersprüchlich [39, 108] und direkte Untersuchungen fehlen. Ein Bindungs-Assay könnte dazu verhelfen Enzyme mit veränderten bzw. neuen Erkennungssequenzen herzustellen, sodass sie definierte Sequenzen des menschlichen Genoms spezifisch erkennen können.

## 1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen zwei verschiedene Aspekte der LAGLIDADG-HE untersucht werden.

## 1. Einleitung

Zum einen soll das von Dr. Silva entwickelte Fusionsprotein Sce\*<sub>2</sub>Cre durch zielgerichtete Mutation (Protein *engineering*) so verändert werden, dass es auch unter physiologischen Bedingungen seine Zielsequenz spezifisch spalten kann und es so auch *in vivo* analysiert und eingesetzt werden könnte.

Bislang konnte Sce\*<sub>2</sub>Cre lediglich unter Hochsalzbedingungen einen spezifischen DSB in seine Erkennungssequenz induzieren. Da in der Literatur viele Dokumentationen über Mutationen und Veränderungen in der Aktivität, Spezifität und dem Spalten von neuen Erkennungssequenzen von I-SceI und I-CreI, aus denen das Fusionsprotein besteht (siehe Abbildung 1.11) vorhanden sind, ist Sce\*<sub>2</sub>Cre\* im Vergleich zu anderen Fusionen von HE relativ gut programmierbar. Um das unspezifische Schneiden der I-CreI-Spaltdomäne unter physiologischen Bedingungen zu katalysieren, sollte durch Protein *engineering* versucht werden, die Affinität der Spaltdomäne herabzusetzen, ohne dabei die Aktivität des Enzyms zu verändern, um so *in vivo* die nichtadressierte bzw. „unspezifische“ Spaltung zu unterdrücken.

Zum anderen soll ein *in vivo*-Bindungs-Assay entwickelt werden, damit neue Varianten der HE I-CreI durch *directed evolution* mit veränderter Affinität und Spezifität hergestellt werden können. Ein solcher Bindungs-Assay existiert für HE noch nicht und so dient der F<sup>'o</sup>-cre Assay von Seligman *et al.* [108] und eine inaktive I-CreI-Variante (I-Cre<sup>t</sup>) als Basis zur Entwicklung dieser neuen Selektionsmethode. Außerdem könnte dieser Assay eine Aussage darüber geben, ob LAGLIDADG-HE zusammen mit ihren Erkennungssequenzen als Repressoren wirken könnten und z.B. Transkriptionsfaktoren daran hindern, „unvorteilhafte“ Gene zu transkribieren.

.



## 2. Material & Methoden

### 1. Material & Methoden

#### 2.1 Material

##### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tab. 2.1 aufgeführt und haben den Reinheitsgrad *pro analysi*. Zum Ansetzen aller Lösungen wurde Reinstwasser verwendet, das über ein *Milli-Q Synthesis* Wasseraufbereitungssystem der Firma *Millipore* entnommen wurde.

**Tab. 2.1: Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP	Hartmann Analytic
40%Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	AppliChem
Agar	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Aluminiumsulfat	AppliChem
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Bradford Coomassi blue dye G-250	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
BSA	Fermentas
Chloramphenicol	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G250	AppliChem
DMF	Merck
DMSO	Merck
dNTPs	Fermentas
DTT	AppliChem
EDTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Glucose	AppliChem

## 2. Material & Methoden

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem
Imidazol	AppliChem
IPTG	AppliChem
Kanamycin	AppliChem
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumglutamat	Merck
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Ni <sup>2+</sup> NTA-Agarose	Roth
Poly (dI-dC)	Sigma Aldrich
Phosphorsäure	Roth
L(+)-Rhamnose	AppliChem
Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
SDS	Roth
TEMED	AppliChem
Tetracyclin	AppliChem
Tris	AppliChem
Trypton	AppliChem
Xylencyanol	Merck

### 2.1.2 Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits aus Tab. 2.2 wurden jeweils, wie vom Hersteller in der Anleitung beschrieben eingesetzt.

## 2. Material & Methoden

**Tab. 2.2: Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
Winzard <sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega	Plasmidpräparation im Mini-Maßstab
Winzard <sup>®</sup> Plus SV Midiprep DNA Purification System	Promega	Plasmidpräparation im Midi-Maßstab
Winzard <sup>®</sup> Plus SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	Aufreinigung von PCR-Ansätzen und Restriktionsspaltungen

### 2.1.3 Säulen

Affinitätschromatographie Ni<sup>2+</sup>NTA-Agarose *column* von Roth

Affinitätschromatographie HiTrap<sup>™</sup> Heparin HP *column* von GE Healthcare

### 2.1.4 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tab. 2.3 gelistet. Weitere in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tab. 2.4 aufgelistet und wurden mit den jeweils mitgelieferten Puffern und nach Herstellerangaben benutzt. Die Restriktionsenzyme des Herstellers *Thermo* wurden teilweise in ihrer FastDigest<sup>™</sup>-Version mit entsprechendem Puffer angewendet.

**Tab. 2.3: Restriktionsenzyme**

<b>Restriktionsenzym</b>	<b>Erkennungssequenz (5'-3')</b>	<b>Hersteller</b>
AatII	GACGT C	NEB
AlwNI	CAGNNN CTG	Thermo
BamHI	G GATCC	Thermo
BglII	A GATCT	Thermo
Bsu36I	CC TNAGG	Thermo
EagI	C GGCCG	Thermo
HindIII	A AGCTT	Thermo
HpaI	GTT AAC	Thermo

## 2. Material & Methoden

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz (5'-3')	Hersteller
KpnI	GGTAC C	Thermo
MluI	A CGCGT	Thermo
NcoI	C CATGG	Thermo
NdeI	CA TATG	Thermo
NheI	G CTAGC	Thermo
NsiI	ATGCA T	Thermo
PstI	A CATGT	NEB
PstI	CTGCA G	NEB
PvuII	CAG CTG	Thermo
XbaI	T CTAGA	Thermo
XhoI	C TCGAG	Thermo

**Tab. 2.4: Andere verwendete Enzyme**

Name	Hersteller
CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase)	Thermo
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Eigenherstellung
T4-DNA-Ligase	Thermo
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eigenherstellung
T4-PNK (Polynukleotid Kinase)	Thermo
<i>Mung bean</i> -Nuklease	NEB

### 2.1.5 Primer/Oligonukleotide

Die in der Arbeit genutzten Primer und Oligonukleotide sind aufgeteilt in Mutageneseprimer (Tab. 2.4), SOEing-Primer (Tab. 2.5), *screening*-Primer (Tab. 2.6), Oligos (Tab. 2.7) und in die allgemeinen Primer (Tab. 2.8). Dabei sind jeweils die Namen, die Sequenz und die genauere Anwendung der Oligonukleotide beschrieben.

## 2. Material & Methoden

Die Megaprimer, die in der *rolling circle-PCR* (siehe 2.2.8.2) verwendet wurden, wurden aus der in Tab. 2.4 beschriebenen Mutageneseprimer und jeweils einem allgemeinen Primer hergestellt. Die *SOEing*-Primer (Tab. 2.5) wurden in der sogenannten *SOEing-PCR* (siehe 2.2.1.8.3), die *screening*-Primer (Tab. 2.6) in einer *screening-PCR* (siehe 2.2.1.8.1), die verwendeten Oligos (Tab. 2.7) wurden durch Annealing (siehe 2.1.7) zum Klonieren an einen Vektor hybridisiert und die allgemeinen Primer (Tab. 2.8) wurden in der standard-PCR (siehe 2.2.8) verwendet.

**Tab. 2.4: Mutageneseprimer**

<p><u>CrAluN20</u> 5' CTACTTAGCTGGGTTTGTAGACGGTAACGGTAGCATAATCG 3' Mutageneseprimer (<i>sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für AluI, gepaart mit CRRevN zur Mutagenese von D20N in I-Crel bzw. zur Herstellung von I-Cre<sup>t</sup>.</p>
<p><u>CrN20AluS19</u> 5' CTACTTAGCTGGGTTTGTAGACTCTAACGGTAGCATAATCG 3' Mutageneseprimer (<i>sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für AluI, gepaart mit CrRevN zur Mutagenese von G19S und D20N gleichzeitig in I-Crel, bzw. zur Herstellung von I-Cre<sup>t</sup>G19S.</p>
<p><u>CrPvuK32</u> 5' CTAATCAGAAATATAAATTTAAGCATCAGCTGTCACTCAC 3' Mutageneseprimer (<i>sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für PvuII, gepaart mit CrRevN zur S32K-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>
<p><u>CrHpaC33-2</u> 5' CAGTCTTGCAAATTTAAGCATCAGCTATCGTTAACGTTCCAAG 3' Mutageneseprimer (<i>sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für HpaI, gepaart mit CrRevN zur Y33C-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>
<p><u>CrXbaN47</u> 5' GTCACGAACAAGACACAGAGACGTTGGTTTCTAGACAAATTAG 3' Mutageneseprimer (<i>sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für XbaI, gepaart mit CrRevN zur Q47N-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>
<p><u>CrNheA98</u> 5' CTAAATTTGCTTGTTTTTGCGCTAGCTTTAGAAAAG 3' Mutageneseprimer (<i>anti-sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für NheI, gepaart mit CrCfor zur K98A-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>

## 2. Material & Methoden

<p><u>CrMluA138</u></p> <p>5' GAAGTTGTTTTACGTGTCTTCGCATCATT CAG 3'</p> <p>Mutageneseprimer (<i>anti-sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für MluI, BsaAI und Ppu21I, gepaart mit CrCfor zur S138A-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>
<p><u>CrCAatIIM139</u></p> <p>5' CGGTTTCAGACGTCGTTTTACGCGTCATCGAATCATT C 3'</p> <p>Mutageneseprimer (<i>anti-sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für AatII und Zral, gepaart mit CrCfor zur K139M Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>
<p><u>CrKpnG142</u></p> <p>5' GTTTCAGAAAGTGGTACCACGCGTCTTCGAAT C 3'</p> <p>Mutageneseprimer (<i>anti-sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für KpnI, gepaart mit CrCfor zur K142G-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) des Fusionsproteins Sce*<sub>2</sub>Cre*.</p>
<p><u>CrKpnG142-2</u></p> <p>5' GTTTCAGAAAGTGGTACCACGCGTCATCGAAT C 3'</p> <p>Mutageneseprimer (<i>anti-sense</i>) mit Restriktionsschnittstelle für KpnI, zur K142G-Mutagenese im Spaltmodul (I-Crel) der Fusionsprotein Variante Sce*<sub>2</sub>Cre*K139M.</p>

**Tab. 2.5: SOEing Primer**

<p><u>G177</u></p> <p>5' GGAAGCATGCATGCGCCCAATACGCAAACCGCCT C 3'</p> <p>LacZ-Oligo mit insertierter NsiI-Restriktionsschnittstelle (<i>sense</i>) gepaart mit G178-Primer von Vektor pUC19 bzw. zum Klonieren der HS von pEG3-Cret. Gepaart mit G218-Primer stellt es die N-terminale Region des lacZ-Fragmentes für die lac-Operon-Deletion für pLCL3-NOOP her.</p>
<p><u>G218</u></p> <p>5' AGCTGTTTCCTGTGGATCCACACAACATACgagccgg 3'</p> <p>SOE-Oligo (<i>anti-sense</i>; gagccgg stellen die Überhänge des Primers dar) für die lac-Operon-Deletion gepaart mit G219 Primer von Vektor pUC19. Gepaart mit dem G177-Primer stellt es die N-terminale Region pLCL3-NOOP her.</p>
<p><u>G219</u></p> <p>5' GTATGTTGTGTGGATCCACAGGAAACAGCTatgacc 3'</p> <p>SOE-Oligo (<i>sense</i>; atgacc stellen die Überhänge des Primers dar) für die lac-Operon-Deletion gepaart mit G218-Primer von Vektor pUC19. Gepaart mit W1430-Primer stellt es die C-terminale Region von pLCL3-NOOP her.</p>

## 2. Material & Methoden

### W1430

5' GCGATTAAGTTGGGTAACGC 3'

Primer (*anti-sense*) gepaart mit G219 stellt es die C-terminale Region von pLCL3-NOOP her. Außerdem *screening*-Primer gepaart mit W1434 wird für pHAL-HSCR ein 263 Bp, für pHAL-LACO 239 Bp und für pLCL3-NOOP ein 212 Bp großes Fragment erwartet.

### **Tab. 2.6: Screening Primer**

### W1434

5' GCTCACTCATTAGGCACCC 3'

*Screening*-Primer (*sense*) in Verbindung mit W1430 wird für pHAL-HSCR ein 263 Bp, für pHAL-LACO 239 Bp und für pLCL3-NOOP ein 212 Bp großes Fragment erwartet.

### ScrLacO

5' GGAATTGTGAGCGGATAACA 3'

Primer (*sense*) zum *screening* in Verbindung mit ScrT7ter in pRSFDuet-I.

### ScrT7ter

5' CTCAAGACCCGTTTAGAGGC 3'

Primer (*anti-sense*) zum *screening* in Verbindung mit ScrLacO in pRSFDuet-I.

### ScrXho

5' CATGCGCTCGAGTTTCAGGAACTTTCGGAGGAGA 3'

Primer (*anti-sense*) mit Restriktionsschnittstelle für XhoI, zum Klonieren in pET-24a.

### **Tab. 2.7: Oligos**

### G221

5' GATCGAATTGTGAGCGGATAACAATTT 3'

Oligo für *lac* Operator (*sense*) mit BamHI bzw. BglII kompatiblen Enden; durch Annealing mit G222 Oligo und Klonieren in die pLCL3-NOOP BglII Seite wird pLCL3-LACO hergestellt. Außerdem *screening*-Primer kombiniert mit SceT7ter wird bei pLCL3-LACO ein 513 Bp großes Fragment erwartet.

### G222

5' GATCAAATTGTTATCCGCTCACAATTC 3'

Oligo für *lac* Operator (*anti-sense*) mit BamHI bzw. BglII kompatiblen Enden; durch Annealing mit G221 Oligo und Klonieren in die pLCL3-NOOP BglII Seite wird pLCL3-LACO hergestellt.

### HSCRfor

5' GAGGATCAAACGTCTCACGACGTTTTGATC 3'

Oligo (*sense*) für HS I-Crel; durch Annealing mit HSCRrev zum Klonieren in pLCL3-NOOP wird pLCL3-HSCR hergestellt.

## 2. Material & Methoden

### HSCRrev

5' CTAGTTTGACAGAGTGCTGCAAAGTAGGTG 3'

Oligo (*anti-sense*) für HS I-Cre<sup>t</sup>; durch Annealing mit HSCRfor zum Klonieren in pLCL3-NOOP wird pLCL3-HSCR hergestellt

### **Tab. 2.8: Allgemeine Primer**

#### Go87

5' TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG 3'

HS Cre<sup>t</sup> Oligo (*sense*), kombiniert mit G226 von pEG3-Cre<sup>t</sup> um pLG-Cre<sup>t</sup> herzustellen.

#### G178

5' GGCGCGTCAGCGGGTGTGGC 3'

*LacZ* Oligo (*anti-sense*) kombiniert mit G177 Primer zum amplifizieren der *lacZ*-Kassette von Vektor pUC19 zum Herstellen von pLCL3, bzw. zum Herstellen der HS (pLCL3-HSCR) oder des Operators (pLCL3-LACO) zum Klonieren der pHAL3-Vektoren.

#### G220

5' ACCCGGAGATCTTCTAGAGTCGACCTGCAGG 3'

Mutageneseprimer (*anti-sense*), beseitigt BamHI Restriktionsschnittstelle von *lacZ*-Kassette kombiniert mit G221 Primer insertiert er eine stille Mutation (GAC to GAA) und stellt die Restriktionsschnittstelle BglII her.

#### G226

5' TACCCAAGCTTGCATGCCGATC 3'

HS Cre<sup>t</sup> Oligo (*anti-sense*), kombiniert mit G87 von pEG3-Cre<sup>t</sup> um pLG-Cre<sup>t</sup> herzustellen.

#### CrNco

5' CGATCCATGGATTCGAGCACAAAATATAATAAAGAG 3'

Primer (*sense*) mit Restriktionsschnittstelle für NcoI kombiniert mit CrXho zum Klonieren von I-Cre<sup>t</sup> in pRSFDuet-1 und Herstellen von pRG-Cre<sup>t</sup>.

#### CrXho

5' GCATCTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCCG 3'

Primer (*anti-sense*) mit Restriktionsschnittstelle für XhoI kombiniert mit CrNco zum Klonen von I-Cre<sup>t</sup> in pRSFDuet-1 und Herstellen von pRG-Cre<sup>t</sup>.

#### E013

5' CTCCCGGAGACGGTCACAGC 3'

Primer (*anti-sense*) für pDMHS-SCS, kombiniert mit E016 erstellt er die spezifische Zielsequenz SCS für ein 370 Bp großes Fragment (SCS-370), von pDMHS-C ein 334 Bp großes Fragment (C-334) für die unspezifische Zielsequenz für Aktivitäts- und Bindungs-Test her. Kombiniert mit IQE stellt er ein 790 Bp großes Fragment (SCS-790) mit spezifischer Zielsequenz für *competition* Tests und gepaart mit E014 stellt er aus pDMHS-CS ein 305 Bp großes Fragment (CS-305) mit unspezifischer Zielsequenz für *competition* Tests her.



## 2. Material & Methoden

### E014

5' GTAATAGCGAAGAGGCCCGC 3'

Primer (*sense*) für pDMHS-CS, kombiniert mit E015 erstellt es die unspezifische Zielsequenz CS für ein 357 Bp Fragment zum Testen der Protein Aktivität und Bindung, in Kombination mit E013 stellt er aus pDMHS-CS ein 305 Bp großes Fragment (CS-305) mit unspezifischer Zielsequenz für *competition* Tests her.

### E015

5' CTTTCGTCTCGCGCGTTTCG 3'

Primer (*anti-sense*) für pDMHS-CS, kombiniert mit E014 erstellt er die unspezifische Zielsequenz (CS-357), für Tests der Protein Aktivität und Bindung, mit einem 357 Bp großen Fragment her.

### E016

5' CAACTTAATCGCCTTGCAGC 3'

Primer (*sense*) für pDMHS-SCS, kombiniert mit E013 erstellt er die spezifische Zielsequenz mit einem 370 Bp großem Fragment (SCS-370), von pDMHS-C ein 334 Bp großes Fragment (C-334) für die unspezifische Zielsequenz für Aktivitäts- und Bindungstests her.

### IQE

5' CGCTCCTTCGCCTTCTCGCGGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC 3'

Primer (*anti-sense*) für pDMHS-SCS kombiniert mit E013 stellt er ein 790 Bp großes Fragment (SCS-790) mit spezifischer Zielsequenz für *competition* Tests her.

### CrRevN

5' GACGGAAGTTGTTCAATAATTTTTAAACTAAATTTGCTTG 3'

Primer (*anti-sense*) zur Mutagenese von I-CreI bzw. I-Cre<sup>f</sup> und zur Mutagenese des Schneide-Moduls (I-CreI) im Fusionsprotein Sce\*<sub>2</sub>Cre\*am C-terminalen Ende.

### CrCfor

5' CAAAAGACACAGAGACGTTGGTTTTAGACAAATTAG 3'

Primer (*sense*) zur Mutagenese des Schneide-Moduls (I-CreI) im Fusionsprotein Sce\*<sub>2</sub>Cre\*am C-terminalen Ende.

### 2.1.6 Plasmide

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Plasmiden gearbeitet.

#### pEG3-Cre

Dieses Plasmid ist ein Derivat aus pUC19 und pET28a und fungiert als Expressionsvektor, der das Gen für das I-CreI Monomer (498 Bp) mit C-terminalem His-Tag (6xHis) trägt. Das Gen steht unter Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren, der des *lac*-Promotors [109] und dem nachgeschalteten T7-Promotor [110], um eine höhere Expression der HE erzielen zu können. Das Plasmid trägt einen

## 2. Material & Methoden

pUC ori (pMBI Replikationsursprung) und ein Ampicillin-Resistenzgen und ist 3.311 Bp groß.

### pEG3-Sce\*<sub>2</sub>Cre\*

Dieses Plasmid kodiert für das Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Monomer (1.218 Bp), welches aus einem I-SceI Monomer (726 Bp), aus einem I-TevI-linker (18 Bp; mit der DNA-Sequenz: AAGAGCAAATCTCCGGA) und einem I-CreI-Monomer (474 Bp) besteht. Es hat die gleichen Eigenschaften wie pEG3-Cre und ist 4.031 Bp groß.

### pDMHS-SCS

Dieses Plasmid beinhaltet die spezifische Erkennungssequenz SCS für das Fusionsprotein Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und dessen Varianten. Die spezifische Erkennungssequenz besteht aus einer I-CreI-Bindungsstelle (pink), welche von beiden Seiten von jeweils einer I-SceI-Bindestelle (grün) flankiert wird (siehe auch Abbildung 3.2). Außerdem besitzt es ein Ampicillin-Resistenzgen und ist 2.822 Bp groß. An der Position 643 ist die Spaltstelle für Cre\*<sub>2</sub>Cre\* einkloniert. Es dient als Substratplasmid für die Aktivitäts- und Bindungstests.

SCS-Erkennungssequenz:

TAGGGATAACAGGGTAATCGAAACTGTCTCAGACGTTTGCATTACCCTGTTATCCCTA

### pDMHS-CS

Dieses Plasmid beinhaltet die unspezifische Erkennungssequenz CS von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und dessen Varianten. Die unspezifische Erkennungssequenz CS besteht aus einer I-CreI-Bindungssequenz und einer folgenden I-SceI-Bindungsstelle und setzt sich zu 2/3 aus der spezifischen Sequenz SCS (siehe Abbildung 3.2) zusammen. Das Plasmid ist 2.800 Bp groß und ist ansonsten identisch zu pDMHS-SCS. An der Position 643 ist die Spaltstelle für Sce\*<sub>2</sub>Cre\* einkloniert und dient als unspezifisches Substratplasmid für die Aktivitäts- und Bindungstests.

### pATHS-C

Dieses Plasmid beinhaltet die unspezifische Erkennungssequenz C von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und dessen Varianten. Die unspezifische Erkennungssequenz C besteht aus einer I-CreI-Bindungssequenz und setzt sich somit zu 1/3 aus der spezifischen Sequenz SCS (siehe Abbildung 3.2) zusammen. Außerdem besitzt es ein Ampicillin-Resistenzgen und ist 3.682 Bp groß. An der Position 1.396 ist die Spaltstelle für I-CreI

## 2. Material & Methoden

einkloniert und dient als unspezifisches Substratplasmid für die Aktivitätstests mit linearisiertem Plasmid (2.2.3.5.1).

### pDMHS-C

Dieses Plasmid beinhaltet die unspezifische Erkennungssequenz C von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und dessen Varianten. Die unspezifische Erkennungssequenz C besteht aus einer I-CreI-Bindungsstelle und setzt sich somit zu 1/3 aus der spezifischen Sequenz SCS (siehe Abbildung 3.2) zusammen. Das Plasmid ist 2.786 Bp groß und ist ansonsten identisch zu pDMHS-SCS. An der Position 631 ist die unspezifische Spaltstelle C für Cre\*<sub>2</sub>Cre\* einkloniert und dient als Matrize zur Amplifikation von DNA-Fragmenten ( 2.2.3.5.2 und 2.2.3.6) für Aktivitäts- und Bindungstests.

### pUC19

Dieser Klonierungsvektor von NEB trägt eine *lacZ*-Kassette, die in den Vektor pLCL3 kloniert wurde und den *high copy ori* pMB1, der zur Klonierung von pHAL3-HSCR und pHAL3-LACO verwendet wurde. Er besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen und ist 2.686 Bp groß.

### pLACI

Das Plasmid der Firma Novagen enthält die Sequenz für den *lac*-Repressor (*lacI*) und wurde für Kontrolltests im Bindungs-Assay eingesetzt. Es ist 3.813 Bp groß und besitzt ein Chloramphenicol-Resistenzgen.

### pRSF-Duet1

Das Plasmid der Firma Novagen kodiert für die Sequenz des *lac*-Repressors (*lacI*) und eines Kanamycin-Resistenzgens. Es ist 3.829 Bp groß und besitzt einen *middle copy ori* RSF1030 und wird zum Klonieren des Endo-Plasmids pRG3-Cre verwendet.

### pACYC184

Das Plasmid der Firma NEB enthält die Sequenz für eine Tetracyclin- und Chloramphenicol-Resistenz und den *low copy ori* p15A. Er ist 4.245 Bp groß und wurde zum Klonieren von pLCL3 verwendet.

## 2. Material & Methoden

### 2.1.7 Marker

Die in dieser Arbeit benutzten Marker wurden für die DNA- bzw. Protein-Gelelektrophorese verwendet und sind in Tab. 2.8 aufgelistet.

**Tab. 2.10: Verwendete DNA und Protein Marker**

Marker	Hersteller
Page Ruler™ Unstained Protein <i>ladder</i>	Fermentas
pUC MixMarker, 8	Fermentas
Gene Ruler™ 1kb DNA <i>ladder</i>	Fermentas

### 2.1.8 *E. coli*-Stämme

Verschiedenen *E. coli*-Stämme wurden zum Klonieren und Amplifizieren von Plasmiden sowie zur Expression der auf den Plasmiden kodierten Proteine herangezogen. Im Weiteren dienten sie für die *in vivo*-Selektion (Bindungs-Assay). Die einzelnen verwendeten Bakterienstämme werden im Folgenden näher beschrieben.

#### XL10gold

Genotyp: *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> F'[proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]*.

#### XL1blue

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96(nalR) thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]*.

#### DH5α

Genotyp: *F. endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ8odlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub>-m<sub>K+</sub>), λ-*.

#### KRX

Genotyp: *[F', traD36, ΔompP, proA+B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal<sup>r</sup>), thi-1, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase*.

## 2. Material & Methoden

### Turbo

Genotyp: *F'* *proA+B+lacIq*  $\Delta$ *lacZM15/ fhuA2*  $\Delta$ (*lac-proAB*) *glnV gal R(zgb-210::Tn10)Tets endA1 thi-1*  $\Delta$ (*hsdS-mcrB*)<sub>5</sub>.

### 2.1.9 Puffer und Medien

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Medien ist den nachfolgenden Tabellen (Tab. 2.11 und Tab. 2.12) zu entnehmen.

**Tab. 2.11: Verwendete Puffer und Lösungen**

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
10x T-Puffer 500	10 mM Tris-HCl pH 9, 1 mg / ml BSA, 500 mM NaCl)
10x T-Puffer 800	10 mM Tris-HCl pH 9, 1 mg / ml BSA, 800 mM NaCl)
10x T-Puffer X	10 mM Tris-HCl pH 9, 1 mg / ml BSA (X= 100, 200, 300, 400, 600, 700, 900 mM NaCl)
10x KGB-Puffer	1 M Kaliumglutamat, 250 mM Tris-Acetat pH 7,5, 100 mM Magnesiumacetat, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 µg/ ml BSA
10x KGBB-Puffer	1 M Kaliumglutamat, 250 mM Tris-Acetat pH 7,5, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 µg / ml BSA, 5 mM EDTA pH 8, 10 mM DTT, 10 % Glycerin
6x DNA-Auftragspuffer	120 mM EDTA pH 8, 3 % SDS, 30 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol
5x Protein-Auftragspuffer	300 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol, 25 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat pH ~8,3, 100 mM EDTA
10x SDS-Puffer	25 mM Tris pH ~8,3, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
10x TB( <i>low</i> )E-Puffer	900 mM Tris-Borsäure pH ~8,3, 1 mM EDTA
Kolloidales Coomassi	0,1 % Coomassie Blue-G 250, 2 % Phosphorsäure,
I-Crel und <i>Sce</i> <sup>*</sup> <sub>2</sub> <i>Cre</i> <sup>*</sup> His6-Tag Lyse/Binde-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 5 % Glycerin
I-Crel und <i>Sce</i> <sup>*</sup> <sub>2</sub> <i>Cre</i> <sup>*</sup> His6-Tag Wasch-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % Glycerin
<i>Sce</i> <sup>*</sup> <sub>2</sub> <i>Cre</i> <sup>*</sup> Varianten His6-Tag Lyse/Binde-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8, 750 mM NaCl, 5 % Glycerin

## 2. Material & Methoden

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Sce* <sub>2</sub> Cre* Varianten His6-Tag Wasch-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 5 mM Imidazol, 5 % Glycerin
His <sub>6</sub> -Tag Elution-Puffer und Heparin/ Äquilibrierungs-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 1 mM DTT, 5 % Glycerin, 0,05 % Tween 20
Heparin Wasch-Puffer 1	10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 1 mM DTT, 5 % Glycerin
Heparin Wasch-Puffer 2	10 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 5 mM Imidazol, 1 mM DTT, 5 % Glycerin
Heparin Elutions-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8, 2 M NaCl, 300 mM Imidazol, 1 mM DTT, 5 % Glycerin
I-Crel und Varianten Dialyse-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % Glycerin
Sce* <sub>2</sub> Cre* und Varianten Dialyse-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % Glycerin, 0,05 % Tween 20

**Tab. 2.12: Verwendete Medien**

<b>Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Luria Bertani (LB)-Medium	1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, pH 7,5
SOC-Medium	2 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,0

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Analyse ist eine wichtige Methode zur Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten, zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionsspaltungen sowie zur Auswertung von Aktivitätstests der HE. Die Auftrennung doppelsträngiger DNA ist in einem Molekularbereich von 200 bis

## 2. Material & Methoden

20.000 Bp möglich, je nach Wahl der Agarosekonzentration. In dieser Arbeit werden 1%ige Agarosegele in 1x TAE als Laufpuffer verwendet. Die DNA-Proben werden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 10 V/cm für eine Stunde mittels Elektrophorese aufgetrennt. Danach wird das Agarosegel in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) inkubiert und in 1x TAE-Puffer gewaschen, damit die Banden deutlicher zu erkennen sind. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA. Dadurch verändert sich das Emissionsspektrum von Ethidiumbromid und die DNA-Banden im Gel können mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems als Bild gespeichert werden.

### 2.2.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und die Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid, dabei bestimmt die Acrylamidkonzentration im Polymerisationsansatz die Länge der Polyacrylamidketten, die aufgetrennt werden können. Deswegen können durch die Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese kleinere DNA-Moleküle (< 1.000 Bp), als bei der Agarose-Gelelektrophorese, der Größe nach vertikal aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden die DNA-Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in einem 5%igen Polyacrylamidgel (in 1x TBE, Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1) unter Verwendung von 1x TB(*low*)E als Laufpuffer durch Elektrophorese bei 27 V/cm für 45 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel entsprechend der Agarose-Gelelektrophorese in Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht mit Hilfe des Geldokumentationssystems als Bilddatei gespeichert.

### 2.2.1.3 Plasmid/DNA-Reinigung

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mit Hilfe von Kits durchgeführt. Je nach Anwendung fand entweder eine Plasmid-Mini-Präparation oder eine Plasmid-Midi-Präparation statt, wobei jeweils entsprechend den Herstellerangaben verfahren wurde. Das Prinzip dieser Plasmid-Isolierungs-Kits basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für geringe Mengen an Plasmid fand eine Plasmid Mini-Präparation (6 ml *E. coli*-Kultur) mit dem *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* der Firma *Promega* statt. Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Plasmid-Midi-Präparation (250 ml *E. coli* Kultur) mit

## 2. Material & Methoden

Hilfe des *Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System* der Firma *Promega* durchgeführt.

### 2.2.1.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch Restriktionsspaltung entstandene DNA-Fragmente eines Plasmids wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.1) aufgetrennt. Allerdings wurden die Taschen für das Auftragen der Proben vergrößert und kein Standardmarker verwendet. Das jeweilige Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Agarosestück mittels *Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System* laut Anleitung gereinigt. Amplifizierte PCR-Fragmente wurden lediglich mit diesem Kit gereinigt.

### 2.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte durch photometrische Messung mit einem NanoDrop-Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH) im Wellenlängenbereich von 220 bis 320 nm.

Aus dem Absorptionsmaximum von DNA, bei 260 nm, kann die DNA-Konzentration ermittelt werden, wobei für hochmolekulare DNA ein  $A_{260\text{ nm}}$ -Wert von 1 etwa 50 ng DNA/ $\mu\text{l}$  entspricht. Der Reinheitsgrad von DNA lässt sich durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmen. Das Verhältnis von  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  sollte für reine DNA idealerweise zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, größere Werte auf Verunreinigung mit RNA.

### 2.2.1.6 DNA-Restriktionsspaltung

In dieser Arbeit wurden sowohl präparative, als auch analytische Restriktionsspaltungen von DNA durchgeführt. Bei der präparativen Restriktionsspaltung wurden Restriktionsenzyme als Werkzeuge für die Klonierung neuer DNA-Fragmente eingesetzt. Je nach entsprechendem Enzym (normal oder in ihrer *FastDigest™*-Version) wurde laut Herstellerempfehlungen vorgegangen. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend über das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*-Kit der Firma *Promega* gereinigt. Bei der analytischen Restriktionsspaltung kann verifiziert werden, dass ein neu generiertes Plasmid oder



## 2. Material & Methoden

das jeweilige PCR-Produkt korrekt ist. Hierbei wurde die DNA durch spezifische Spaltung mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend die Spaltprodukte durch Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Dabei lässt die Größe der Spaltprodukte Rückschlüsse auf das verdaute Ausgangsmaterial zu.

### 2.2.1.7 Annealing von Oligonukleotiden

Durch das Hybridisieren von zwei komplementären Oligonukleotiden (Tab. 2.7) von *single stranded* DNA (ssDNA) kann man im Thermocycler *double stranded* DNA-Fragmente (dsDNA) erzeugen. Diese Oligonukleotide können anschließend in einen Vektor eingebracht werden.

Um in der vorliegenden Arbeit pLCL3-LACO und pLCL3-HSCR aus dem Vektor pLCL3-NOOP herstellen zu können, wurden jeweils zwei Oligonukleotide (*sense* und *anti-sense*) im äquimolaren Verhältnis in einem Nidrigsalzpuffer (10 mM Tris pH 8.0) zusammengegeben. Wobei die Konzentration an Oligonukleotiden in der Stammlösung je 100 µM betrug. Durch Aufheizen auf 95 °C für 5 min und langes Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die beiden Stränge hybridisiert und durch ein 5%iges Polyacrylamidgel auf korrektes Hybridisieren getestet.

### 2.2.1.8 PCR

Mit der *polymerase chain reaction* (PCR)-Methode, die 1983 von Kary Mullis entwickelt wurde, kann doppelsträngige DNA wiederholt repliziert und somit amplifiziert werden [111]. Für Amplifizierungen, die zum Klonieren, oder für die zielgerichtete Mutagenese von Genen verwendet wurden, wurde die *Pfu*-Polymerase mit „*proof reading*“-Funktion verwendet und für alle anderen Anwendungen wurde die *Taq*-Polymerase benutzt. Die PCR gliedert sich in drei Schritte. Zunächst werden die dsDNA-Moleküle durch einen Temperaturanstieg auf 94°C denaturiert. Danach erfolgt eine Abkühlung auf 52°C und es kommt zum Annealing der Primer. Die Annealing-Temperatur der Primer ist so gewählt, dass sie etwa 2-3°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt. Kommt es bei den eingesetzten Primern zu Abweichungen in der Schmelztemperatur, kann dies zu mangelnder oder unspezifischer Primerbindung führen. Die Annealing-Temperatur der verwendeten Primer lässt sich durch den G/C- bzw. A/T-Gehalt ermitteln [112]. Die anschließende Extension bzw. Replikation des von den Primern flankierten DNA-Abschnitts findet

## 2. Material & Methoden

bei einer Temperatur von 72°C statt. Die Dauer der Replikation für das zu amplifizierende DNA-Fragment lässt sich hierbei durch die Geschwindigkeit der verschiedenen Polymerasen relativ einfach berechnen. Dabei gilt für *Taq*-Polymerase 1.000 Bp/min und für *Pfu*-Polymerase 500 Bp/min.

Die drei Phasen werden 20 - 30 mal wiederholt. Nach erfolgter PCR wird 1/10 Vol. des Ansatzes mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Richtigkeit des PCR-Produktes überprüft und bei einer Klonierung die amplifizierte DNA über ein Agarosegel und mit *Wizard® SV Gel* oder *PCR Clean-Up System*-Kit (Promega) gereinigt.

Im Folgenden sind der Standard-PCR-Ansatz und das Standard-PCR-Programm der *Pfu*- und der *Taq*-Polymerase aufgeführt:

	<u><i>Pfu</i>-Polymerase</u>	<u><i>Taq</i>-Polymerase</u>
<b>PCR-Ansatz 50µl:</b>	100 ng DNA-Matrize 400 nM <i>sense</i> Primer 400 nM <i>anti-sense</i> Primer 250 µM dNTPs 1 x <i>Pfu</i> -Puffer 1 U <i>Pfu</i> -Polymerase ad. 50 µl Wasser	100 ng DNA-Matrize 400 nM <i>sense</i> Primer 400 nM <i>anti-sense</i> Primer 250 µM dNTPs 1 x <i>Taq</i> -Puffer 1 U <i>Taq</i> -Polymerase ad. 50 µl Wasser
<b>PCR-Programm:</b>	<u><i>Pfu</i>-Polymerase</u> 1. 94°C 2 min 2. 94°C 45 sek 3. 52°C 30 sek 4. 72°C 90 sek 5. 72°C 5 min 6. 4°C Pause	<u><i>Taq</i>-Polymerase</u> 1. 94°C 2 min 2. 94°C 45 sek 3. 52°C 30 sek 4. 72°C 45 sek 5. 72°C 5 min 6. 4°C Pause

Die Schritte 2. - 4. werden in den Standardprogrammen der PCR ca. 20-30-mal wiederholt.

### 2.2.1.8.1 *Screening*-PCR

Diese analytische PCR wird für das sogenannte *screening* verwendet (*screening*-PCR). Sie wird angewandt, um korrekte Klone selektieren zu können.

## 2. Material & Methoden

Jeweils ein vermeintlich positiver Klon wird mit einem Zahnstocher gepickt und in 25 µl Wasser resuspendiert. Anschließend wird dieser „Mix“ komplett in den *Taq*-Polymerase-PCR-Ansatz, anstelle der 100 ng DNA-Matrize, gegeben und das PCR-Programm für die *Taq*-Polymerase gestartet. Beim *screening* einer Mutagenese-PCR wurde zusätzlich ein Restriktionsverdau durchgeführt, um mit Hilfe von eingeführten oder vorhandenen Restriktionsschnittstellen und einer genauen Analyse über die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.2) eine Aussage über die Richtigkeit der PCR-Produkte erhalten zu können. Positive Klone wurden in LB-Medium kultiviert, die DNA anschließend durch *Wizard*® *Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) isoliert, zum Sequenzieren geschickt und das Ergebnis mit Hilfe eines Sequenzanalyse-Programmes (Chromas Pro) auf Richtigkeit der DNA-Sequenz überprüft.

### 2.2.1.8.2 *Rolling circle-PCR*

Diese PCR wird verwendet, um auf DNA-Basis einen zielgerichteten Austausch an Aminosäureresten vorzunehmen. In einer vorgeschalteten PCR wird mit Hilfe eines Mutagenese-Primers und eines Standard-Primers in einer Standard-PCR unter Nutzung der *Pfu*-Polymerase ein Megaprimer hergestellt. Dieser wird durch Auftragen auf ein 1%iges Agarosegel mit anschließender Verwendung des *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System-Kits* (Promega) gereinigt und anschließend die DNA-Konzentration bestimmt. Der doppelsträngige Megaprimer dient als Startpunkt und fungiert als *sense*- und *anti-sense*-Primer für die *Pfu*-Polymerase, um das Ziel-Plasmid mit beiden Strängen zu amplifizieren. Deswegen wird in die Reaktion der *rolling circle-PCR* auch die doppelte Menge an Primer gegeben. Im Folgenden ist der Ansatz und das Protokoll für eine Übersicht der *rolling circle-PCR* aufgezeigt:

<b>PCR-Ansatz</b> (50µl):	100 ng	DNA-Matrize
	800 nM	Megaprimer
	250 µM	dNTPs
	1 x	<i>Pfu</i> -Puffer
	1 U	<i>Pfu</i> -Polymerase
		ad. 100 µl Wasser

## 2. Material & Methoden

<b>PCR-Programm:</b>	1. 94°C	5 min
	2. 94°C	1 min
	3. 60°C	50 sek
	4. 72°C	15 min
	5. 72°C	20 min
	6. 4°C	Pause

Die Schritte 2. - 4. werden ungefähr 30-mal wiederholt.

Nach erfolgter PCR wird 1/10 Vol. des Ansatzes mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese auf Richtigkeit des entstandenen Plasmids überprüft. Mit dem restlichen Teil des Ansatzes wird ein Restriktionsverdau mit DpnI vorgenommen, um die ursprüngliche, methylierte DNA zu degradieren. Anschließend wird der komplette Ansatz mit Verwendung des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*-Kits (Promega) gereinigt.

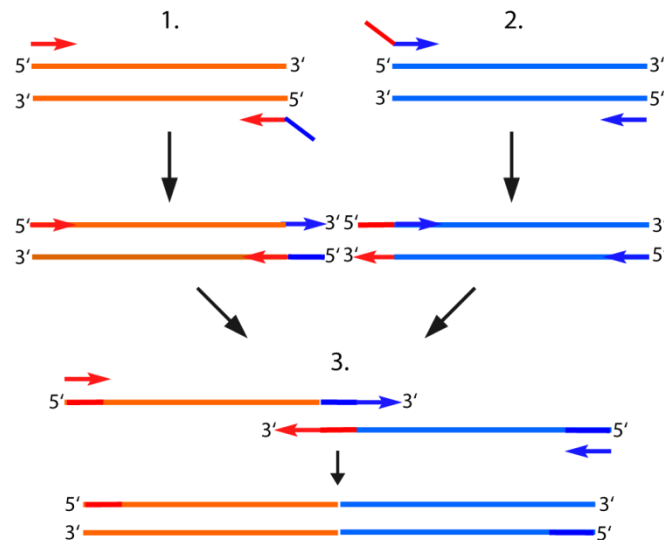
### 2.2.1.8.3 SOEing-PCR

Die SOEing-PCR (*splicing by overlap extension*) [113, 114] ist eine PCR-Variante um Restriktionsschnittstellen, Mutationen oder aber Deletionen in oder in die Nähe eines Genes einzubringen. In dieser Arbeit wurde so mit Hilfe der SOEing-PCR die Operatorsequenz aus der *lacZ*-Kassette entfernt. Dafür wurden insgesamt drei PCRs durchgeführt (siehe Abbildung 2.1). Als erstes wurden in zwei Standard-PCRs mit *Pfu*-Polymerase, unter Nutzung der Primer G177 und G218, das 5'-Ende und mit den Primern G219 und W1430 das 3'-Ende des *lacZ*-Gens amplifiziert und so die Operator-Region ausgespart.

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels eines Agarosegels und mit *Wizard® SV Gel* gereinigt. Nach Bestimmung der Konzentrationen der beiden DNA-Fragmente fungierten diese als *template* in einer dritten PCR. Diese entstandenen SOEing-Oligos besitzen komplementäre Enden, welche über die Primer G218 sowie G219 eingefügt wurden. Die SOEing-Oligos konnten somit gemäß dem Prinzip einer *overlap extension*-PCR genutzt werden, um einen vollständigen DNA-Doppelstrang zu erstellen [115]. Normalerweise wären für diese PCR die Primer G177 und W1430 herangezogen worden. In diesem Fall wurden jedoch die Primer G177 und G220 verwendet. Denn durch G220 wurde eine stille Mutation in die Restriktionsschnittstelle BamHI in die *lacZ*-Kassette induziert und somit die BamHI-Seite durch die dato nicht vorhandene Restriktionsschnittstelle BglII im

## 2. Material & Methoden

klonierten Plasmid (pLCL3-NOOP) ersetzt. Dies sollte dem Zweck dienen, spätere Klonierungen zu vereinfachen, denn die Restriktionsschnittstelle BamHI ist mehrmals auf dem Klonierungsplasmid enthalten und die geschnittene BamHI-Seite bildet die gleichen kompatiblen 3'-Überhänge wie BglII.



**Abbildung 2.1: Schema der SOEing PCR**

Die SOEing PCR besteht aus drei verschiedenen PCR-Reaktionen. Die ersten beiden Reaktionen (1. + 2.) sind Standard-PCRs mit jeweils einem Standard- (roter bzw. blauer Pfeil) und einem SOEing-Primer (roter Pfeil mit blauem Überhang bzw. blauer Pfeil mit rotem Überhang). Die Überhänge der SOEing-Primer werden von der Polymerase am 3' Ende des komplementären DNA-Stranges aufgefüllt. In der dritten PCR (3.) werden die hergestellten DNA-Fragmente vereint und hybridisieren durch ihre komplementären Überhänge miteinander und durch Extension der 3'Enden entstehen lange Doppelstränge. Durch Zugabe der Standard-Primer aus den ersten beiden PCRs kann das neue Fragment weiter amplifiziert werden.

Lediglich das PCR-Programm der SOEing-PCR zeigt insbesondere eine Abweichung in der Temperatur der Annealing-Phase, die auf 57°C erhöht wurde. Eine weitere Abweichung gegenüber der Standard-PCR zeigt sich in der Länge der Extensionsphase, die bei dieser SOEing-PCR auf 30 sek festgelegt wurde.

<b>PCR-Programm:</b>	1. 94°C	1 min
	2. 94°C	30 sek
	3. 57°C	30 sek
	4. 72°C	30 sek
	5. 72°C	60 sek
	6. 4°C	Pause

Die Schritte 2. - 4. wurden 30-mal wiederholt.

## 2. Material & Methoden

Nach erfolgter PCR wurde 1/10 Vol. des Ansatzes mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Richtigkeit des PCR-Produktes überprüft und die amplifizierte DNA mittels *PCR Clean-Up System*-Kit (Promega) gereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt.

### 2.2.1.8.4 [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP *labeling* PCR

Die PCR-Fragmente mit spezifischer (SCS) und unspezifischer (CS, C) Erkennungssequenz der Fusionsproteine wurden mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP radioaktiv markiert, um die Aktivität oder Bindungseigenschaften der Enzyme sensitiver und quantitativer bestimmen zu können. Im Folgenden sind der Ansatz und das Protokoll für eine Übersicht der PCR für das [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP *labeling* aufgezeigt:

<b>PCR-Ansatz</b> (100 $\mu\text{l}$ ):	50 ng	DNA-Matrize
	200 nM	<i>sense</i> Primer
	200 nM	<i>anti-sense</i> Primer
	250 $\mu\text{M}$	dNTPs
	1 x	<i>Pfu</i> -Puffer
	1 U	<i>Pfu</i> -Polymerase
	1 $\mu\text{M}$	[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP (10 mCi / ml)
	ad. 100 $\mu\text{l}$ Wasser	

<b>PCR-Programm:</b>	1. 95°C	1 min
	2. 95°C	30 sek
	3. 69°C	30 sek
	4. 72°C	46 sek
	5. 72°C	92 sek
	6. 4°C	Pause

Die Schritte 2. - 4. wurden ca. 30-35-mal wiederholt.

Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz auf ein 5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, Nebenprodukte durch Ausschneiden des richtigen Fragments aus dem Gel beseitigt und anschließend unter Verwendung des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*-Kits (Promega) gereinigt. Daraufhin wurde die DNA-Konzentration durch Messung mit einem Spektrophotometer und die radioaktive Markierung durch

## 2. Material & Methoden

Messen der cpm (*counts per minute*) mit einem *liquid scintillation counter* von Packard bestimmt.

### **2.2.1.9 Protein engineering von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Varianten**

Um einen zielgerichteten Aminosäureaustausch in Sce\*<sub>2</sub>Cre\* vorzunehmen, wurde das jeweilige DNA-Triplett der kodierenden Aminosäure dahingehend verändert, dass es für die gewünschte neue Aminosäure kodiert [116]. Dazu wurde die *rolling circle-PCR* (2.2.1.8.2) eingesetzt, welche neben einem herkömmlichen Primer auch einen generierten Mutageneseprimer verwendet, der sowohl die gewünschte Mutation als auch eine eingefügte Restriktionsschnittstelle (Tab. 2.5) zur späteren Kontrolle enthält. Bei der durchgeführten Standard-PCR mit der *Pfu*-Polymerase, entsteht durch das Ziel-Plasmid pEG3-Sce\*<sub>2</sub>Cre\*, welches für das Fusionsprotein kodiert, ein PCR-Fragment mit einer Länge von 150-300 Bp. Dieser so erzeugte Megaprimmer, mit eingefügter Mutation, wurde mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit* der Firma *Promega* gereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Anschließend wurde der Megaprimmer in der *rolling circle-PCR* eingesetzt, um das komplette Plasmid, mit neu eingefügter Mutation, zu amplifizieren. Der komplette PCR-Ansatz wurde anschließend für eine Stunde bei 37°C mit dem *FastDigest™*-Enzym DpnI inkubiert und so die ursprüngliche DNA-Matrize durch die Restriktionsspaltung degradiert. Anschließend wurde die DNA erneut durch das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit* der Firma *Promega* gereinigt, die DNA-Konzentration bestimmt und das erhaltene Plasmid in KRX-Zellen transformiert. Die isolierte DNA mit der durch den Mutageneseprimer eingefügten Restriktionsschnittstelle wurde durch einen Restriktionsverdau vorläufig verifiziert. Eine abschließende Kontrolle wurde über eine anschließende Sequenzierung durch die Firma LGC und nachfolgende Sequenzauswertung mit dem Programm *Chromas Pro* vorgenommen.

### **2.2.1.10 Protein engineering von I-CreI-Varianten**

Die zielgerichtete Mutagenese von I-CreI war notwendig, um für den Bindungs-Assay eine katalytisch inaktive Variante herzustellen. Hierfür wurde ebenfalls die *rolling-circle-PCR* (2.2.1.8.2) verwendet. Mit den Primern CrAluN20 und CrRevN wurde ein Megaprimmer hergestellt und in der *rolling-circle-PCR* ein

## 2. Material & Methoden

Aminosäureaustausch an Position 20 von I-CreI, von Asparaginsäure zu Asparagin, vorgenommen. Dabei entstand die katalytisch inaktive Variante I-Cre<sup>t</sup> welche als Basisenzym für den Bindungs-Assay dient. Die weiteren Varianten I-Cre<sup>t</sup>K139M und I-Cre<sup>t</sup>K139M; Y33C wurden aus dieser inaktiven HE über die *rolling-circle*-PCR hergestellt und der dafür benötigte Megaprimer mit den Primern aus Tab. 2.5 mittels *Pfu*-Polymerase hergestellt. Die I-CreI-Varianten I-Cre\* und I-Cre\*K139M;Y33C, zum Analysieren der Bindung von der Spaltdomäne des Fusionsproteins mittels EMSA wurden nach dem gleichen Prinzip generiert. Der komplette PCR-Ansatz wurde anschließend für eine Stunde bei 37°C mit dem FastDigest™-Enzym DpnI inkubiert und so die ursprüngliche DNA-Matrize durch die Restriktionsspaltung degradiert. Anschließend wurde die DNA erneut durch das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit* der Firma *Promega* gereinigt, die DNA-Konzentration bestimmt und das Plasmid in KRX-Zellen transformiert. Die isolierte DNA, mit der durch den Mutagenese-Primer (siehe Tab. 2.4) eingefügten Mutation, wurde in einem Restriktionsverdau überprüft und über eine anschließende Sequenzierung der Firma LGC und nachfolgender Sequenzauswertung durch das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro weiter auf ihre Richtigkeit untersucht.

### 2.2.1.11 Klonieren der Target-Plasmide

Als Ausgangsprodukte sind hier zum einen das *low copy*-Plasmid pLCL3-HSCR mit dem Replikationsursprung p15A und Chloramphenicol-Resistenz (Cam) und das *high copy*-Plasmid pHAL-HSCR mit dem Replikationsursprung pMB1 und Ampicillin-Resistenz (Amp) erwünscht. Als Kontrolle wurde jeweils der *lac*-Operator in die jeweilige Plasmide religiert. Zuvor wurde aber als Zwischenvektor das Target-Plasmid pLCL3-HSCR bzw. pLCL3-LACO über das Plasmid pLCL3 hergestellt.

#### pLCL3

Dafür wurde als erstes pACYC184 mit den Restriktionsenzymen Bsu36I, EagI und HindIII gespalten und das 2176 Bp große Fragment mit den DNA-Sequenzen für p15A-ori und die Chloramphenicol-Resistenz über ein Agarosegel gereinigt, *blunt ends* durch die *mung bean*-Nuklease hergestellt und anschließend die Enden des Fragmentes mit CIAP dephosphoryliert. Danach wurde die *lacZ*-Kassette durch die Primer G177 und G178 mittels PCR am pUC19-Plasmid amplifiziert, anschließend die Fragmente durch Ligation zusammengefügt und in DH5α transformiert. Mittels



## 2. Material & Methoden

*screening* (siehe 2.2.1.8.1) wurde mit den Primern G056 und G177 überprüft, welche Klone die *lacZ*-Kassette in der richtigen Richtung aufwiesen. Dazu sollte in der PCR ein 621 Bp großes Fragment entstehen. Die positiven Kolonien wurden erneut auf Richtigkeit über eine Sequenzierung der Firma LGC und durch das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Korrektheit untersucht.

### pLCL3-NOOP

Mit Hilfe der *SOEing*-PCR (siehe 2.2.1.8.3) wurde die Operatorsequenz aus der *lacZ*-Kassette entfernt. Das entstandene Oligo wurde, um für die Klonierung komplementäre Enden zu bekommen, mit NsiI und BglII verdaut. Der Vektor pLCL3 wurde mit NsiI und BamHI geschnitten und mit dem zuvor hergestellten Oligo ligiert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Durch einen Restriktionsverdau mit BglII und einer *screening*-PCR mit den Primern W1430 und W1434 wurde validiert, welche der erhaltenden Klone die gewünschte DNA-Sequenz (von 212 Bp) enthielten. Diese wurden erneut durch eine Sequenzierung und anschließender Analyse über das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Richtigkeit überprüft.

### pLCL3-HSCR

Für die Synthese dieses Plasmids wurden die Primer HSCRfor und HSCRrev durch Annealing hybridisiert (siehe 2.2.1.7) und das so erstellte partiell doppelsträngige DNA-Konstrukt durch einen Verdau mit *mung bean*-Nuklease mit glatten Enden versehen. Dieses Fragment sollte schließlich in den Vektor pLCL3-NOOP ligiert werden. Dafür wurde bei pLCL3-NOOP die extra hinzugefügte BglII-Schnittstelle gespalten, mit der *mung bean*-Nuklease ebenfalls *blunt ends* erzeugt und mit CIAP dephosphoryliert. Anschließend wurden der Vektor und das erzeugte Fragment ligiert und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert.

Durch eine *screening*-PCR (siehe 2.2.1.8.1) mit den Primern HSCRfor und W1430 wurde validiert, welche Klone die gewünschte DNA-Sequenz (von 180 Bp Länge) enthielten. Diese wurden erneut durch eine Sequenzierung und anschließender Analyse über das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Korrektheit überprüft.

### pLCL3-LACO

Die Primer G221 und G222 wurden durch Annealing hybridisiert (2.2.1.7) und mit *mung bean*-Nuklease glatte Enden zum Ligieren in den pLCL3-NOOP-Vektor erzeugt. Der Vektor wurde wie für pLCL3-HSCR beschrieben mit BglII geschnitten,

## 2. Material & Methoden

mit *mung bean* glatte Enden hergestellt und mit CIAP dephosphoryliert. Anschließend wurden der Vektor und das erzeugte Fragment ligiert und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Durch eine *screening*-PCR (2.2.1.8.1) mit den Primern G221 und W1430, wurde überprüft welche Klone die gewünschte DNA-Sequenz (von 180 Bp Länge) enthalten. Diese wurden erneut durch eine Sequenzierung über die Firma LGC und anschließender Analyse über das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Richtigkeit überprüft.

### pHAL3

Mit den Primern G177 und G178 wurden aus den hergestellten pLCL3-Vektoren die jeweilige *LacZ*-Kassette mit der Zielsequenz von I-Cre<sup>t</sup> (bzw. I-CreI auf pLCL3-HSCR mit 595 Bp) oder aber mit Operator-Region (pLCL3-LACO mit 598 Bp) amplifiziert und mit NdeI verdaut.

Das *high copy*-Plasmid pUC19 wurde mit PscI geschnitten, mit *mung bean* glatte Enden erzeugt und ebenfalls mit NdeI verdaut. Der Vektor und die jeweils in der PCR erzeugten Fragmente (mit Zielsequenz von I-Cre<sup>t</sup> oder Operator) wurden ligiert und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Durch eine *screening*-PCR mit den Primern W1430 und W1434 und anschließender Restriktionsspaltung des entstandenen Fragmentes mit HindIII (pHAL-HSCR= 117 und 119 Bp; pHAL-LACO= 117 und 122 Bp) oder BamHI (pHAL-HSCR= 236 Bp; pHAL-LACO= 239 Bp; Ursprungsvektor pUC 19 wird als Kontrolle mit 87 und 146 Bp gespalten) wurde validiert, welche Klone die gewünschte DNA-Sequenz enthalten. Diese wurden erneut durch eine Sequenzierung über die Firma LGC und anschließender Analyse über das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Richtigkeit überprüft.

### **2.2.1.12 Klonieren der Endo-Plasmide**

Das *high copy*-Plasmid pEG3-Cre mit dem Replikationsursprung pMB1 und einem Ampicillin-Resistenzgen wurde in unserem Labor alltäglich zur Expression von I-CreI verwendet. Durch Protein *engineering* wurde mittels *rolling-circle*-PCR (2.2.1.8.2) für den Bindungs-Assay aus der aktiven HE I-CreI eine katalytisch inaktive Variante Namens I-Cre<sup>t</sup> hergestellt (siehe 2.2.1.10), die auf dem Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> kodiert ist. Das für den Bindungs-Assay erzeugte *high copy*-Plasmid pEG3-Cre<sup>t</sup> wurde als Basis für die Herstellung des *middle copy*-Plasmids pRG3-Cre<sup>t</sup> mit dem Replikationsursprung RSF1030 und Kanamycin-Resistenz (Kan) und dem

## 2. Material & Methoden

*low copy*-Plasmid pLG3-Cre<sup>t</sup> mit dem Replikationsursprung p15A und Chloramphenicol-Resistenz (Cam) verwendet.

### pRG3-Cre<sup>t</sup>

Die Sequenz der HE wurde mit Hilfe der Standard-PCR mit *Pfu*-Polymerase und den Primern CrNco und CrXho aus dem Plasmid pEG3-Cre<sup>t</sup> amplifiziert. Das hergestellte Fragment (514 Bp) wurde mit den Enzymen NcoI und XhoI geschnitten. Ebenfalls wird das *middle copy*-Plasmid pRSFDuet-1 mit den gleichen Enzymen gespalten und über ein Agarosegel gereinigt. Weiter wurde mit CIAP dephosphoryliert, mit dem hergestellten Fragment ligiert und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Durch eine Restriktionsspaltung des fertigen Vektors pRG3-Cre<sup>t</sup> mit NcoI und XhoI entstand ein 500 und ein 3.544 Bp großes Fragment (Wt pRSFDuet-1 ergibt hier ein 285 und ein 3.544 Bp großes Fragment). Die Plasmide mit der gewünschten DNA-Sequenz wurden anschließend durch eine Sequenzierung über die Firma LGC und anschließender Analyse über das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Korrektheit überprüft.

### pLG3-Cre<sup>t</sup>

Die Sequenz der HE wurde wie oben (siehe pRG3-Cret) nur mit den Primern G226 und Go87 mittels PCR amplifiziert und die Fragmente (915 Bp) anschließend mit den Enzymen HindIII und NdeI verdaut. Das *low copy*-Plasmid pLCL3 (siehe oben) wurde ebenfalls mit HindIII und NdeI geschnitten, mit CIAP dephosphoryliert, mit dem verdauten Fragment ligiert und das so hergestellte Plasmid in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Durch eine Restriktionsspaltung des fertigen Vektors pLG3-Cre<sup>t</sup> mit HindIII, NdeI und NsiI entstehen 213, 890 und 2.267 Bp große Fragmente (pLCL3 ergibt hier 212, 265 und 2.267 Bp große Fragmente). Die Plasmide mit der gewünschten DNA-Sequenz wurden anschließend durch eine Sequenzierung über die Firma LGC und anschließender Analyse über das Sequenzanalyseprogramm Chromas Pro auf Richtigkeit überprüft.

#### **2.2.1.13 Selektion von Klonen mit richtiger DNA**

Um eine erfolgreich eingeführte Mutation oder Klonierungen überprüfen zu können, wurden herangezogene Klone gepickt und mit Hilfe eines *screenings* (siehe 2.2.1.8.1) getestet.

## 2. Material & Methoden

### 2.2.1.14 *Directed evolution*

Da kein nachweislich stabiler Bindungs-Assay entwickelt werden konnte, kam es nicht zum Versuch der *directed evolution*. Die DNA von I-Cre<sup>t</sup> sollte hier mittels *error-prone-PCR* oder *DNA-shuffling* [101, 102] so verändert werden, dass viele verschiedene zufällige Mutationen in die DNA eingebaut werden, um möglichst schnell, viele neue Varianten von I-Cre<sup>t</sup> herzustellen.

### 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Nährmedien zum Kultivieren von *E. coli*

Das Anziehen von *E. coli* erfolgte generell in autoklaviertem LB-Medium. Zur Kultivierung und Selektion in Flüssigmedien wurden vor dem Gebrauch die entsprechenden Antibiotika zugegeben.

Zielkonzentration im Flüssigmedium: Ampicillin (Amp) 75 µg / ml  
Chloramphenicol (Cam) 20 µg / ml  
Kanamycin (Kan) 25 µg / ml  
Tetracyclin (Tet) 10 µg / ml

Zur Kultivierung und Selektion auf Festmedium wurden dem autoklavierten LB-Medium Bacto-Agar (1,5%) die entsprechenden Antibiotika zugegeben und zum Erhalt von Selektiv-Agarplatten in Petrischalen gegossen.

Zielkonzentrationen im Festmedium: Ampicillin (Amp) 100 µg / ml  
Chloramphenicol (Cam) 30 µg / ml  
Kanamycin (Kan) 25 µg / ml  
Tetracyclin (Tet) 10 µg / ml

#### 2.2.2.2 Selektionsagarplatten

Die Agarplatten für eine blau/weiß Selektion für den Bindungs-Assay basierten auf Selektiv-Agarplatten (siehe 2.2.2.1). Die Selektiv-Agarplatten wurden mit 10% Rhamnose versetzt, um die Expression der T7-RNA-Polymerase über den rhaPBAD-Promotor in KRX-Zellen zu induzieren und wie aus Tab. 2.13 zu entnehmen ist, mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG und X-Gal versetzt.

## 2. Material & Methoden

**Tab. 2.13: Selektionsagarplatten mit X-Gal und IPTG**

Bezeichnung der Selektionsagarplatte	Selektiv-Agarplatte mit unterschiedlichen X-Gal /IPTG-Konzentrationen
40/ 0,2	40 µg / ml X-Gal, 0,2 mM IPTG
40/ 0,4	40 µg / ml X-Gal, 0,4 mM IPTG
40/ 0,6	40 µg / ml X-Gal, 0,6 mM IPTG
40/ 0,9	40 µg / ml X-Gal, 0,9 mM IPTG
80/ 0,2	80 µg / ml X-Gal, 0,2 mM IPTG
80/ 0,4	80 µg / ml X-Gal, 0,4 mM IPTG
80/ 0,6	80 µg / ml X-Gal, 0,6 mM IPTG
80/ 0,9	80 µg / ml X-Gal, 0,9 mM IPTG

Zusätzlich wurden, zur Kontrolle, die Selektionsagarplatten auch ohne IPTG hergestellt.

### **2.2.2.3 Transformation von *E. coli*-Zellen**

Zum Einschleusen fremder DNA in *E. coli*-Zellen über die hier verwendete Methode der Elektrotransformation, müssen die Zellen zuerst kompetent gemacht werden. Bei der Elektroporation werden die Membranen der Zellen durch einen kurzen Hochspannungsimpuls permeabel gemacht und nehmen so externe DNA aus dem umgebenden Medium auf. Dafür müssen sich die Zellen aber in einem möglichst salzfreien Milieu befinden.

### **2.2.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen für die Transformation von Expressionsplasmiden wurden 2 x 500 ml Flüssig-Selektivmedium mit je 3 ml einer ü.N.-Kultur von XL10gold-, XL10blue-, DH5α-, Turbo- oder KRX-Zellen angeimpft, nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 3.600 g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet nacheinander mit 250 ml, 150 ml bzw. 20 ml eiskaltem 10% igen glycerinhaltigen Wasser gewaschen und abzentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen wurden nun in 5 ml 10% iger Glycerinlösung resuspendiert, in 80 µl Aliquots aufgeteilt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 2. Material & Methoden

### 2.2.2.5 Elektrotransformation

Für die Elektrotransformation wurde ein Aliquot elektrokompeter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 - 10 ng salzfreier DNA gemischt. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette pipettiert und in einem Elektroporator einen Hochspannungsimpuls von 2.000 V bei einer Kapazität von 20 µF und einem Widerstand von 200 Ohm ausgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1100 x g pelletiert, in 100 µl LB-Medium aufgenommen und anschließend auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2.6 Kotransformation

Bei dieser Methode wurde durch Elektrotransformation versucht, zwei Plasmide in eine Zelle zu transformieren und positive Zellen durch Selektiv-Agarplatten zu selektieren. Dabei wurde genau wie bei einer Elektrotransformation (2.2.2.5) vorgegangen, außer das von den zwei Plasmiden jeweils 2,5 ng DNA eingesetzt wird. Die so auf den Selektiv-Agarplatten angewachsenen Zellen mit Zweiplasmidsystem wurde für den Bindungs-Assay gepickt und auf Selektionsagarplatten übertragen.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Untersuchung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [117], wobei die Proteine entsprechend ihrer Größe vertikal aufgetrennt werden. Dazu wurden die Proteinproben mit Protein-Auftragspuffer versetzt, für 1 min bei 95 °C inkubiert und in einem diskontinuierlichen Gelsystem (15%iges Trenngel pH 8,8 und 6%iges Sammelgel pH 6,8) unter Verwendung von 1x SDS-Elektrophorese-Puffer bei 27 V/cm für 45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-Gel einer Färbung durch kolloidales Coomassie unterzogen und anschließend mit dem Geldokumentationssystem fotografiert.

## 2. Material & Methoden

### 2.2.3.2 Coomassie-Färbung

Für die Färbung von Proteingelen mit kolloidalem Coomassie [118] wurde das Gel dreimal für 5 min mit warmen Wasser gewaschen, für >1 h mit kolloidalem Coomassie gefärbt und anschließend erneut für 5 min mit Wasser gespült.

### 2.2.3.3 Expression und Reinigung von Proteinen

Alle Proteine, die in dieser Arbeit exprimiert und gereinigt wurden, tragen einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, wodurch sie mit Ni-NTA-Agarose Affinitätschromatographie gereinigt werden können.

Das jeweilige Expressionsplasmid wurde entweder in den *E. coli*-Stamm XL10-gold (I-CreI und Varianten) oder in KRX (Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und Varianten) durch Transformation in die Zellen gebracht.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte für XL10 gold-Zellen in 500 ml LB-Medium und für KRX-Zellen in 250 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika. Angeimpft wurden die Flüssigkulturen mit 25 ml bzw. 3 ml einer ü.N.-Kultur. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C. Nach Erreichen einer Zelldichte von 0,7 OD<sub>600 nm</sub> erfolgte die Induktion der Expression der Proteine I-CreI bzw. Sce\*<sub>2</sub>Cre\* oder ihrer Varianten durch den Zusatz von 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (3600 x g, 4 °C, 15 min), schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Proteinaufreinigung erfolgte mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose über den C-terminalen His-Tag (6x Histidin) aller I-CreI- oder Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Varianten. Zusätzlich wurden alle Varianten der Fusionsproteine mit einer Heparinsäule gereinigt, deren Funktionsprinzip auf die generelle Interaktion von DNA-bindenden Proteinen mit Heparin zurückzuführen ist.

#### 2.2.3.3.1 I-CreI & Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Proteinaufreinigung

Zunächst wurden die pelletierten Zellen der 500 ml-Kultur in 40 ml und die der 250 ml Kultur in 20 ml I-CreI und Sce\*<sub>2</sub>Cre\* His<sub>6</sub>-Tag Lyse/Binde-Puffer resuspendiert, durch Ultraschall (die 500 ml Kultur 5-mal 30 sek. und die 250 ml-Kultur 3-mal 30 sek, *Sonifier 250, Branson (Danbury)*) aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (31 000 x g, 4 °C, 30 min). Der klare Überstand, welcher das lösliche Protein enthielt, wurde für die 500 ml-Kultur mit 350 µl und für die

## 2. Material & Methoden

250 ml-Kultur mit 175 µl Ni-NTA-Agarose für 1 h „rollend“ inkubiert. Der Ansatz wurde sodann zur Pelletierung der Ni-NTA-Agarose zentrifugiert (130 x g, 4 °C, 5 min) und die 500 ml-Kultur dreimal mit 50 ml bzw. die 250 ml-Kultur mit 25 ml I-CreI- und Sce\*<sub>2</sub>Cre\* His<sub>6</sub>-Tag Wasch-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Elution des gebundenen Proteins durch dreimalige Zugabe von 1 ml His<sub>6</sub>-Tag Elution-Puffer und Heparin Äquilibrierungs-Puffer bei der 500 ml-Kultur und durch 500 µl His<sub>6</sub>-Tag Elution-Puffer und Heparin Äquilibrierungs-Puffer bei der 250 ml-Kultur, mittels Imidazol. Die Elutionsfraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration (ermittelt durch SDS-Gelelektrophorese) wurden vereinigt und ü.N. gegen den jeweiligen Dialyse-Puffer bei 4 °C dialysiert. Die so gereinigten Proteine konnten nun bei -80 °C gelagert werden.

### 2.2.3.3.2 Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Varianten Proteinaufreinigung

Zunächst wurden die Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Varianten genau wie der Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.3.3.1) gereinigt. Lediglich die Pufferzusammensetzung (siehe Tab. 2.11) des His<sub>6</sub>-Tag Lyse/Binde-Puffers und des Wasch Puffers war eine andere. Anschließend mussten die Enzym-Varianten, durch eine Heparin-Affinitätschromatographie von den wenigen noch vorhandenen „Verunreinigungen“, gereinigt werden. Nach Äquilibrierung der Heparinsäule mit dem His<sub>6</sub>-Tag Elution-Puffer und Heparin Äquilibrierungs-Puffer wurde das komplette Eluat aufgetragen und fünfmal mit je 1 ml Heparin Wasch-Puffer 1 und fünfmal mit je 1 ml Heparin Wasch-Puffer 2 gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 3 ml Heparin Elutions-Puffer von der Heparinsäule gelöst und in 250 µl-Fraktionen gesammelt. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert, die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen vereinigt und das vereinigte Eluat ü.N. gegen den Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und Varianten Dialyse-Puffer bei 4 °C dialysiert. Die so aufgereinigten Proteine konnten nun bei -80 °C gelagert werden.

### 2.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop (*Peqlab Biotechnologie GmbH*). Gemessen wurde dabei die Extinktion



## 2. Material & Methoden

bei 280 nm gegen den vorliegenden Puffer als „Blank“-Wert. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die im Protein enthaltenen aromatischen Tryptophan- und Tyrosinreste sowie in geringem Umfang Cystin. Der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins [119] kann mit Hilfe der Beziehung

$\epsilon_{\text{Protein}_{280\text{nm}}} = n \times \text{Trp} \times 5500 + n \times \text{Tyr} \times 1490 + n \times \text{Cys-S-S-Cys} \times 125 \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{]}$   
berechnet werden.

Somit kann über das Lambert-Beersche-Gesetz aus  $A_{280\text{nm}}$  und  $\epsilon_{280\text{nm}}$  die Proteinkonzentration wie folgt bestimmt werden:

$c = A_{280\text{nm}} / (\epsilon_{280\text{nm}} * d)$ ; wobei  $d = 1 \text{ cm}$ .

### 2.2.3.4.1 Bradford-Assay

Im Falle von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  und seinen Varianten kann die ermittelte Proteinkonzentration durch Berechnung der Proteinkonzentration bei einer Extinktion von 280 nm, wenn man sie gegen Standard-Proteine, wie BSA, auf ein SDS-Polyacrylamidgel überträgt und analysiert, nicht zutreffen. Deswegen werden die Proteinkonzentrationen für alle Fusionsproteine, wie  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  oder eine Variante, mittels Bio-Rad Protein Assay® bestimmt. Dabei werden die Proteine mittels Bradford Coomassie *blue dye* G-250 angefärbt und durch ein Photometer quantitativ bestimmt [120].

Die Bestimmung der Konzentration beruht darauf, dass das Absorptionsmaximum des Bradford Coomassie Blue G-250 von 465 nm zu 595 nm wechselt, wenn der Farbstoff eine Bindung mit einem Protein in einer sauren Lösung eingeht. Bei der Methode werden Standards aus BSA oder Albumin in Konzentrationen von 1 bis 25  $\mu\text{g} / \text{ml}$  angesetzt (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) und davon 5  $\mu\text{l}$  mit 45  $\mu\text{l}$  Wasser verdünnt und 50  $\mu\text{l}$  Bradford Coomassie *blue dye* G-250 dazugegeben. Die Proteinprobe wird ebenfalls so angesetzt. Die erhaltenen Extinktionswerte der Proteinproben wurden anhand der hergestellten Standardkurve in die jeweilige Konzentration umgerechnet.

### 2.2.3.5 Aktivitätstest

Die Aktivität von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  sowie seiner Varianten wurde durch die Spaltung der Erkennungssequenz an verschiedenen DNA-Substraten getestet. Dabei enthielt das Plasmid pDMHS-SCS die Sequenz für die spezifische Erkennungssequenz und die

## 2. Material & Methoden

Plasmide pDMHS-CS und pDMHS-C, bzw. pATHS-C für die unspezifische Zielsequenz von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* bzw. seiner Varianten.

### 2.2.3.5.1 Aktivität mit linearisierten Plasmiden

Die Plasmide pDMHS-SCS (2.822 Bp) und pDMHS-CS (2.800 Bp) wurden durch einen Restriktionsverdau mit AlwNI und pATHS-C (3.682 Bp) durch einen Restriktionsverdau mit PstI linearisiert. Diese linearisierten Plasmide wurden mit etwa 5 nM in einem Aktivitätstest eingesetzt, dazu kamen ca. 95–100 nM Protein und 1x KGB- oder 1x T-Puffer X in einem Volumen von 10 µl. Die Proben wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zufügen von 1x DNA-Auftragspuffer und Erhitzen der Proben auf 95 °C für 10 min gestoppt und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Um einen optimalen Zeitpunkt für quantitative Analysen an Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C zu ermitteln und den Zeitpunkt für das Optimum der Aktivität herauszufinden, wurden hier Proben für 1 h, 16 h, 1 d, 2 d und 3 d inkubiert. Bei Aktivitätstests mit linearisiertem Plasmid wurden für pDMHS-SCS 1.783 Bp- und 1.084 Bp-Fragmente, für pDMHS-CS 1.716 Bp- und 1.084 Bp-Fragmente und für pATHS-C 2.545 Bp- und 1.145 Bp-Fragmente bei Spaltung der Erkennungssequenz erwartet.

### 2.2.3.5.2 Aktivität mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Die spezifische (SCS) und unspezifische (CS) Zielsequenz für Sce\*<sub>2</sub>Cre\* sowie für seine Varianten wurden mittels [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP *labeling*-PCR (siehe 2.2.1.8.4) mit den Substratplasmiden pDMHS-SCS, pDMHS-CS und pDMHS-C hergestellt. Für die Bestimmung der quantitativen Analyse der Proteinaktivität sowie zur vorausgehenden Protein-Titration wurden für die spezifische Zielsequenz SCS-370 ein 370 Bp großes Fragment hergestellt (Primer E013 und E016) für die Kontrolle C-334 wurde in analoger Weise ein 334 Bp großes Fragment erstellt und für die unspezifische Zielsequenz CS-357 ein 357 Bp großes Fragment (Primer: E014 und E015).

Für *competition*-Tests wurden für die spezifische Zielsequenz mit den Primern E013 und IQE ein 790 Bp großes Fragment (SCS-790) und für die unspezifische Zielsequenz mit den Primern E013 und E014 ein 305 Bp großes Fragment (CS-305) hergestellt.

## 2. Material & Methoden

Die radioaktiv markierten Fragmente wurden in einer Spaltreaktion mit ca. 5.000 cpm pro Ansatz eingesetzt.

Die Titration von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* oder einer Varianten wurde mit einer gleichbleibenden Konzentration der entstandenen DNA-Fragmente (SCS-370 mit 1,3 nM und CS-357 mit 1,5 nM) durchgeführt. Die Proteinkonzentration (1,3 – 600 nM) war abhängig vom jeweils gewünschten Verhältnis zur DNA. Dabei wurde die Aktivität des Fusionsproteins an der Spaltung der spezifischen und unspezifischen Zielsequenz mittels Titration von Enzym im molaren Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:100, 1:200 und 1:400 (DNA:Protein) im KGB-Puffer getestet. Die Proben wurden bei Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M für eine Stunde und bei Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C für 24 h bei jeweils 37°C inkubiert und durch anschließende Analyse festgestellt, welche Bedingung die meisten Spaltprodukte ergab. Die zu erwartenden Spaltprodukte für die spezifische Zielsequenz SCS-370 waren 143 und 227 Bp groß, für die unspezifische Zielsequenz CS-357 waren 100 und 257 Bp und für C-334 wurden 211 und 123 Bp große Fragmente erwartet.

Bei der quantitativen Analyse der Enzymaktivität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* oder der Variante Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C wurden DNA und Protein in einem Verhältnis von 1:15 (DNA:Protein) eingesetzt. Die DNA-Konzentration betrug 1,2 nM (SCS-370 oder CS-357) und die des jeweiligen Enzyms 18 nM bei jeder Reaktion. Durchgeführt wurden die Reaktionen im KGB-Puffer bei 37 °C mit verschiedenen Zeitintervallen. Die Intervalle für Sce\*<sub>2</sub>Cre\* waren 1, 3, 5, 15, 30, 60, 120, 360 und 720 min und für Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C 1, 3, 6, 12, 16, 18, 20, 22 und 24 h. Zu diesen verschiedenen Zeiten wurden von der Stammreaktion Aliquots entnommen und die Reaktion durch 1x DNA-Auftragspuffer und Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Die zu erwartenden Größen der Spaltprodukte sind oben beschrieben.

In der Reaktion für *competition*-Tests wurden 1,4 nM der spezifischen (SCS-790) und ebenso 1,4 nM der unspezifischen Zielsequenz (CS-305) und 42 nM Sce\*<sub>2</sub>Cre\* oder Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C im KGB-Puffer bei 37 °C inkubiert und der Reaktionsfortschritt unter verschiedenen Zeitintervallen analysiert. Die Inkubationszeiten der Enzyme und die weitere Behandlung der Proben gleicht der für die quantitative Analyse der Enzymaktivität beschriebenen Prozedur.

## 2. Material & Methoden

### 2.2.3.6 Bindungstest EMSA

Mit dem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) untersucht man die Bindung von Molekülen an DNA-Substrate durch Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.2). Dabei können diese Moleküle unterschiedlicher Art sein, z.B. Proteine. Bindet ein Molekül an die DNA wird die Laufgeschwindigkeit des gebundenen DNA-Substrates verringert und kann im Gel nachgewiesen und quantifiziert werden. Titriert man eine definierte Substratmenge zu unterschiedlichen Mengen des zu untersuchenden Moleküls, so kann daraus die Assoziationskonstante des Moleküls berechnet werden. Einzige Voraussetzung ist, dass die Dissoziation des Komplexes langsamer als die Assoziation ist, so dass der Komplex mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Deshalb lässt man diese Gele bei geringer Stromstärke laufen, um eine unnötige Erwärmung des Gels zu verhindern und somit den Komplex nicht zu zerstören (hier 10 V/cm für 1,5 h).

In dieser Arbeit wurden PCR-Fragmente mit spezifischer (SCS-370) und unspezifischer (CS-357, C-334) Zielsequenz für das Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  und dessen hergestellte Variante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  mit  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  radioaktiv markiert (Details siehe 2.2.3.5.2), um die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel verfolgen zu können. Ein nM des radioaktiv markierten spezifischen Substrates (SCS-370) und 1,3 nM des unspezifischen Substrats (CS-357 und 2,1 nM bei C-334) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Fusionsproteins (8-160 nM, 8-168 nM bei CS und 170 nM bei C; siehe auch 3.1.6) für eine Stunde in KGBB-Puffer bei 37 °C inkubiert. Um unspezifische Bindung zu unterbinden, wurden zu der Gesamtreaktion 10 µg/ml poly (dIdC) hinzugefügt. Für eine bessere Auftrennung der Banden wurden 5%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen, nachdem das Gel 15 min vorgelaufen war. Die Quantifizierung erfolgte anschließend durch den Instant-Imager (Packard) und dazugehöriger Software.

## 3. Ergebnis

### 2. Ergebnis

#### 3.1 Protein *engineering* am Fusionsprotein $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$

Einige Enzyme entwickeln sich im Laufe der Evolution, um optimal an neue Bedingungen angepasst zu sein, durch Fusion mit Domänen oder Untereinheiten von anderen Proteinen, weiter. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  ist aus einer Fusion durch eine I-CreI-Variante (I-CreIG19S = I-CreI\*) als Spaltmodul und jeweils einer inaktiven I-SceI Variante (I-SceID44N; D145A = I-SceI\*), die an eine Untereinheit von I-CreI\* gekoppelt ist, künstlich entwickelt worden. I-SceI\* fungiert innerhalb des Konstruktes als DNA-Bindungsmodul. Verbunden sind I-SceI\* und I-CreI\* jeweils durch eine kurze *linker*-Region aus der HE I-TevI. Das dimere Fusionsprotein besteht letztendlich aus zwei I-SceI\*-Bindungsmodulen, welche das I-CreI\*-Spaltmodul flankieren (siehe 1.3.2. und Abbildung 1.11). Das komplette Fusionsprotein ist in dimerisierter Form ca. 91 kDa groß und umfasst insgesamt eine Erkennungssequenz von 60 Bp. Diese lange und spezifische Erkennungssequenz macht das Enzym äußerst interessant für den zielgerichteten Genaustausch bzw. für die Genommodifikation als „safe harbour“-Stelle [12]. Denn ein für solche Zwecke eingesetztes „Schneidwerkzeug“ erfordert eine hoch sequenzspezifische Adressierung im Genom und darf dort nur einmal an einer definierten Stelle einen DSB in die DNA induzieren können und benötigt deshalb im menschlichen Genom eine Erkennungssequenz von mindestens 16 Bp [2].

Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität des Fusionsproteins  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  sehr „unspezifisch“ und somit in dieser Form für die angestrebten Anwendungen nicht verwendbar. Unter Umständen wäre das Fusionsprotein in seiner jetzigen Form lediglich unter Hochsalzbedingungen zu verwenden. Es wäre demnach vorteilhaft das Enzym dahingehend zu verändern, dass es auch unter physiologischen Bedingungen seine Zielsequenz spezifisch spalten kann, so dass es auch in Zellen spezifisch einsetzbar werden würde. Deshalb wurde in dieser Arbeit durch die Methoden des Protein *engineering* ein zielgerichteter Austausch an den Aminosäureresten in der Spaltdomäne von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  vorgenommen. Dies sollte die Spezifität des Fusionsproteins unter physiologischen Bedingungen erhöhen.

### 3. Ergebnis

#### 3.1.1 Varianten von $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$

Dr. George Silva zeigte in seinen Untersuchungen an  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  eindeutig, dass die Aktivität des Fusionsproteins im T-Puffer (Tris-Puffer siehe Tab. 2.11) ab einer Konzentration von 800 mM NaCl spezifisch ist und lediglich die spezifische Zielsequenz (SCS, siehe 7.2) von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  spaltet. Bei niedrigeren NaCl-Konzentrationen (< 800 mM NaCl) kommt es zudem zur Spaltung nichtadressierter bzw. „unspezifischer“ Sequenzen (CS und C, siehe Abbildung 3.1).



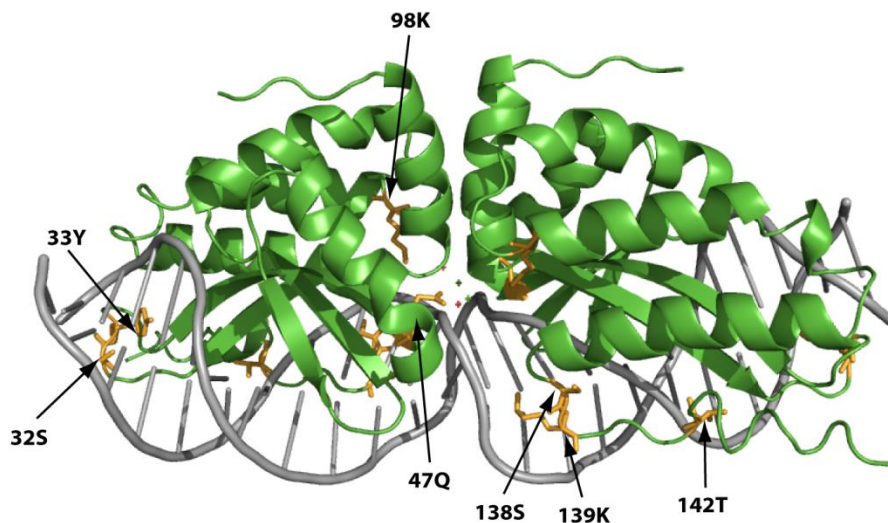
**Abbildung 3.1: Zielsequenzen von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  und Mutanten**

SCS ist die spezifische Zielsequenz von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  mit der Erkennungssequenz von I-CreI (pink), die auf beiden Seiten von der Erkennungssequenz I-SceI (grün) flankiert wird. CS ist die nichtadressierte bzw. „unspezifische“ Zielsequenz und besteht aus jeweils nur einer Erkennungssequenz von I-SceI (grün) und I-CreI. Die nichtadressierte bzw. „unspezifische“ Zielsequenz C und besteht lediglich aus einer Zielsequenz von I-CreI.

Um dieses spezifische Enzym auch unter physiologischen Bedingungen, also *in vivo* (z.B. in Zellen), nutzen zu können, wurden durch Protein *engineering* (siehe 2.2.1.9) verschiedene Einzel- und Doppel-Substitutionen an Aminosäuren der Spaltdomäne I-Cre\* im Fusionsprotein (siehe Abbildung 3.2) vorgenommen. Dabei geht es zunächst darum, die Aktivität des Enzyms durch den zielgerichteten Austausch von Aminosäureresten soweit zu verändern, dass  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  auch bei niedrigen Salzbedingungen seine Zielsequenz spezifisch spalten kann. Deswegen wurde versucht, durch gezielte Mutationen in der Spaltdomäne von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  eine leichte Minderung der Bindungsstärke von I-Cre\* einzuleiten, da I-CreI einen etwas geringeren  $K_D$ -Wert (ca. 1 nM; siehe 1.3.2.2) im Vergleich zu I-SceI (ca. 10 nM; siehe 1.3.2.1) besitzt. Dies sollte aber die Faltung des Fusionsproteins und die spezifische Aktivität nicht beeinflussen.

### 3. Ergebnis

Durch die stärkere Affinität der Spaltdomäne (I-Cre\*) braucht das Fusionsprotein nicht zwingend mit allen Bindungsdomänen an die adressierte bzw. spezifische Zielsequenz zu binden und kann in einem T-Puffer mit weniger als 800 mM NaCl oder in einem den physiologischen Bedingung nahen Puffer (z.B. KGB-Puffer) die unspezifischen Zielsequenzen CS und C spalten (siehe Tab. 3.1) und somit „*off-site*“-Spaltungen begünstigen. Damit die komplette Erkennungssequenz von 60-Bp gebunden werden kann, wird versucht, die Bindungsstärke der Spaltdomäne I-CreI\* herabzusetzen.



**Abbildung 3.2: Protein engineering an Aninosäuren der I-CreI-Domäne**

Hervorgehoben sind die jeweiligen Aminosäurereste (orange), die für Einzel- oder Doppelsubstitutionen in der Schneidedomäne von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* ausgewählt wurden. Bezeichnet wurden die Positionen der Aminosäuren in der jeweiligen I-CreI-Untereinheit, die in der vorderen Ebene der Abbildung des Proteins zu erkennen sind.

Die Auswahl der Aminosäurereste erfolgte dabei anhand der zur Verfügung stehenden Literatur zu Untersuchungen der Aktivität und Bindung verschiedener Varianten von I-CreI. Die in Abbildung 3.2 gezeigten und in der Literatur gefundenen Substitutionen von Aminosäuren zeigen die gewünschten Eigenschaften, ohne an katalytischer Aktivität einzubüßen [95, 108, 121].

Die Mutationen wurden durch Protein *engineering* (siehe 2.2.1.9) mittels *rolling circle-PCR* (2.2.1.8.2) hergestellt. Nach erfolgreicher Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte folgten Proteinexpression sowie Anpassung und Optimierung des Reinigungsprotokolls, welches Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie und eine nachgeschaltete Reinigung über eine Heparinsäule (siehe 2.2.3.3.1 und 2.2.3.3.2) umfasste.

### 3. Ergebnis

Tab. 3.1: Aktivitätstests der Sce\*<sub>2</sub>Cre\*-Varianten

Austausch Der Aminosäure	Name der Mutante	Spez. Aktivität im 800 Puffer	Unspez. Aktivität im 800 Puffer	Spez. Aktivität im 500 Puffer	Unspez. Aktivität im 500 Puffer	Sez. Aktivität im KGB Puffer	Unspez. Aktivität im KGB Puffer
—	Sce* <sub>2</sub> Cre*	++	+	++	—	++	+++
S32K	Sce* <sub>2</sub> Cre*S32K	++	+	++	—	++	+++
Y33C	Sce* <sub>2</sub> Cre*Y33C	+	—	—	—	++	++
Q47N	Sce* <sub>2</sub> Cre*Q47N	—	—	—	—	+	++
K98A	Sce* <sub>2</sub> Cre*K98A	—	—	—	—	++	++
S138A	Sce* <sub>2</sub> Cre*S138A	—	—	—	—	+	++
<b>K139M</b>	<b>Sce*<sub>2</sub>Cre*K139M</b>	—	—	++	—	++	++
T142G	Sce* <sub>2</sub> Cre*T142G	—	—	—	—	+	++
K139M; S32K	Sce* <sub>2</sub> Cre*K139M; S32K	++	—	—	—	++	++
<b>K139M; Y33C</b>	<b>Sce*<sub>2</sub>Cre*Y139M; Y33C</b>	—	—	—	—	+	—
K139M; Q47N	Sce* <sub>2</sub> Cre*K139M; Q47N	—	—	—	—	—	—
K139M; K98A	Sce* <sub>2</sub> Cre*K139M; K98A	—	—	—	—	—	—
K139M; T142G	Sce* <sub>2</sub> Cre*K139M; T142G	—	—	—	—	—	+

Die **hervorgehobenen Varianten** wurden in anschließenden Untersuchungen verwendet; die Abkürzungen spez. und unspez., stehen für spezifisch und unspezifisch. Die Symbole in der Tab. Sind wie folgend zu bewerten:

- keine Aktivität (die Zielsequenz wurde nicht gespalten)
- + etwas Aktivität (die Zielsequenz wurde < die Hälfte gespalten)
- ++ mittlere Aktivität (die Zielsequenz wurde ca. zur Hälfte)
- +++ hohe Aktivität (die Zielsequenz wurde > die Hälfte gespalten)



### 3. Ergebnis

Die so gereinigten Proteine wurden auf korrekte Größe mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht und die Aktivität der verschiedenen Mutanten im T-Puffer 500 und T-Puffer 800 (mit 500 bzw. 800 mM NaCl) sowie im KGB-Puffer (einem nahezu physiologischen Puffer) getestet. Diese Tests erfolgten an linearisierten Plasmidsubstraten in einem Verhältnis von 1:20 (DNA:Protein). Hierbei wurde zum einen die spezifische Zielsequenz mit dem linearisierten Plasmid pDMHS-SCS getestet und zum anderen die unspezifischen Zielsequenzen mit den Plasmiden pDMHS-CS und pATHS-C.

Lediglich die Einzelmutante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M}$  zeigt im T-Puffer 500 (siehe Tab. 3.1) eine spezifische Aktivität und ist so dem gewünschten Ergebnis am nächsten. Alle anderen erzeugten Einzelmutanten weisen keine bis unspezifische Aktivität in den getesteten Puffern auf.  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M}$  wurde als Basis für eine zweite Aminosäuresubstitution herangezogen. Das Lysin an Position 139 ist im C-terminalen Bereich von I-CreI an der DNA-Protein-Wechselwirkung beteiligt, indem es Wasserstoffbrücken zum Rückgrat der Zielsequenz ausbildet [121]. Die Mutation an Position 139 des Proteins, von Lysin zu Methionin, d.h. von einer basischen (K) zu einer neutralen Aminosäure (M), erhöht die negativere Oberflächenladung des Proteins geringfügig und kann deswegen theoretisch weniger elektrostatische Wechselwirkungen zu seiner spezifischen Zielsequenz (SCS) ausbilden.

Die hergestellte Doppelmutante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  zeigt im KGB-Puffer die gewünschte, aber sehr geringe, spezifische Aktivität und wurde so für weitere Untersuchungen verwendet. Das Tyrosin an Position 33 ist eines der meist konservierten Aminosäurereste in I-CreI und bildet mit dem Adenin an Position +10 der Erkennungssequenz Wasserstoffbrücken aus [71]. Die Mutation an Position 33, von Tyrosin zu Cystein, sind neutrale Aminosäuren, aber Cystein veranlasst eine leichte Verschiebung eines Loops und bewirkt eine schwächere Affinität in der spezifischen Bindung zur Zielsequenz [122].

#### 3.1.2 Aktivität unter verschiedenen Salzkonzentrationen

Um zu testen, wie sich die Aktivität der Einzel- und Doppelmutante im Vergleich zum Wt von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  in unterschiedlichen Salzkonzentrationen verhält, wurde eine NaCl-Titration vorgenommen.

Proteine zeigen bei verschiedenen Salzkonzentrationen ein unterschiedliches Verhalten. Bei geringer Zugabe von Salzen wird die Proteinaggregation

### 3. Ergebnis

zurückgedrängt. Anders bei erhöhten Salzkonzentrationen, hier verhält sich die Löslichkeit, Schmelztemperatur und Aktivität des jeweiligen Proteins spezifisch, je nach dessen Oberflächenbeschaffenheit [123]. Die Proteine bzw. ihre Aminosäurereste konkurrieren mit den Salzionen um das freie Wasser und so fallen hydrophobe Proteine bei steigenden Salzkonzentrationen schneller aus als hydrophile Proteine [124].

Bei erhöhten Salzkonzentrationen wird die elektrostatische Anziehung vom Protein zur DNA im Allgemeinen abgeschwächt. Das Fusionsprotein wird, theoretisch gesehen, spezifischer und benötigt die komplette Erkennungssequenz (SCS), um an die DNA binden und diese spalten zu können. Bei niedrigen Salzbedingungen ist die elektrostatische Anziehung vom Protein zur DNA sehr hoch, wodurch das Fusionsprotein unspezifischer werden müsste und so auch die Erkennungssequenzen CS und C binden und spalten sollte.

Diese Aussage wird im Folgenden mit dem zuvor verwendeten T-Puffer X mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0-900 mM NaCl) untersucht. Das Verhältnis DNA zu Protein wurde wie zuvor bei 1:20 (DNA : Protein) belassen und die gesamte Reaktion bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, mit 95°C für 10 min erhitzt, um das Protein von der DNA zu lösen, mit 1x DNA-Auftragspuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.2.3.5.1).

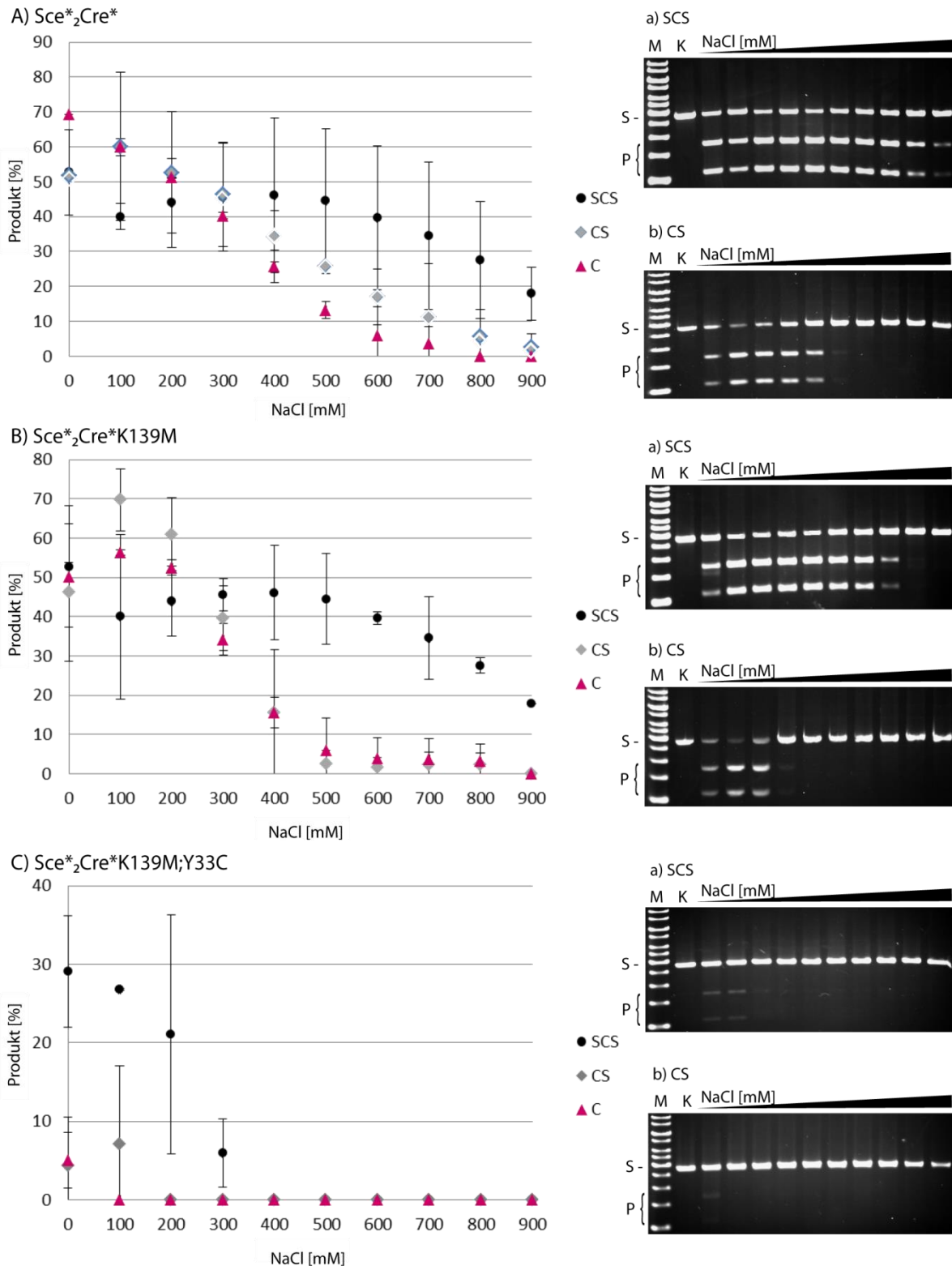
Die Auswertung von jeweils drei Gelbildern ist in graphischer Form in Abbildung 3.3 zu sehen und unterstreicht die oben genannte Annahme.

Bei dem Wt  $Sc\epsilon^*_2Cre^*$  ist deutlich zu erkennen, dass die unspezifischen Zielsequenzen (CS und C) bei niedrigen Salzkonzentration bis ca. 250 mM NaCl bevorzugt gespalten werden und sich dieses Verhältnis ab einer Konzentration von 400 mM umdreht. Bei höheren Konzentrationen von 800 und 900 mM NaCl wird lediglich die spezifische Zielsequenz (SCS) gespalten.

Bei der Variante  $Sc\epsilon^*_2Cre^*K139M$  wiederholt sich das Muster des Wt, aber im Vergleich dazu wird die spezifische Zielsequenz (SCS) schon ab einer Konzentration von ca. 500 mM spezifisch gespalten.

Die Variante  $Sc\epsilon^*_2Cre^*K139M;Y33C$  fällt etwas aus dem vorherigen Muster, denn die unspezifischen Zielsequenzen (CS und C) werden zu keiner Zeit favorisiert geschnitten. Von 0-200 mM NaCl wird die spezifische Zielsequenz mit einem Optimum von 30% gespalten, aber auch die unspezifischen Zielsequenzen (CS und C) mit bis zu 8% Produktbildung. Bei einer Salzkonzentration von 200-300 mM ist lediglich eine Spaltung der spezifischen Zielsequenz (SCS) zu erkennen.

### 3. Ergebnis



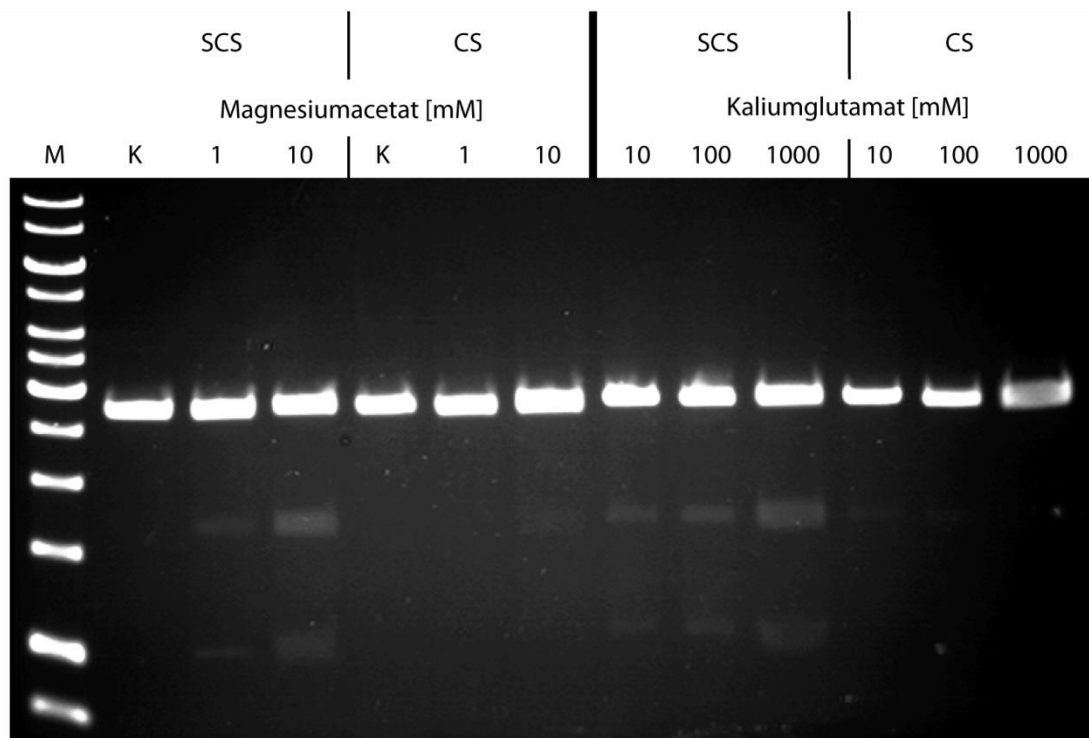
**Abbildung 3.3: Vergleich der Aktivität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\* und Varianten bei Salztitration**

A) Sce\*<sub>2</sub>Cre\* schneidet ab einer Konzentration von über 800 mM NaCl die Zielsequenz SCS spezifisch.  
 B) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*M139 schneidet die Zielsequenz SCS ab einer NaCl-Konzentration von 500 mM spezifisch.  
 C) Die Aktivität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*M139;C33 hat sich reduziert und schneidet die unspezifischen Erkennungssequenzen (CS und C) von 0-100 mM NaCl. Die spezifische Zielsequenz SCS wird von 0-300 mM NaCl gespalten und hat ein Optimum in der Aktivität bei Abwesenheit von Salz mit 30% Produktformation. Die Graphen zeigen die Auswertungen von jeweils drei analysierten Gelbildern von Produktformation gegen NaCl. (a) spezifische Erkennungssequenz SCS, b) unspezifische Erkennungssequenz CS (M = 1 Kb ladder; K = Kontrolle; S = Substrat; P = Produkte)

### 3. Ergebnis

#### 3.1.3 Aktivität unter physiologischen Bedingungen

Sce\*<sub>2</sub>Cre\* könnte für den zielgerichteten Genaustausch in Zellen sehr interessant sein, sollte das Fusionsprotein auch unter physiologischen Bedingungen spezifisch DSB in seine Zielsequenz initiieren können. Der KGB-Puffer ist ein den physiologischen Bedingungen nahe kommender Puffer (Zusammensetzung siehe Tab. 2.11). Es ist bekannt, dass die Optimalbedingungen von Magnesiumacetat annähernd 1 mM und von Kaliumglutamat ca. 160 mM in einer Zelle betragen [125]. Deswegen wurde getestet, ob das Fusionsprotein auch in einem KGB-Puffer mit niedrigeren Konzentrationen an Magnesiumacetat und Kaliumglutamat die DNA aktiv spalten kann.



**Abbildung 3.4: Aktivität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C unter verschiedenen Konzentrationen Magnesiumacetat und Kaliumglutamat**

Analyse der Aktivität der Variante bei näheren physiologischen Bedingungen durch 1%iges Agarose-Gel mit linearisiertem Plasmid. Dazu wurde in einem Konzentrationsverhältnis von 1:20 (DNA:Protein) gearbeitet. Die SCS Erkennungssequenz wird auch bei niedrigeren Konzentrationen von Magnesiumacetat und Kaliumglutamat gespalten. Die unspezifische Erkennungssequenz CS wurde nicht geschnitten.

(KGB-Puffer wurde ohne Magnesiumacetat oder Kaliumglutamat hergestellt, die jeweils hinzugefügten Konzentrationen sind direkt darüber beschrieben) (M = 1 Kb Ladder; K = Kontrolle, ohne Protein)

### 3. Ergebnis

Anhand der linearisierten Plasmide (siehe 2.2.3.5.1) mit der spezifischen Erkennungssequenz SCS (pDMHS-SCS) oder der unspezifischen Erkennungssequenz CS (pDMHS-CS) wurde getestet, wie sich die Doppelmutante  $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$  *in vivo* verhalten könnte. Das linearisierte Plasmid pDMHS-SCS bzw. pDMHS-CS wurde mit dem Wt (hier nicht gezeigt) oder der Doppelmutante  $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$  in einem Verhältnis 1:20 (DNA : Protein) eingesetzt, die gesamte Reaktion bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, mit 95 °C für 10 min erhitzt, um das Protein von der DNA zu lösen, mit 1x DNA-Auftragspuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen.

Dabei konnte deutlich gezeigt werden (siehe Abbildung 3.4), dass auch bei Bedingungen nahe dem physiologischen Optimum eine spezifische Spaltung in der Zielsequenz (SCS) eingeleitet werden kann. Allerdings ist die Produktbildung sehr gering und nicht sehr gut zu erkennen, so dass die Ergebnisse für eine quantitative Analyse unbrauchbar sind. Deswegen wurden alle weiteren Untersuchungen im KGB-Puffer durchgeführt.

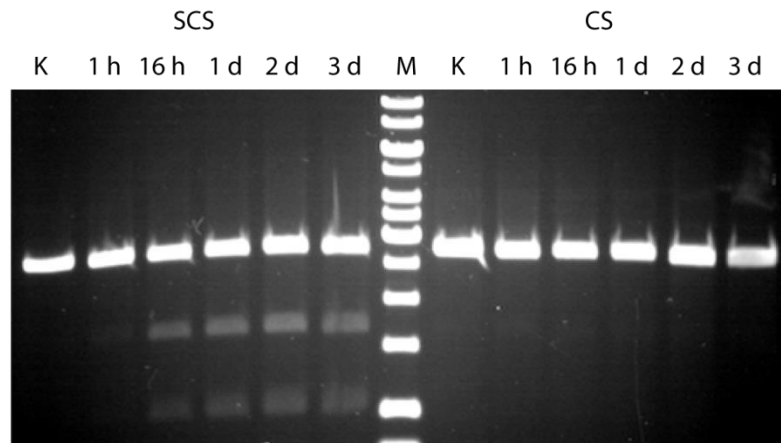
#### **3.1.4 Optimierung der Bedingungen für quantitative Analysen von $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$**

Um quantitative Tests zu den Spalt- und Bindungseigenschaften des Enzyms durchführen zu können, mussten die Inkubations- und Konzentrationsbedingungen optimiert werden. Die wichtigsten zu ermittelnden Parameter, neben der Zusammensetzung des Puffers und der Temperatur, sind dabei das Verhältnis von DNA zu Protein in einer Reaktion und zu welchem Zeitpunkt das Optimum einer Spaltung erreicht ist.

Um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt das Optimum der Aktivität von  $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$  erreicht ist und um das Verhalten bei einer längeren Inkubationszeit zu ermitteln, wurde das Protein im 20-fachen Überschuss zum linearisierten Plasmid pDMHS-SCS bzw. pDMHS-CS (siehe 2.2.3.5.1) zugegeben, bei 37 °C inkubiert und der Stammreaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten Aliquots entnommen (1 h, 16 h, 1 d, 2 d, 3 d). Die Reaktionen wurden direkt bei Probenahme mit DNA-Auftragspuffer gestoppt und auf 95 °C erhitzt, um das Protein zu denaturieren. Die über drei Tage gesammelten Proben wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen.

### 3. Ergebnis

Das Ergebnis in Abbildung 3.5 zeigt, dass ein Optimum der Spaltung von Sce\*2Cre\*K139M;Y33C zu der spezifischen Zielsequenz (SCS) nach ca. einem Tag erreicht ist. Danach ist kein weiterer Anstieg der Produktbildung, oder eine Abnahme der jeweiligen Ziel-DNA ersichtlich. Eine Spaltung der unspezifischen Zielsequenz (CS) ist zu keinem Zeitpunkt zu erkennen. Somit wurden alle nachfolgenden Untersuchungen mit 24 h, d.h. 1 d Inkubationszeit durchgeführt.

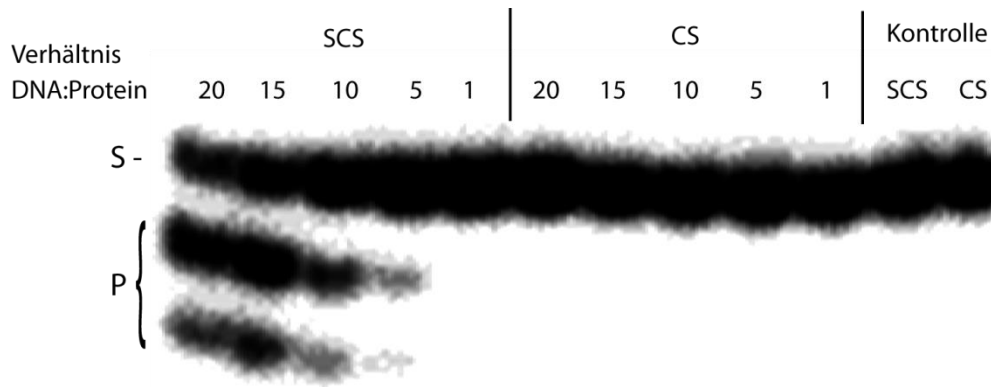


**Abbildung 3.5: Aktivität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M; Y33C bei unterschiedlichen Inkubationszeiten**

Analyse der Aktivität der Mutante nach verschiedenen Zeiten durch 1%iges Agarose-Gel durch linearisiertes Plasmid. Dazu wurde in einem Konzentrationsverhältnis von 1:20 (DNA:Protein) gearbeitet. Bei den Messungen bis zu 16 h ist die Aktivität des Fusionsprotein zu seiner spezifischen Zielsequenz (SCS) stetig steigend. Von den Zeitpunkten ein bis drei Tage steigt die Aktivität kaum bis gar nicht mehr. Die unspezifische Zielsequenz (CS) wird nicht gespalten. (M = 1 Kb *ladder*; K = Kontrolle, ohne Protein; h = Stunde; d = Tag)

Um das optimale Verhältnis von DNA und Protein in einer Reaktion eines Spaltaktivitätstests zu ermitteln, wurden Aktivitätstests mit variierender Proteinkonzentration durchgeführt. Dafür wurden PCR-Fragmente der spezifischen (SCS) und unspezifischen (CS) Zielsequenz mit [ $\alpha^{32}$ P]-dATP radioaktiv markiert (siehe 2.2.1.8.4), damit die Abnahme der Ziel-DNA bzw. die Zunahme der Spaltprodukte bei gleichbleibender DNA-Konzentration und verschiedenen Proteinkonzentrationen (SCS = 1,3 nM; CS = 1,5 nM; Protein = 1,3-30 nM im Verhältnis 1:1; 1:5; 1:10; 1:15; 1:20 zur jeweiligen DNA:Protein) sensitiver bestimmt werden kann (siehe 2.2.3.5.2). Die unterschiedlichen Ansätze wurden im KGB-Puffer getestet und für 24 h bei 37 °C inkubiert und dann mit 95 °C für 10 min erhitzt, um das Protein zu denaturieren, 1x DNA-Auftragspuffer zugefügt und auf ein 5%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

### 3. Ergebnis



**Abbildung 3.6: Titration von  $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$**

Autoradiographische Analyse eines 5%igen Polyacrylamid-Gels mit  $^{32}P$ -markierten PCR-Fragmenten. Mit einer gleichbleibenden DNA Konzentration von 1,3 nM für die spezifische- (SCS-370 Bp) und 1,5 nM für die unспеzifische Zielsequenz (CS-357 Bp) und einer Variation der Proteinkonzentration von 1,3-30 nM, je nach Verhältnis von DNA und Protein. Klar zu erkennen ist eine Zunahme der Spaltung der PCR-Fragmente bei steigender Proteinkonzentration für das spezifische Fragment (SCS-370 Bp). Bei dem unспеzifischen (CS-357 Bp) PCR-Fragment ist keine Spaltung zu erkennen. (S = Substrat; P = Produkte)

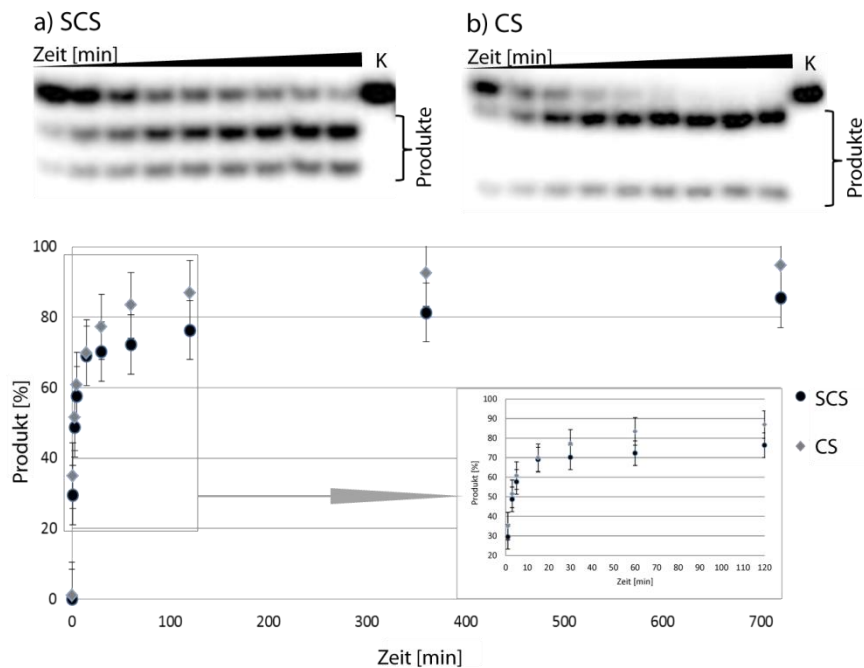
Eine deutliche Zunahme an Produkten der gespaltenen, spezifischen Zielsequenz (SCS-370) sieht man in der Abbildung 3.6 bei den Proteinkonzentrationen 1,3-22,5 nM, wobei das Protein in bis zum 15-fachen Überschuss zur DNA zugegeben wurde. Ab einem DNA:Protein-Verhältnis von 1:20 bis zu einem Verhältnis von 1:400 kann man weder eine deutliche Abnahme der Substrat-DNA noch eine Steigerung an Produktbildung. erkennen (Daten nicht gezeigt). Bei der unспеzifischen Zielsequenz (CS-357) wurde bei keiner untersuchten Proteinkonzentration eine Spaltung festgestellt. Da zwischen den DNA:Protein Verhältnissen von 1: 15 und 1: 20 keine ersichtlichen Unterschiede erkennbar sind, wurden bei allen weiteren Untersuchungen mit einer Proteinkonzentration, die 15-fach über der der jeweiligen DNA-Konzentration liegt, gearbeitet.

#### 3.1.5 Vergleich der enzymatischen Aktivität von $Sce^*_{2}Cre^*$ und $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$

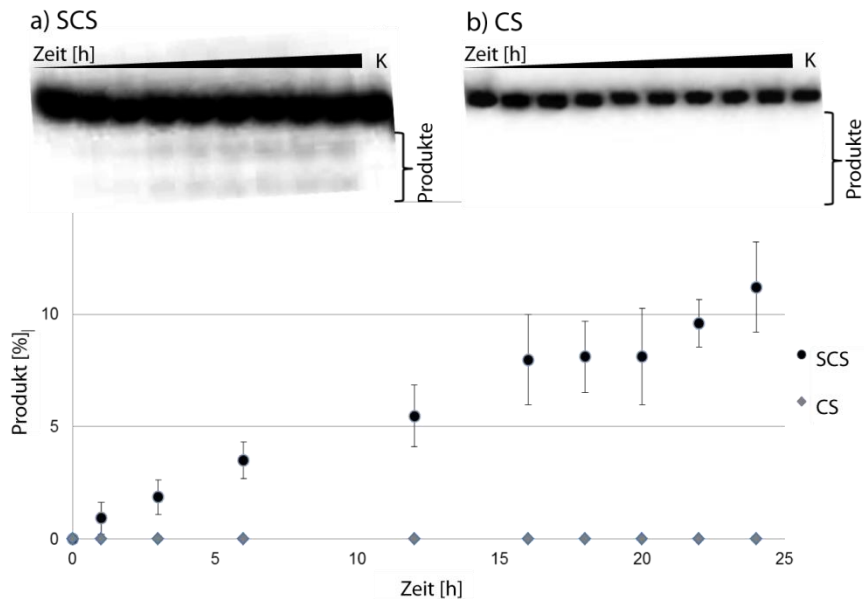
Um eine kinetische Analyse der Enzymvarianten durchzuführen und somit die Aktivitäten des Wt und der Mutante  $Sce^*_{2}Cre^*K139M;Y33C$  zu vergleichen, wurden aus einem Stammreaktionsansatz zu verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen (siehe 2.2.3.5.2). Die entnommenen Reaktionen wurden zugleich gestoppt, wodurch das chronologische Fortschreiten der Reaktion analysiert werden kann.

### 3. Ergebnis

#### A) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*



#### B) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C



#### Abbildung 3.7: Quantitative Analyse der spezifischen und unspezifischen Spaltung

Die autoradiographische Analyse der Spaltungsreaktion (1,2 nM DNA; 18 nM Protein) auf 5%igem Polyacrylamid-Gel von Wt und hergestellter Variante.

A) Sce\*<sub>2</sub>Cre\* nach 1, 3, 5, 15, 30, 60, 120, 360 und 720 min Inkubationszeit bzw. ein Auszug der Zeitpunkte 3, 5, 15, 30, 60 und 120 min.

B) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C nach 1, 3, 6, 12, 16, 18, 20, 22 und 24 h inkubationszeit.

Zu sehen ist die Spaltung der spezifischen (SCS, a) und unspezifischen (CS, b) Zielsequenz der beiden Enzyme. Der Graph zeigt die Auswertungen von jeweils vier analysierten Gelbildern von Produktformation gegenüber der Zeit. (K= Kontrolle, ohne Protein)

Dafür wurden die Proben mit 1x DNA-Auftragspuffer versetzt, auf 95 °C erhitzt, um das Protein zu denaturieren und anschließend auf ein 5%iges Polyacrylamid-Gel



### 3. Ergebnis

aufgetragen. Die Abnahme der [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP markierten PCR-Fragmente mit spezifischer (SCS-370 Bp) oder unspezifischer (CS-357 Bp) Erkennungssequenz, bzw. die Zunahme der jeweiligen Spaltprodukte wurden mit Hilfe des Instant Imagers analysiert und zusammenfassend graphisch in Abbildung 3.7 gegen die Zeit dargestellt.

Die Variante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  weist nach 12 h eine Produktbildung von 6% +/-1% bei der spezifischen Zielsequenz (SCS-370 Bp) auf. Dagegen ist bei der unspezifischen Zielsequenz (CS-357 Bp) keinerlei Spaltaktivität zu erkennen. Bei  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  liegt die Produktbildung nach 720 min (bzw. ebenfalls 12 h) bei 87% +/- 8% für die spezifische und bei 96% +/- 4% für die unspezifische Zielsequenz. Längere Inkubationszeiten mit  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  ergaben keine höheren Produktformationen (Daten nicht gezeigt).

Eine der charakteristischen Konstanten für Enzyme, die Michaelis-Konstante  $K_M$ , kann hier nicht ermittelt und so die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mit anderen Enzymen verglichen werden. Denn hier liegt ein großer Enzymüberschuss gegenüber dem Substrat vor. Außerdem ist die Grundform der Michaelis-Menten-Kinetik eine Hyperbel. Im Falle der getesteten Variante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  hat sich in dem Graphen aber eine sigmoidale Kurve ergeben.

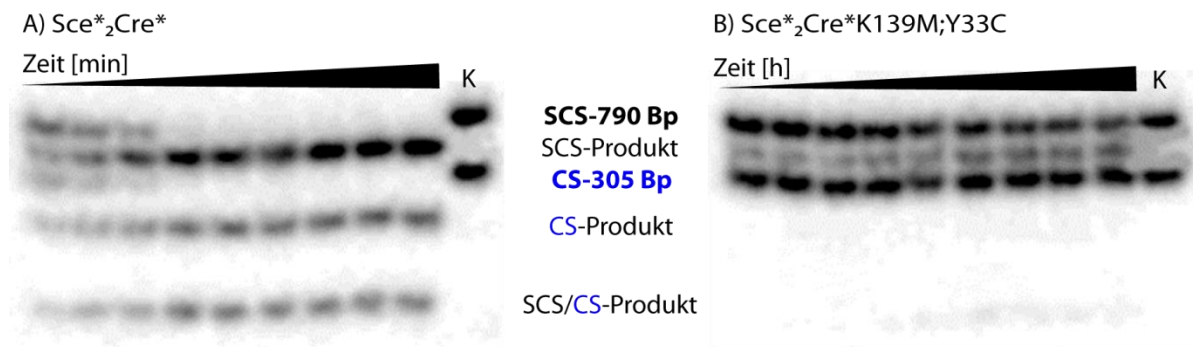
Die katalytische Aktivität von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  ist folglich relativ langsam und die Produktformation (6% +/- 1%) der spezifischen Zielsequenz (SCS-370 Bp) liegt nach 12 h im Vergleich zum Wt um ungefähr 16-fach reduziert vor. Die unspezifische Zielsequenz (CS-357) wird zu keinem gemessenen Zeitpunkt gespalten. Der Wt  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  dagegen präferiert sogar die unspezifische Zielsequenz (CS-357 Bp) vor der spezifischen (SCS-370 Bp), zeigt aber im Gegensatz zu  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  eine schnelle Katalyse im Spalten ihrer Zielsequenz.

Diese Eigenschaften spiegelt auch der *competition*-Test in Abbildung 3.8 wieder. Hierbei wurden den einzelnen Enzymen in einer Spaltreaktion jeweils beide Substrate, also sowohl das spezifische (SCS-790 Bp) als auch das unspezifische (CS-305 Bp), angeboten. Bei dem Wt von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  zeigt sich eine Spaltung beider Sequenzen. Dagegen kann bei der Mutante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  nur eine geringe Spaltung der spezifischen Zielsequenz (SCS-790) beobachtet werden. Darüber hinaus ist die Spaltaktivität dieses Enzyms gegenüber dem Wt  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  *per se* verringert.

Bei  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  zeigt schon die quantitative Analyse in Abbildung 3.7 eine Präferenz für das Spalten der unspezifischen (CS-357 Bp) gegenüber der spezifischen Zielsequenz

### 3. Ergebnis

(SCS-370 Bp), was sich im *competition*-Test in Abbildung 3.8 ebenfalls widerspiegelt.



#### Abbildung 3.8: Competition Spaltaktivitätstest

Autoradiographische Analyse der Spaltreaktion auf einem 5%igem Polyacrylamid-Gel mit spezifischer (SCS-790 Bp) und unspezifischer Zielsequenz (CS-305 Bp) in *competition* (1,4 nM SCS; 1,4 nM CS; 42 nM Protein).

A) Sce\*<sub>2</sub>Cre\* nach 1, 3, 5, 15, 30, 60, 120, 360 und 720 min Inkubationszeit.

B) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C nach 1, 3, 6, 12, 16, 18, 20, 22 und 24 h Inkubationszeit.

(K = Kontrolle, ohne Protein)

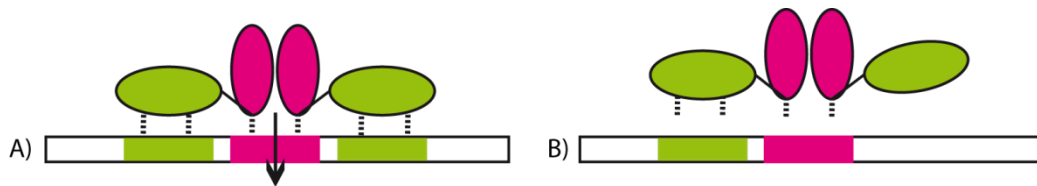
Die DNA-Substrate (SCS-790 Bp und CS-305 Bp) des *competition*-Assays scheinen zudem gegenüber den Substraten in der quantitativen Analyse (SCS-370 Bp und CS-305 Bp) noch etwas schneller vom Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* gespalten zu werden, wenn man die Abbildungen 3.7 und 3.8 miteinander vergleicht. Zum einen kann dies reaktionsbedingt durch nicht zu beeinflussende Bedingungen passieren und zum anderen kann es auch unter der erhöhten DNA- und Proteinkonzentration in einer Reaktion zu solch einem Ergebnis kommen.

#### 3.1.6 Bindung der Zielsequenzen

Da Sce\*<sub>2</sub>Cre\* aus verschiedenen Proteindomänen mit jeweils unterschiedlicher Affinität zur Erkennungssequenz besteht (siehe 1.3.2.), kann die Bindung des Fusionsproteins auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Die neu hergestellten Varianten des Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* lassen nicht nur die Aktivität des Enzyms spezifischer werden, sondern sollen im optimalen Fall auch die Affinität der I-Cre\*-Spaltdomäne im Fusionsprotein etwas herabsetzen, damit die Bindungsstärke der jeweiligen Proteindomänen im Fusionsprotein relativ ähnlich sind. Sind die Wechselwirkungen bereits zu Teilen der Zielsequenz sehr stark, kann das jeweilige Fusionsprotein auch unspezifische Zielsequenzen (in diesem Fall CS, aber auch C) binden. Sind die Wechselwirkungen, wie in Abbildung 3.9 aber schwächer, braucht das Fusionsprotein

### 3. Ergebnis

unbedingt seine komplette bzw. spezifische Erkennungssequenz SCS, um an die DNA binden zu können.



**Abbildung 3.9: Theoretische Wechselwirkungen von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  zur Zielsequenz**

Beispiel des Bindeverhaltens des Fusionsproteins bei relativ gleicher Affinität der einzelnen Proteindomänen.

A) Bei einer schwachen Wechselwirkung des Fusionsproteins zur Zielsequenz braucht es die spezifische Zielsequenz (SCS) damit das Protein binden kann.

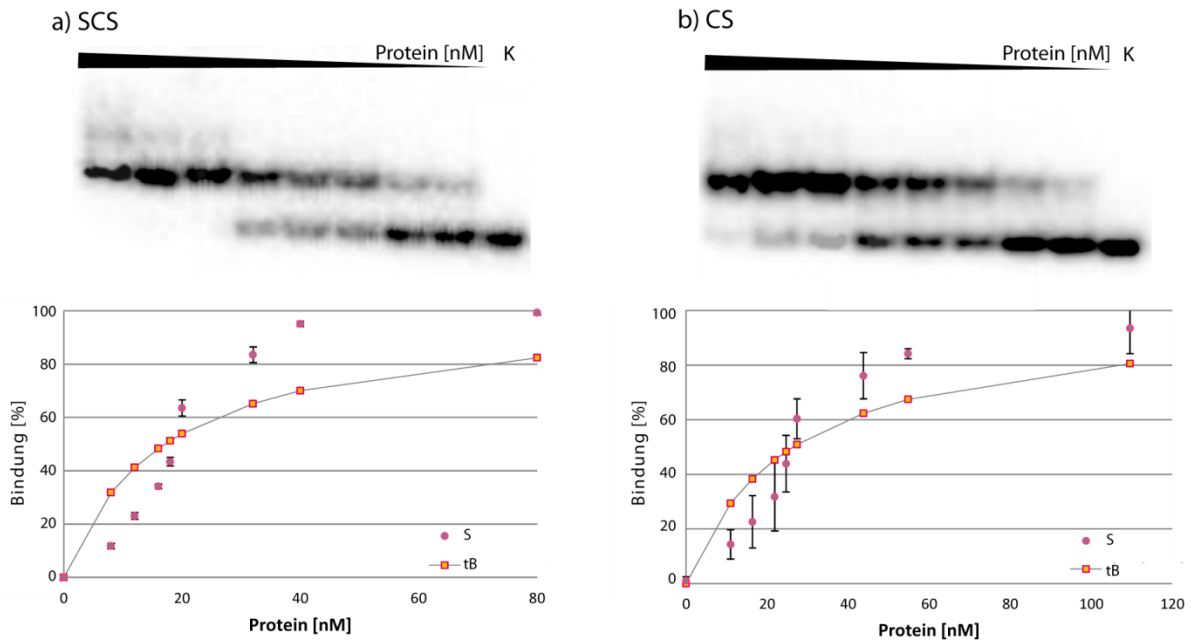
B) Ein Binden, an die unspezifische Zielsequenz (CS) ist durch die geringen Wechselwirkungen zur DNA nicht möglich. (Pfeil = Spaltung der DNA)

Um aufklären zu können, ob evtl. eine schlechtere Bindung die katalytischen Eigenschaften von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  herabsetzt und die Bindungseigenschaften mit  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  oder auch mit I-CreI und I-SceI vergleichen zu können, wurden mit Hilfe der quantitativen *Bandshift*-Analyse (siehe 2.2.3.6) weitere Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden PCR-Fragmente mit spezifischer (SCS-370) oder unspezifischer (CS-357) DNA mittels  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dATP markiert (siehe 2.2.1.8.4). Die Quantifizierung der Bandenintensitäten von ungebundenen (ungeshifteten) und gebundenen (geschifteten) DNA-Fragmenten des EMSA erfolgte anschließend über den Instand Imager und dessen Software.

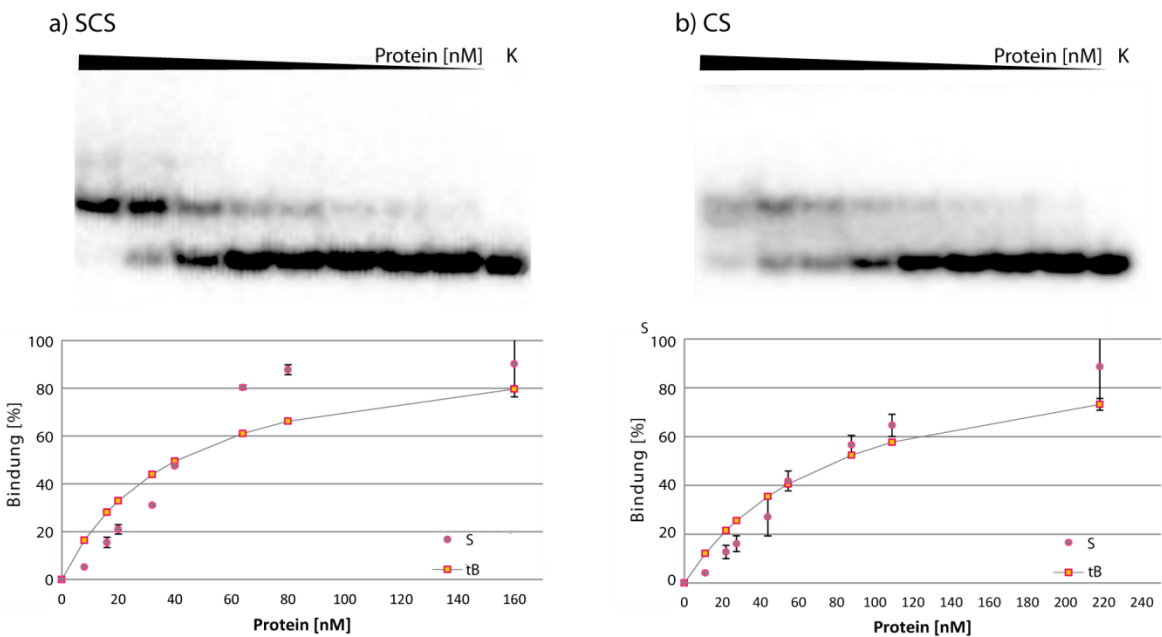
Die theoretische Bindungskurve in Abbildung 3.10 zeigt zwar einen hyperbolischen Kurvenverlauf, da aber die Bindung einen sigmoidalen Kurvenverlauf aufweist, ist die Messung nicht auswertbar und somit der  $K_D$ -Wert nicht bestimmbar. Dies wird durch die stark unterschiedlichen Werte des Shifts gegenüber dem theoretisch gebundenen Protein zusätzlich verstärkt. Die erhöhten Konzentrationen der Enzyme lassen auch ohne direkten  $K_D$ -Wert-Vergleich eine wesentlich schwächere Bindung der Fusionsproteine relativ zu I-CreI und I-SceI registrieren.

### 3. Ergebnis

#### A) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*



#### B) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C



#### Abbildung 3.10: Quantitative Bandshift-Analyse

Die Untersuchung zur Bindung von Wt und Variante wurde mittels EMSA durchgeführt. Dabei wurde bei konstanter DNA Konzentration (SCS= 1 nM; CS= 1,3 nM) die Proteinkonzentration immer weiter erhöht bis sich eine Sättigung einstellt.

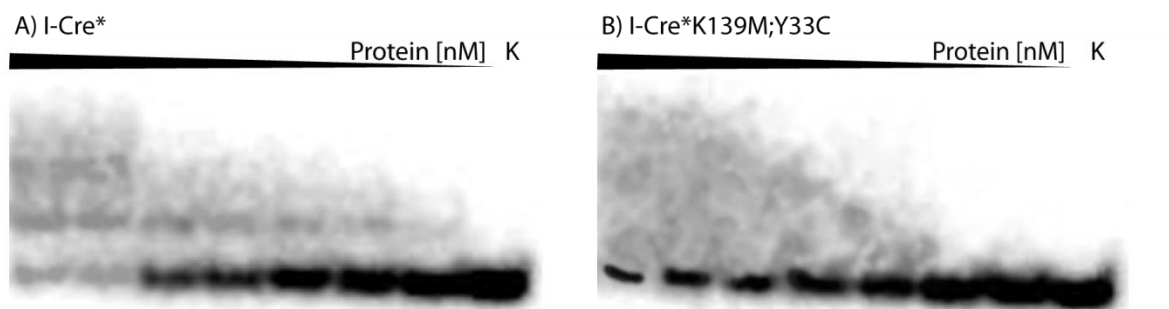
A) Sce\*<sub>2</sub>Cre\* mit 8, 12, 16, 18, 20, 32, 40, 80 nM für die spezifische (SCS= 1 nM, a) und mit 11, 16, 22, 25, 27, 44, 55, 110 nM für die unspezifische Zielsequenz (CS= 1,3 nM, b).

B) Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C mit 8, 16, 20, 32, 40, 64, 80, 160 nM für die spezifische (SCS= 1 nM, a) und mit 11, 22, 27, 44, 55, 88, 110, 218 nM für die unspezifische Zielsequenz (CS= 1,3 nM, b).

Die Graphen zeigen die Auswertungen von jeweils drei analysierten Autoradiographien von Shift gegen Proteinkonzentration (S= Shift, tB= theoretische Bindung). (K= Kontrolle, ohne Protein)

### 3. Ergebnis

Bei  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  sieht man bei einer Konzentration von 80 nM eine Sättigung des Shifts bei 97% für die spezifische Zielsequenz (SCS-370) und eine 95%ige Sättigung der Bindung bei einer Proteinkonzentration von 110 nM für die unspezifische (CS-357) Zielsequenz. Bei  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  ist bei einer Konzentration von 160 nM eine Sättigung des Shifts bei 91% für die spezifische Zielsequenz (SCS-370) und eine 90%ige Sättigung der Bindung bei einer Proteinkonzentration von 218 nM zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  (und  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M}$ , Daten nicht gezeigt) eine etwa gleich große Affinität zur spezifischen (SCS-370) sowie zur unspezifischen (CS-357) Zielsequenz besitzt. Die Bindungsstärke ist bei  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  etwas geringer im Vergleich zu  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$ , da hier die Sättigung der Bindung erst bei einer doppelt so hohen Proteinkonzentration eintritt und die Sättigung der Bindung bei ~90% liegt, im Gegensatz zu ~96% für  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$ .



**Abbildung 3.11: Bandshift-Analyse von I-CreI Varianten**

Autoradiographische Untersuchung zur Bindung von A) I-Cre\* und B) I-Cre\*K139M;Y33C an die spezifische (SCS-370) Zielsequenz wurde mittels EMSA durchgeführt. Dabei wurde bei konstanter DNA-Konzentration (SCS= 1nM) die Proteinkonzentration immer weiter erhöht.

(A= 8, 12, 16, 18, 20, 32, 40nM; B= 8, 16, 20, 32, 40, 64, 80nM)

(K= Kontrolle, ohne Protein)

Da im Fusionsprotein die Spaltdomäne aus I-CreI\* besteht, wurden die I-CreI-Varianten I-Cre\* (I-CreI;G19S) und I-Cre\*K139M;Y33C (siehe 2.2.1.10) durch Protein *engineering* hergestellt und auf ihre Bindung getestet. Die Intention dabei war, eine bessere Aussage über die Bindung der Spaltdomäne (I-Cre\*) im Fusionsprotein treffen zu können. Dabei wurden die gleichen radioaktiv markierten DNA-Fragmente wie zuvor und auch die gleichen Proteinkonzentrationen im Reaktionsansatz der jeweils gleichen Mutationen gewählt.

Bei I-Cre\* in Abbildung 3.11 ist genau wie bei den Fusionsproteinen in Abbildung 3.10 nicht nur ein Shift sondern zwei Shifts zu erkennen. Bei I-Cre\*K139M;Y33C ist gar kein spezifischer Shift und somit keine Bindung an die Zielsequenz zu sehen. Die Bande des DNA-Substrats nimmt aber ähnlich wie bei

### 3. Ergebnis

I-Cre\* ab je höher die Proteinkonzentration ist und das radioaktive „Hintergrundrauschen“ nimmt zu.

In Bezug auf das Fusionsprotein bedeutet dies, dass bei Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C die Untereinheiten der Spaltdomäne kaum oder gar keine Bindung mehr aufweist und somit die einzige spezifische Bindung zur Zielsequenz von der Bindungsdomäne I-Sce\* ausgeht. Daher muss die Affinität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C gegenüber dem Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* sogar niedriger sein.

## 3. Ergebnis

### 3.2 *Directed evolution* von I-CreI

Viele Eigenschaften von Enzymen werden in der Natur durch natürliche Selektion weiter entwickelt (wie z.B. Aktivität und Spezifität). durch *directed evolution* versucht man die verschiedenen Eigenschaften von Proteinen künstlich zu optimieren, um große Datenbanken der Sequenzen von neu entstandenen Enzymen besser analysieren und selektieren zu können, ohne sie dabei exprimieren und aufreinigen zu müssen [98-100], was eine enorme Zeitersparnis darstellt. Der F'o-cre-Assay von Seligmann *et al.* [108], ist z.B. ein solches *screening* und gibt schnelle Antworten über Spezifität und Aktivität von neu generierten Mutanten (siehe 1.3.3.1 und Abbildung 1.12). Ein *in vivo* Bindungs-Assay steht bis heute für HE nicht zur Verfügung. Dabei könnte dieser sehr hilfreich für das Auffinden von noch aktiveren und spezifischeren Enzymen sein. Ebenso könnte dieser Assay bei der Selektion von neuen Enzymvarianten mit veränderten bzw. neuen Erkennungssequenzen aus dem menschlichen Genom helfen. Bislang wurden die Gene *XPC* [38] und *RAG1* [77, 78] als neue Zielsequenzen von generierten I-CreI-Varianten für den zielgerichteten Austausch an menschlichen Genen verwendet.

Deshalb wurde versucht einen stabilen Bindungs-Assay zu entwickeln.

#### 3.2.1 Prinzip des Bindungs-Assays

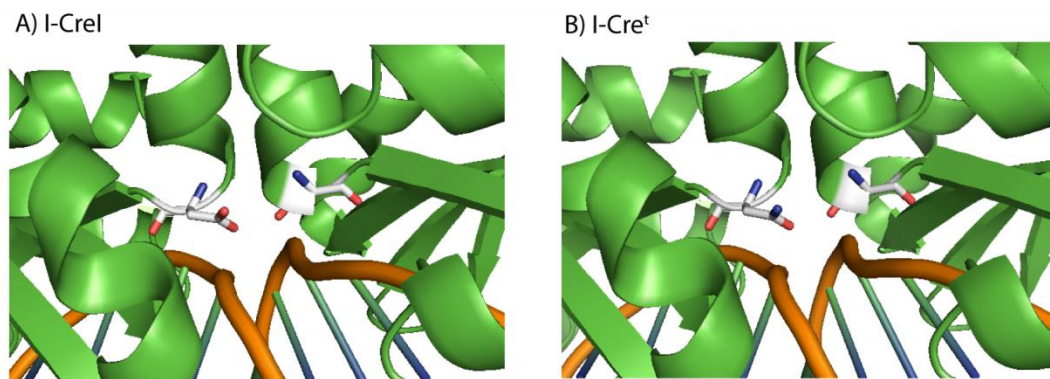
Der Bindungs-Assay sollte in dieser Arbeit dazu dienen, durch *directed evolution* schnell neue Varianten aus einer katalytisch inaktiven Form der HE I-CreI [95] mit verbesserter Spezifität, Affinität oder veränderter Erkennungssequenz herstellen zu können. Ohne dabei jede einzelne Mutante zu exprimieren, aufreinigen und testen zu müssen. Außerdem könnte ein stabiler Bindungs-Assay dazu verhelfen die Spaltdomäne des hergestellten Fusionsproteins  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  aus Kapitel 3.1 zu optimieren. Ein *screening* von I-CreI-Varianten mit geänderter Affinität zur Erkennungssequenz könnte auf die Spaltdomäne des Fusionsproteins übertragen werden, so dass das Enzym unter physiologischen Bedingungen die Zielsequenz hochspezifisch spalten kann, ohne dabei an Aktivität zu verlieren.

Als Basis zur Entwicklung dieser neuen Selektionsmethode dient der F'o-cre-Assay von Seligman *et al.* [108] (Abbildung 1.12), der nach dem Prinzip der blau/weiß-Selektion [126, 127] funktioniert.

### 3. Ergebnis

Durch das gezielte Austauschen der 20. Aminosäure am Ende der LAGLIDAG-Helix, von Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N) wurde die katalytisch inaktive HE I-Cre<sup>t</sup> aus I-CreI hergestellt (siehe Abbildung 3.12, 2.2.1.10). Das neu generierte Enzym schneidet die Zielsequenz nicht (Daten nicht gezeigt) und zeigt keine Verringerung der Affinität zur Erkennungssequenz ( $K_D = 0,2 \pm 0,1$ ; siehe 7.1). So kann die inaktive HE I-Cre<sup>t</sup> als „Basisenzym“ für die Entwicklung des Bindungs-Assays eingesetzt werden. Wie in Abbildung 3.12 dargestellt, besteht der Bindungs-Assay, wie fast jeder bis heute existierende Selektions-Assay für HE [93, 104, 106], aus einem Zweiplasmidsystem. Dies umfasst hier ein Target- und ein Endo-Plasmid (2.2.1.11 und 2.2.1.12). Das heißt, es werden zwei Plasmide in eine *E. coli*-Zelle transformiert (2.2.2.5 Kotransformation), die unter bestimmten Umständen zusammen in einer Zelle koexistieren können. Das Endo-Plasmid trägt ein Gen für die katalytisch inaktive HE I-Cre<sup>t</sup> oder eine durch Protein *engineering*, *error-prone*-PCR oder *DNA-shuffling* hergestellte neuen Variante.

Die inaktive Form des Enzyms ist Voraussetzung für den Bindungs-Assay, denn ansonsten würde die HE ihre Zielsequenz nicht nur binden, sondern auch spalten und die Zellen würden unter den gegebenen Rahmenbedingungen (später erläutert) absterben.



**Abbildung 3.12: Herstellung der katalytisch inaktiven Mutante I-Cre<sup>t</sup>**

A) Die aktiven Asparaginsäurereste an 20. Position von I-CreI

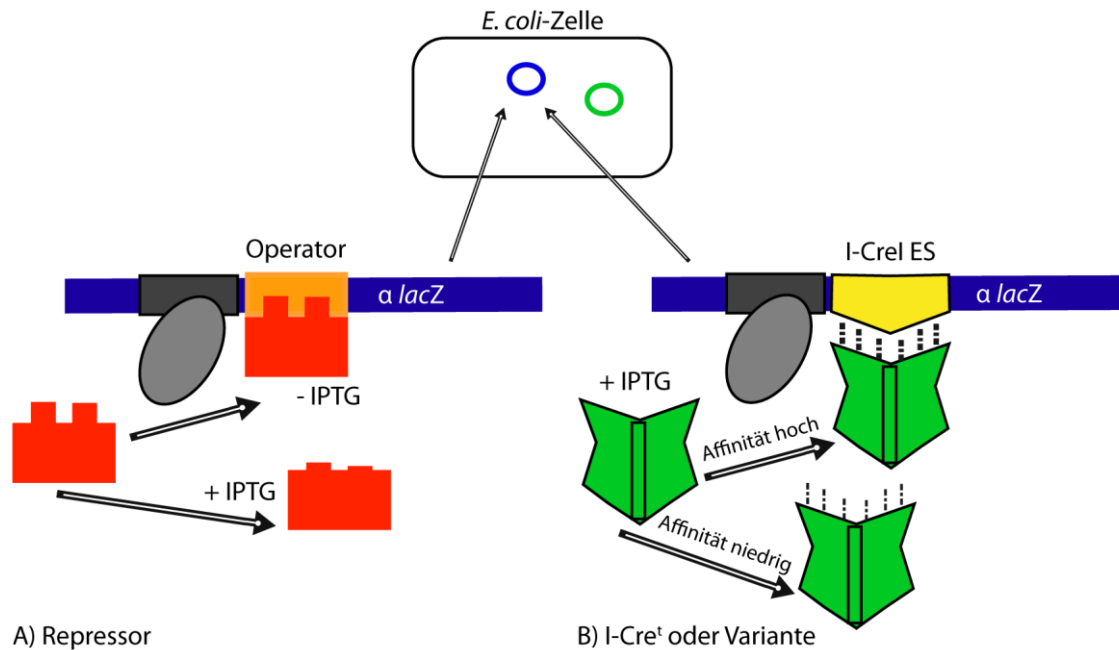
B) Für die Variante I-Cre<sup>t</sup> wurden die Asparaginsäurereste durch gezielten Aminosäureaustausch von Asparaginresten ersetzt. Die daraus entstandene katalytisch inaktive Variante kann die Zielsequenz nicht mehr spalten und kann in dieser Form für den Bindungs-Assay eingesetzt werden.

Das Target-Plasmid dient als Selektionsvektor und kodiert für das *lac*-Operon und erlaubt eine blau/weiß-Selektion der Zellen (Abbildung 3.13). Die zu transkribierenden Strukturgene, innerhalb des *lac*-Operons beinhalten die



### 3. Ergebnis

$\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase mit vorgeschalteter Erkennungssequenz für I-CreI bzw. I-Cre<sup>t</sup> oder als Kontrolle eine Operatorsequenz direkt nach der Promotorsequenz, dem Transkriptionsstartpunkt der Polymerase. Somit würde beim Bindungs-Assay nicht mehr der am Operator gebundene Repressor (außer bei der Kontrolle), sondern I-Cre<sup>t</sup> oder eine Variante die Transkription der Gene blockieren.



**Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Zwei-Plasmidsystems im Bindungs-Assay**

Das Target- (blau) und das Endo-Plasmid (grün) werden gleichzeitig in eine *E. coli*-Zelle transformiert. Das Endo-Plasmid codiert I-Cre<sup>t</sup> oder eine Variante. Das Target-Plasmid beinhaltet das Lac-Operon mit Promoter an dem die RNA-Polymerase (grau) zur Transkription der Gene binden kann. Beim Kontrollplasmid A) kann der Repressor (rot) in Abwesenheit von IPTG an den Operator (orange) binden und blockiert die Expression. Die Zellen bleiben weiß. Ebenso kann beim Target-Plasmid B) mit der I-CreI Erkennungssequenz (gelb) I-Cre<sup>t</sup> oder eine Variante (grün) mit hoher Affinität binden und die Expression der Strukturgene blockieren. Bei A) Anwesenheit von IPTG in der Zelle kann der Repressor nicht mehr am Operator oder bei Anwesenheit B) von I-Cre<sup>t</sup> Varianten mit niedriger Affinität kann die HE nicht mehr die Erkennungssequenz (ES) binden. Die RNA-Polymerase kann ungehindert transkribieren,  $\beta$ -Galaktosidase kann gebildet werden und die Zellen färben sich blau.

Bei Induktion und hoher Affinität von I-Cre<sup>t</sup> oder einer Varianten könnte das Enzym an die Erkennungssequenz binden. Genau wie beim Binden des Repressors an den Operator würde keine  $\beta$ -Galaktosidase gebildet werden. Die Transkription der RNA-Polymerase würde durch die Bindung des Enzyms an seine Erkennungsstelle blockieren und die Bakterienkolonien bleiben, durch fehlende  $\beta$ -Galaktosidase Expression, weiß. Ist die Affinität der HE niedrig, kann die I-Cre<sup>t</sup>-Variante nicht binden, die RNA-Polymerase kann die Strukturgene transkribieren und  $\beta$ -Galaktosidase wird gebildet. Die Kolonien färben sich blau. Diese Varianten sind

### 3. Ergebnis

für den Bindungs-Assay uninteressant und werden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Würde nun jedoch eine aktive Variante von I-Cre<sup>t</sup> die dem *lac*-Operon vorgeschaltete Zielsequenz des Enzyms spalten, hätte dies die Degradierung des Plasmids zur Folge. Da das Target-Plasmid auf Grund seiner Antibiotikaresistenz notwendig ist, um die Zellen auf den Selektiv-Agarplatten (siehe 2.2.2.1) und den Selektionsagarplatten (siehe 2.2.2.2) überleben zu lassen, würde eine aktive Enzymvariante das Absterben der Bakterien nach sich ziehen.

#### 3.2.2 Validierung der alpha-Komplementation *in vivo*

Um eine Antwort über die Affinität von I-Cre<sup>t</sup> oder einer Varianten *in vivo* zu bekommen, ist die Färbung für die Selektion der Zellen essentiell. Daher ist in erster Linie von großer Bedeutung, welche *E. coli*-Zellen für den Selektionstest verwendet werden. Wichtig dabei ist, dass die Zellen das  $\omega$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ* $\Delta$ M15) und den *lac*-Repressor (*lacI*) zur Kontrolle exprimieren können.

Das *lacZ*-Gen auf dem Target-Plasmid kodiert für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase, das alleine keine Aktivität besitzt. Durch Komplementation mit dem ebenfalls inaktiven C-terminalen  $\omega$ -Fragment wechselt die  $\beta$ -Galaktosidase erst in die aktive Form über. Deswegen sollte das C-terminale  $\omega$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase im Genom der Zelle kodiert vorliegen. Die aktive  $\beta$ -Galaktosidase kann die Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) zu Galaktose und dem Indikatorfarbstoff 5-Brom-4-chlor-indoxyl katalysieren und die Zellen blau färben.

Als Kontrollvektor für die Blaufärbung wurde das *high copy*-Plasmid pUC19 (pMB1 Ori) eingesetzt. Dieses wurde in verschiedene *E. coli*-Zellen transformiert, auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert (siehe 2.2.2.1) und anschließend auf die Selektionsagarplatte 40/0,2 (mit 40  $\mu$ g / ml X-Gal; 0,2 mM IPTG; siehe Tab. 2.13), die als Standard bei einer blau/weiß-Selektion eingesetzt wird, übertragen. Die Ergebnisse des blau/weiß-Tests sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2: Blau/weiß Test an verschiedenen *E. coli*-Zellen mit pUC19-Vektor**

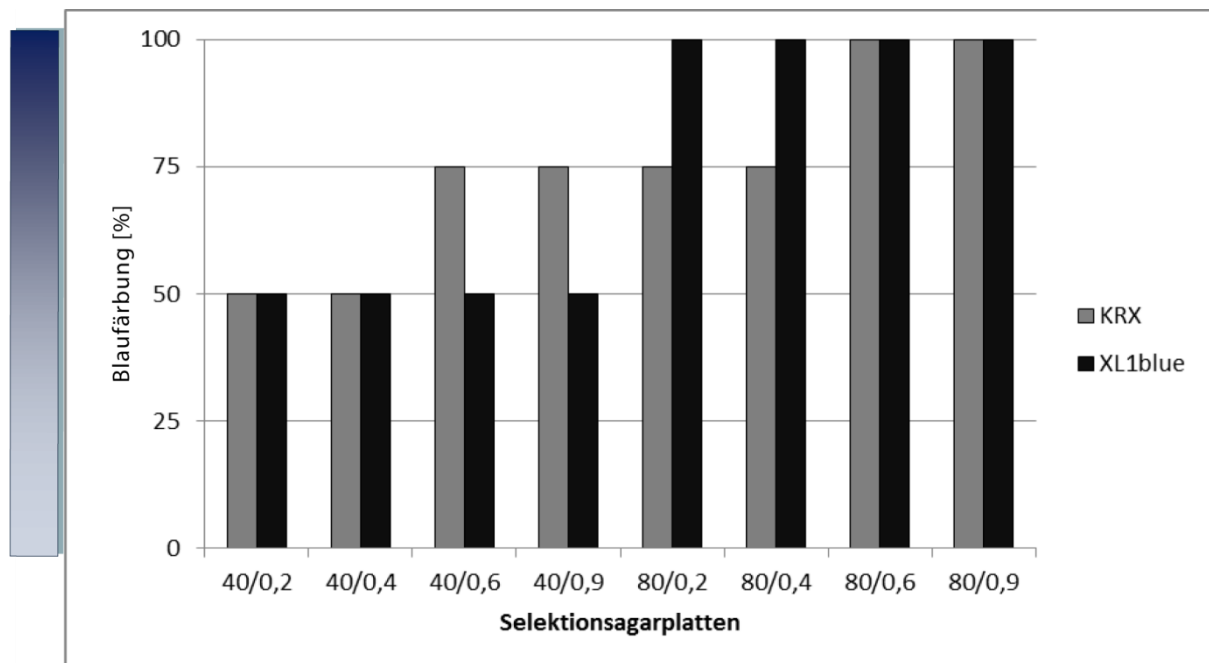
Zellen	Platten mit X-Gal	Platten mit X-Gal/IPTG
DH5 $\alpha$	blau	blau
DH5 $\alpha$ +pLACI	weiß	blau
Turbo	weiß	blau
XL1blue	weiß	blau
KRX	weiß	blau

### 3. Ergebnis

Die DH5 $\alpha$ -Zellen dienen hier als Kontrolle, da sie kein *lacI*-Gen besitzen. Zu Testzwecken wurde pLACI, welcher für den Repressor kodiert kotransformiert. [1]

Auf Grund der stabilen Färbung und des regelmäßigen Wachstums wurden die weiteren Untersuchungen mit XL1blue- und KRX-Zellen durchgeführt. Die *E. coli*-Kolonien des Turbo-Stammes waren teilweise unförmig.

Um eine maximal kräftige und stabile Färbung zu erreichen, wurden Selektionsagarplatten mit verschiedenen Konzentrationen an X-Gal und IPTG hergestellt (siehe Tab. 2.13) und die Färbung der KRX- und XL1blue-Zellen mit transformiertem pUC19 Vektor getestet. Dabei wurde diesmal die Intensität der Blaufärbung differenzierter festgelegt als zuvor und die Blaufärbung mit 0%-Färbung der Zellen als weiß, mit 25%-Färbung mit hellblau, mit 50%-Färbung als mittelblau, mit 75%-Färbung als blau und mit 100%-Färbung als dunkelblau bezeichnet.



**Abbildung 3.14: Blaufärbung von KRX- und XL1blue-Zellen**

Das *high copy*-Plasmid pUC19 wurde in KRX- oder XL1blue-*E. coli*-Zellen transformiert und auf Selektionsagarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an X-Gal und IPTG ausplattiert. Dabei zeigten die KRX-Zellen eine sensitive und intensive Blaufärbung.

(Selektionsagarplatte 80/0,6 enthält z.B. 80  $\mu$ g/ml X-Gal und 0,6 mM IPTG, siehe Tab. 2.13)

Aufgrund der sensitiven, aber intensiven Blaufärbung in Abbildung 3.14, wurde entschieden, mit den KRX-Zellen auf den Selektionsagarplatten 80/0,6 (unter 80  $\mu$ g/ml X-Gal und 0,6 mM IPTG, siehe Tab. 2.13) weiter zu arbeiten.

## 3. Ergebnis

### 3.2.3 Zwei-Plasmidsystem

Je nach Replikationsursprung eines Plasmids liegen in einer Bakterienzelle wenige (*low copy*-Plasmid) oder sehr viele Kopien (*high copy*-Plasmid) des Vektors in einer *E. coli*-Zelle vor. Durch eine Kotransformation (siehe 2.2.2.6) können zwei verschiedene Plasmide in eine *E. coli*-Zelle gebracht werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass Plasmide des gleichen Replikationsursprungs durch korrelative Inkompatibilität nicht in einer Zelle koexistieren können. Das bedeutet, dass das Target- und das Endo-Plasmid in dem Zwei-Plasmidsystem jeweils einen unterschiedlichen Replikationsursprung benötigen und die generierten Vektoren somit immer in einer ungleichen Anzahl in der Zelle vorliegen. Dies kann für den Bindungs-Assay mit einem blau/weiß-*screening* Probleme mit sich bringen. Denn entweder liegt eine größere Anzahl des Target- oder des Endo-Plasmids vor.

**Tab.: 3.3: Eigenschaften der Target- und Endo-Plasmide**

Nomenklatur	Replikationsursprung	Copy-Nummer	Antibiotika-Selektion
<b>Target-Plasmid</b>			
pLCL3-HSCR	p15A	10-12	Cam
pHAL3-HSCR	pMB1	500-700	Amp
<b>Endo-Plasmid</b>			
pEG3-Cre <sup>t</sup>	pMB1	500-700	Amp
pRG3-Cre <sup>t</sup>	pRSF1030	>100	Kan
pLG3-Cre <sup>t</sup>	p15A	10-12	Cam

Beim Target-Plasmid muss daher getestet werden, wie viele Kopien eines Plasmids vorhanden sein müssen, um eine gute Produktion von  $\beta$ -Galaktosidase zu gewährleisten und eine stabile Blaufärbung der Zellen erzeugen zu können.

Das Endo-Plasmid sollte in so vielen Kopien in der Zelle vorhanden sein, dass genügend I-Cre<sup>t</sup> gebildet werden kann, um eine abgesättigte Bindung der Erkennungssequenzen im Target-Plasmid zu erhalten und die Transkription der Strukturgene zu unterdrücken, so dass die Kolonien weiß bleiben. Es dürfen jedoch nicht so viele Enzyme gebildet werden, dass sie für die Zelle toxisch werden könnten. Deshalb wurden die in Tabelle 3.3 beschriebenen Plasmide hergestellt und durch Kotransformation getestet.

Um die Kontinuität der blau/weiß-Selektion der Zellen effektiver kontrollieren zu können, wurden die Target-Plasmide pLCL3-LACO und pHAL3-LACO mit religierter

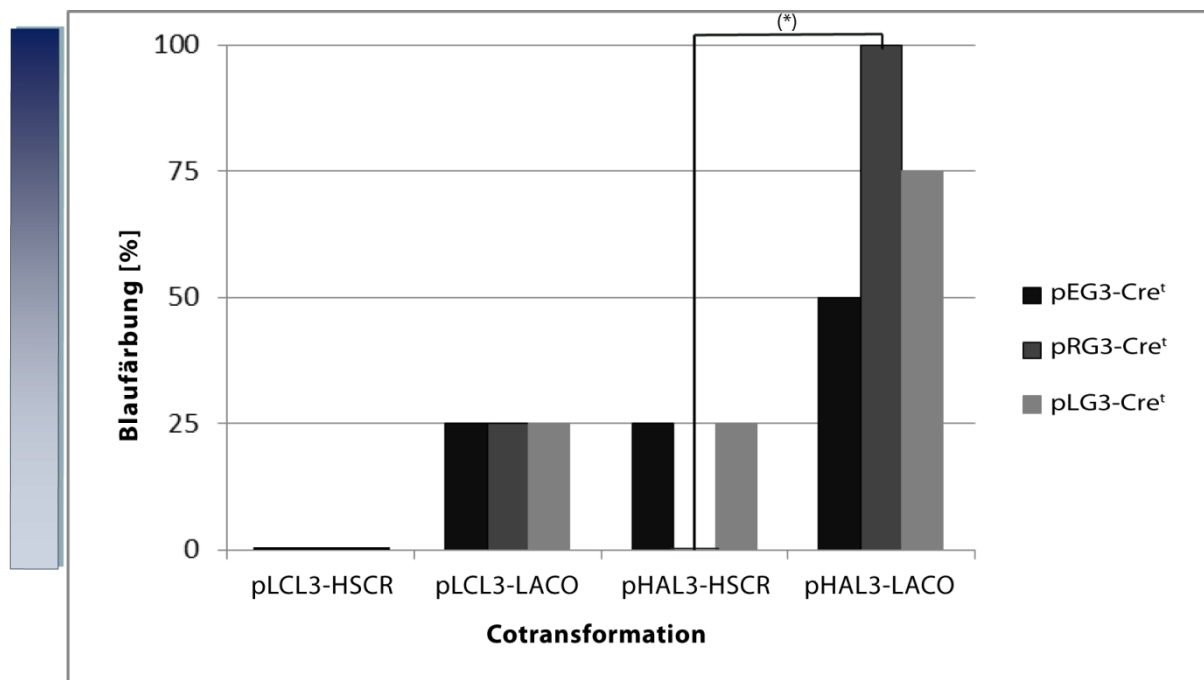
### 3. Ergebnis

Operatorsequenz (anstelle der I-CreI-Erkennungssequenz) als Kontrollen hergestellt (siehe 2.2.1.11 und 2.2.1.12).

Als zusätzliche Kontrolle wurden die verwendeten Selektionsagarplatten 80/0,6 ohne den Induktor IPTG hergestellt. Ohne IPTG unterbleibt die Expression der HE, die Strukturgene werden nicht blockiert, es kommt zur Expression von  $\beta$ -Galaktosidase und die Zellen färben sich blau.

Die Kontrollplasmide pLCL3-LACO und pHAL3-LACO bringen dagegen ohne IPTG weiße Kolonien hervor. Der Repressor lacI bindet in diesem Fall an den Operator, verhindert so die Transkription und die Zellen bleiben weiß. Erst durch Zugabe von IPTG bzw. durch das IPTG in den Selektionsagarplatten kann eine Konformationsänderung des Repressors erfolgen und dieser von der Operatorsequenz gelöst werden, damit die Transkription nun gestartet und sich so die Zellen durch Expression von  $\beta$ -Galaktosidase blau färben.

Die hergestellten Target- und Endo-Plasmide aus Tab. 3.3 wurden in allen möglichen Kombinationen in KRX-Zellen kotransformiert und auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert und weiter auf die Selektionsagarplatten 80/0,6 (siehe Tab. 2.13) übertragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 zusammengefasst.



**Abbildung 3.15: Bindungs-Assay mit verschiedenen Target- und Endo-Plasmiden**

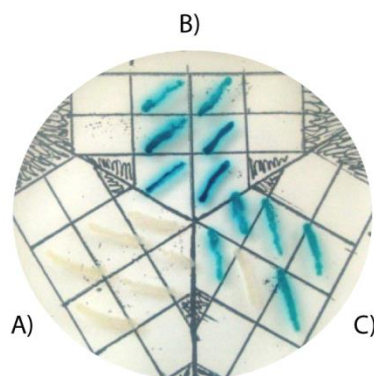
Die in Tabelle 3.4 aufgeführten Target- und Endo-Plasmide wurden in allen möglichen Kombinationen auf den Selektionsagarplatten 80/0,6 (siehe Tab. 2.13) getestet. Dabei zeigte die Cotransformation von dem Target-Plasmid pHAL3-HSCR bzw. der Kontrolle pHAL3-LACO mit dem Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> das erwünschte Ergebnis (\*).

### 3. Ergebnis

Die Kotransformation des *low copy*-Target-Plasmids pLCL3-HSCR mit den jeweiligen Endo-Plasmiden führte zum Anwachsen von weißen Zellen. Allerdings zeigt die Kontrolle pLCL3-LACO nur eine hellblaue Färbung der Zellen und damit keine intensive Blaufärbung auf. Für das *high copy*-Target-Plasmid pHAL3-HSCR verhält es sich anders. Hier konnten durch Kotransformation mit dem Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> weiße Zellen herangezogen werden. Die Kotransformation mit den Endo-Plasmiden pEG3-Cre<sup>t</sup> und pLG3-Cre<sup>t</sup> färbten die Zellen hellblau. Was eine komplette Inhibition der  $\beta$ -Galaktosidase bei dem Target-Plasmid pHAL3-HSCR ausschließt. Lediglich das *middle copy*-Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> ist in der Lage so viel Enzym zu exprimieren, dass die Erkennungssequenzen des Target-Plasmides pHAL3-HSCR gebunden vorliegen und die Transkription des  $\alpha$ -Fragments der  $\beta$ -Galaktosidase blockiert wird.

Die Kontrolle mit der Kotransformation des *high copy*-Target-Plasmids pHAL3-LACO und den jeweiligen Endo-Plasmiden zeigen eine mittelblaue bis dunkelblaue Färbung der Zellen. Die Kotransformation von pRG3-Cre<sup>t</sup> mit dem Target-Plasmid pHAL3-LACO als Kontrolle führt auf den Selektionsagarplatten 80/0,6 (Tab. 2.13) zu der dunkelsten Blaufärbung und mit pHAL3-HSCR, durch Blockade der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression mit I-Cre<sup>t</sup>, zu weißen Zellen.

Die Kontrollen mit den Selektionsagarplatten 80/0,6 ohne IPTG zeigten bis auf eine Kotransformation die zuvor beschriebenen Ergebnisse. Die Kontrolle der Kotransformation von pEG3-Cre<sup>t</sup> mit pLCL3-HSCR färbte sich auf den Kontroll-Selektionagarplatten lediglich hellblau (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.16: Bindungs-Assay auf Selektionsagarplatte 80/0,6 (siehe Tab. 2.13)**

Die Cotransformation des *high copy*-Target-Plasmids gemeinsam mit dem *middle copy*-Endo-Plasmid führten zum gewünschten Ergebnis. Durch Cotransformation mit pHAL3-HSCR und pRG3-Cre<sup>t</sup> A) bleiben die Zellen weiß. Die Kontrollen bzw. Cotransformationen von pUC19 Vektor mit pRG3-Cre<sup>t</sup> B) oder pHAL3-LACO mit pRG3-Cre<sup>t</sup> C) führten jeweils zur Expression von  $\beta$ -Galactosidase und somit zu blauen Zellen.

### 3. Ergebnis

Zusammenfassend hat die Kotransformation mit einem *high copy*-Target-Plasmid und dem *middle copy* Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup>, wie in Abbildung 3.16 zu sehen, zum erwünschten Ergebnis geführt.

#### **3.2.4. Bindungs-Assay mit I-Cre<sup>t</sup>-Varianten**

Des Weiteren wurden die Mutanten I-Cre<sup>t\*</sup> (I-Cre<sup>t</sup>G19S) und I-Cre<sup>\*t</sup>K139M;Y33C hergestellt (2.2.1.10). Die zuvor schon im Fusionsprotein verwendeten Mutationen sind wohl bekannt und eignen sich optimal, um die Funktion des Bindungs-Assays weiter zu untersuchen. Denn diese Varianten zeigen in ihren Bindungseigenschaften zur DNA eine geringere Affinität (siehe 3.1.6 und Abbildung 3.11). Allerdings wachsen die Zellen bei einer Kotransformation mit pHAL-HSCR und den I-Cre<sup>t</sup>-Varianten zwar im Flüssigmedium und auf Selektiv-Agarplatten, aber nicht auf den Selektionsagarplatten und konnten somit nicht auf ihre Bindung mit Hilfe des Bindungs-Assays untersucht werden. Auf Grund des hohen Zeitaufwandes, verbunden mit experimentellen Schwierigkeiten, die die Etablierung des Bindungs-Assays mit sich brachte, wurde von weiteren Experimenten abgesehen.

## 4. Diskussion

### 4. Diskussion

LAGLIDADG-HE sind natürlich vorkommende, hoch spezifische Endonukleasen mit langen Erkennungssequenzen (14-40 Bp). Durch ihre Eigenschaft des „*homing*“, was spezifisch für Klasse-I-Introns der LAGLIDADG-Familie der HE ist, können sie in ihrem Wirtsorganismus dessen Allel, welches die zu kodierende Sequenz der HE nicht enthält, einen spezifischen DSB in die DNA induzieren. Dadurch wird der Mechanismus der HDR ausgelöst, wobei das Allel, welches die kodierende Sequenz der HE enthält, als Matrize für den Reparaturmechanismus dient. Eine exogene DNA mit homologen Sequenzen kann ebenfalls als Matrize dienen.

Die LAGLIDADG-Enzyme sind die bekanntesten Vertreter aus der Familie der HE. Viele Enzyme dieser Familie sind in der Vergangenheit eingehend untersucht worden. Sie schneiden und binden zahlreiche DNA-Zielsequenzen und einige können so verändert werden, dass neue DNA-Substrate spezifisch geschnitten werden [38, 66, 74]. Deshalb sind die Enzyme aus der LAGLIDADG-Familie der HE sehr interessant für Genommodifikationen.

Aufgrund dessen sollte zum Ersten versucht werden, ein bereits von Dr. George Silva aus unserem Laboratorium entwickeltes hochspezifisches Fusionsprotein, namens  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  dahingehend zu verändern, dass es auch *in vivo* seine Zielsequenz spezifisch spaltet und nicht nur, wie bisher gefunden, unter Hochsalzbedingungen bei Konzentrationen über 800 mM NaCl.

Zum Zweiten sollte ein Bindungs-Assay entwickelt werden um neue HE-Varianten mit erhöhter Spezifität und veränderter bzw. neuer Erkennungssequenz, am Beispiel von I-CreI, selektieren zu können.

#### 4.1 Fusionprotein $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$

Viele hochspezifische Designernukleasen (z.B. ZFN und TALEN), die für *genetargeting* und ggf. die Gentherapie im Fokus stehen, wurden aus einer Fusion mit der Nukleasedomäne des Restriktionsenzym FokI als Spaltdomäne und einer jeweils hochspezifischen Bindungsdomäne hergestellt [22, 47]. Zielsequenzen von Restriktionsenzymen kommen aber durch ihre kurzen Erkennungssequenzen statistisch gesehen relativ häufig im menschlichen Genom vor, weswegen die Spaltdomäne auch allein, ohne Binden der kompletten Designernuklease bzw. der



## 4. Diskussion

Bindungsdomäne, nichtadressiert schneiden und so „*off-site*“-Spaltung begünstigen kann [20].

Dr. George Silva entwickelte das Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$ , um die Sequenzspezifität im Fusionsprotein durch eine lange Erkennungssequenz zu erhöhen und damit „*off-site*“-Spaltung zu minimieren. So wurde anstelle eines Restriktionsenzym für  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  die HE I-Cre<sup>\*</sup>, eine Variante der HE I-CreI, als Spaltdomäne eingesetzt. Die Erkennungssequenz besitzt hier eine Länge von insgesamt 22 Bp und beträgt daher ein Vielfaches der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym [96]. Die Variante I-Cre<sup>\*</sup> wurde durch eine Aminosäuresubstitution von Glycin an Position 19 zu einem Serin hergestellt. Dies sollte eine leichte Verschiebung der katalytisch aktiven Reste im aktiven Zentrum erzeugen und zu einer Erhöhung der Aktivität führen [38]. I-Cre<sup>\*</sup> ist in der dimeren Form des Fusionsproteins von beiden Seiten von I-Sce<sup>\*</sup>, der inaktiven Variante von I-SceI flankiert und agiert im Fusionsprotein lediglich als Bindungsdomäne. I-Sce<sup>\*</sup> wurde durch Austausch von Aminosäureresten an Position 44 und 145 von Asparaginsäure zu Asparagin und Alanin erzeugt und besitzt keinerlei katalytische Aktivität (siehe Abbildung: 1.10) [20]. Um die Flexibilität des 91 kDa großen Enzyms zu unterstützen wurden die Bindungs- und die Spaltdomäne durch eine 6-Aminosäuren-lange *linker*-Region aus I-TevI verbunden (siehe 1.3.2).

Die lange Erkennungssequenz des Fusionsproteins von insgesamt 60 Bp (siehe 7.2) müsste rein theoretisch optimal für den zielgerichteten Genaustausch im lebenden Organismus sein. Eine solch lange Sequenz gewährleistet, dass die Sequenz, wenn überhaupt, nur einmal im Genom vorhanden sein kann. I-CreI und I-SceI sind in der Literatur die meist untersuchten HE. Es gibt zahlreiche Untersuchungen zu ihrer Affinität, Spezifität und Aktivität [89, 90, 95, 96]. Ebenso sind Untersuchungen zu veränderten bzw. neuen Erkennungssequenzen dieser Enzyme vorhanden [38, 66, 74]. Durch die Möglichkeit einen *linker* zwischen die zwei Untereinheiten des Heterodimers einfügen zu können, kann eine nichtadressierte „*off-site*“-Spaltung durch Homodimerformation vermieden werden.

Allerdings schneidet das entwickelte Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  erst bei über 800 mM NaCl seine Zielsequenz „spezifisch“. Eine solch erhöhte Salzkonzentration schwächt die elektrostatische Anziehung zwischen Protein und DNA. Das Fusionsprotein benötigt dabei die Bindung aller einzelnen Domänen und so die Bindung des kompletten Enzyms, welches dadurch spezifisch wird, wie auch die hier durchgeführte Salztitration zeigte. Bei niedrigeren Salzkonzentrationen kommt es zur

## 4. Diskussion

Spaltung von nichtadressierten bzw. „unspezifischen“ Zielsequenzen. Da die Spaltdomäne I-Cre\* im Fusionsprotein eine höhere Affinität zur Zielsequenz, im Vergleich zu I-Sce\* besitzt (siehe 1.3.2.1 und 1.3.2.2), wurde versucht, die Bindung der Spaltdomäne zu erniedrigen.

Durch Protein *engineering* in der Spaltdomäne sollte eine Variante selektiert werden, die auch unter physiologisch nahen Bedingungen (KGB-Puffer) die Erkennungssequenz sequenzspezifisch spaltet. Die insgesamt 12 hergestellten Mutanten wurden in dem T-Puffer 500, im T-Puffer 800 und im KGB-Puffer getestet. Von den sieben hergestellten Einzelmutanten konnte nur die Variante Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M die Zielsequenz SCS spezifisch in dem T-Puffer 500 spalten. Alle anderen Mutanten schneiden präferentiell die nichtadressierte bzw. „unspezifische“ Zielsequenz CS oder C. Von den weiter hergestellten Doppelmutanten zeigte die Variante Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C das erwünschte Ergebnis, die Zielsequenz SCS spezifisch im KGB-Puffer zu schneiden. Allerdings mit einer sehr geringen Aktivität gegenüber dem Wt. Da aber in einer Zelle niedrigere Konzentrationen an Magnesiumacetat und Kaliumglutamat im Vergleich zum KGB-Puffer vorherrschen [125], wurde die Doppelmutante auf ihre Aktivität auch unter diesen Bedingungen analysiert. Dabei konnte weiter eine spezifische Spaltung der Zielsequenz SCS festgestellt werden, aber mit einer noch geringeren Produktbildung. Die Ergebnisse sind schlecht auswertbar und so für eine quantitative Analyse ungeeignet. Deshalb folgten alle weiteren Tests im handelsüblichen KGB-Puffer. Durch weitere Analysen von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C wurde das Optimum der Spaltung nach ca. 24 h und das optimale Verhältnis von DNA zu Protein *in vitro* mit einem 15-fachen Überschuss von Protein gegenüber der DNA erzielt. Dabei ist die lange Inkubationszeit nicht nachteilig für den zielgerichteten Genaustausch in Zellen, da das Enzym dennoch seine adressierte Zielsequenz hochspezifisch spaltet. Die enzymatische Aktivität von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C zeigt im Vergleich zum Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* eine erniedrigte Katalyse, aber eine hohe Sequenzspezifität zur kompletten Zielsequenz SCS. Die Reaktionsgeschwindigkeit, der charakteristische Wert ( $K_M$ ) der katalytischen Aktivität der Enzyme, kann hier nicht bestimmt werden, denn die erhöhte Enzymzugabe gegenüber der Substrat-DNA lässt den  $K_M$ -Wert nicht ermitteln. Der Enzymüberschuss ist bei I-CreI zwingend, da es sich um ein Enzym mit einer *single-turnover* Eigenschaft handelt und die hergestellten Fusionsproteine zeigen die gleiche Eigenschaft. Solche Enzyme binden ihre Zielsequenz *in vitro* so lange, bis sie durch Denaturieren, durch SDS und starkes Erhitzen, wieder von ihrer Zielsequenz

## 4. Diskussion

dissoziieren. Ohne das Denaturieren von Enzymen mit *single-turnover* Eigenschaft würde ein gespaltenes Fragment bzw. die Produktbildung, in einem Spaltaktivitätstest nicht erkennbar und auszuwertbar sein.

Während der Wt nach 720 min (bzw. 12 h) eine Produktbildung, von 87% + / - 8% für die spezifische Zielsequenz SCS und mit 96% +/- 4% eine schnellere katalytische Aktivität für die unspezifische Sequenz CS zeigt, kommt die Variante Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C nach der gleichen Zeit (12 h) auf eine Produktbildung, von lediglich 6% +/- 1% für die spezifische Zielsequenz SCS. Die unspezifische Zielsequenz CS zeigt zu keiner gemessenen Zeit ein Spaltprodukt. Der Wildtyp spaltet also in der gleichen Zeit ca. 16-mal mehr Substrat als die neue Variante, welche eine hohe Spezifität zur Zielsequenz SCS zeigt, aber eine mäßige Produktbildung, und eine langsame Katalyse des spezifischen DNA-Substrates. Im *competition* Spaltaktivitätstest wird erneut die Präferenz des Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* im Spalten der unspezifischen (CS) gegenüber der spezifischen Zielsequenz (SCS) und die geringe, aber spezifische Spaltung der Zielsequenz SCS für die Mutante verdeutlicht.

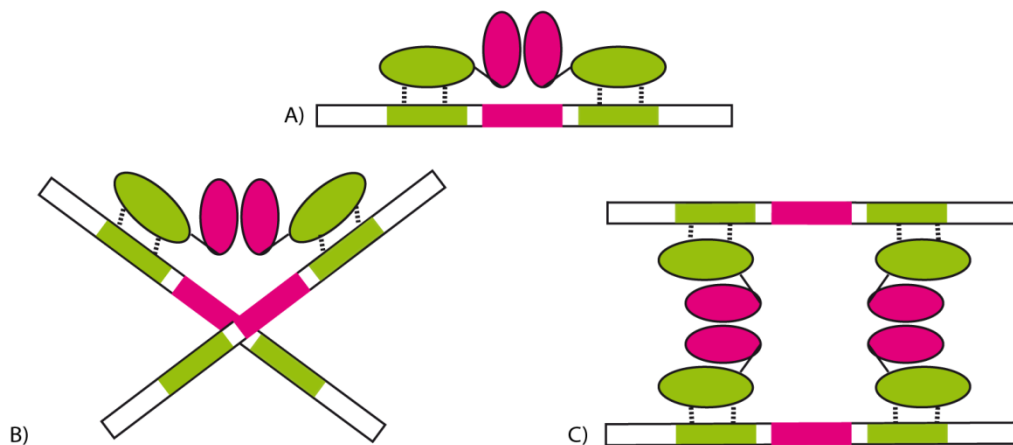
Eine Erklärung für die reduzierte Aktivität der Mutante findet sich wahrscheinlich in der schlechten Bindung der Spaltdomäne von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C. Durch die sigmoide Form der Bindungskurve in Abbildung 3.10 wird eine kooperative Bindung der Enzyme angedeutet. Die einzelnen Untereinheiten und Domänen des Fusionsproteins binden und lösen sich unterschiedlich schnell von der DNA. Dadurch konnte der  $K_D$ -Wert, der im Allgemeinen als Bindungskonstante verwendet wird, nicht analysiert werden. Der Wt Sce\*<sub>2</sub>Cre\* besitzt genau wie die Mutante eine etwa gleichgroße Affinität zu der spezifischen, sowie zur unspezifischen Zielsequenz, allerdings ist die Bindungsstärke der Mutante Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C gegenüber der des Wt wesentlich geringer. Denn bei der Mutante tritt erst bei einer doppelt so hohen Proteinkonzentration eine Sättigung ein.

Um nachvollziehen zu können, wie die Spaltdomäne im Fusionsprotein mit ihrer Zielsequenz agieren könnte, wurden I-CreI-Varianten hergestellt. Mit diesen Varianten wurden die gleichen Aminosäuresubstitutionen wie in der Spaltdomäne von Sce\*<sub>2</sub>Cre\*K139M;Y33C vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei I-Cre\* die Zielsequenz gebunden und bei I-Cre\*K139M;Y33C nicht gebunden wurde. Außerdem zeigten die beiden Enzyme je mit einer S19G-Substitution (I-Cre\* und Sce\*<sub>2</sub>Cre\*) einen weiteren DNA-*shift*. Es ist zu vermuten, dass das

## 4. Diskussion

Interaktionspotential dieser Varianten durch die S19G-Substitution so verstärkt ist, dass es vermehrt zu Proteinaggregationen kommen kann.

Die Spaltdomäne im Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  bindet kaum, bis gar nicht an ihre Zielsequenz. Dadurch kommt lediglich eine Bindung durch die zwei I- $\text{Sce}^*$ -Bindungsdomänen in Betracht. Somit ist nicht, wie vermutet, das komplette Fusionsprotein an der Bindung beteiligt.



**Abbildung 4.1: Mögliche Bindungen von  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  zur spezifischen Zielsequenz SCS**

Da von der Schneidedomäne (pink) des Fusionsproteins kaum bis keine Bindung ausgeht, kommen drei verschiedene Modelle in Betracht.

A) Zum einen könnte  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  lediglich durch die Bindedomäne I- $\text{Sce}^*$  (grün) die SCS-Zielsequenz binden und spalten.

B) Zum anderen kann ein Fusionsprotein oder aber zwei Enzyme gleichzeitig (C) zwei spezifische Zielsequenzen binden und so die Fähigkeit verlieren die DNA spalten zu können.

Es ergeben sich, wie in Abbildung 4.1 gezeigt drei verschiedene Modelle, wie  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M};\text{Y33C}$  an die spezifische Zielsequenz binden könnte. Das Fusionsprotein kann wahrscheinlich durch die Bindungsdomäne I- $\text{Sce}^*$  die spezifische Zielsequenz SCS binden und zufällig spalten, oder das Fusionsprotein bindet zwei Zielsequenzen auf einmal. Das Binden von zwei SCS-Zielsequenzen würde die Mutante jedoch vollständig inaktivieren, da die Spaltdomäne nicht mehr mit der Zielsequenz in Berührung kommen kann. Das Gleiche gilt für das Binden von zwei Fusionsproteinen mit zwei SCS-Zielsequenzen, welches zwangsläufig zur Inaktivität der Enzyme führt. Die Formationen der zwei letzten vorgestellten Modelle B und C aus Abbildung 4.1 stellen gute Begründungen dar, warum bei einem so deutlichen Enzymüberschuss in einer Reaktion wenig Spaltung zu verzeichnen ist.

Der I-TevI-linker je zwischen der Spalt- und Bindungsdomäne des jeweiligen Fusionsproteins mit den sechs Aminosäuren Lys-Ser-Lys-Ile-Ser-Gly sorgt für eine hohe Flexibilität des Fusionsproteins, konnte aber in diesem Fall zur Ausbildung der

## 4. Diskussion

Bindungs-Modelle, die zur Inaktivierung führen, beitragen. Durch weitere Bindungsuntersuchungen, wie z.B. durch *single-molecule*-Experimente wäre es möglich, genauer zu analysieren, wie die einzelnen Domänen des Fusionsproteins an die Erkennungssequenz binden.

Für das kaum vorhandene Binden bzw. die fehlende Bindung der Spaltdomäne des Fusionsproteins  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  zur Zielsequenz ist wohl die Aminosäuresubstitution an Position 33 von Tyrosin zu Cystein verantwortlich. Diese veranlasst eine leichte Verschiebung des Loops zwischen den  $\beta$ -Faltblättern des Enzyms und könnte die schwache Bindungsaktivität des Enzyms bewirken [121]. Denn das Tyrosin an Position 33 ist in I-CreI ein konservierter Aminosäurerest und bildet Wasserstoffbrücken mit dem Adenin an Position +10 in der Erkennungssequenz aus [71].

Das Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  konnte durch die Doppelmutation K139M/Y33C so verändert werden, dass es unter physiologischen Bedingungen seine Zielsequenz spezifisch spalten kann. Aber um letztendlich eine Aussage über das Verhalten des Enzymes *in vivo* treffen zu können, müssten die Aktivitätstests erneut in eukaryotischen Zellen durchgeführt werden.

In seiner jetzigen Form könnte  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  als „*safe harbour*“-Stelle zum Einsatz kommen und eine gezielte Geninsertion einleiten. Denn in Getreidepflanzen wie z.B. Mais konnte bislang das Genom durch das Einfügen von Genen in I-SceI-Zielsequenzen sehr effektiv verändert werden [129].

### 4.2 Bindungs-Assay

Große Datenbanken an neu hergestellten Enzymvarianten können durch *directed evolution* unmittelbar im lebenden Organismus selektiert werden. Dafür macht sich die Forschung und Industrie verschiedene Selektions-Assays zu Nutze, die die neuen Proteine auf bestimmte Eigenschaften wie z.B. Aktivität und Spezifität analysieren. Der erste Test dieser Art wurde 1997 für HE entwickelt, um herauszufinden, welche Aminosäurereste für die Katalyse von I-CreI verantwortlich sind. Viele weitere Assays mit verschiedenen Strategien folgten.

Selektions-Assays, die auf einem blau/weiß-*screening* basieren und durch eine Blaufärbung der Bakterienkolonien anzeigen, ob die zu selektierenden Eigenschaften vorhanden sind oder nicht, scheinen eine gute visuelle Methodik zu sein, um bestimmte Eigenschaften von Enzymen schnell analysieren zu können. Ein solches

## 4. Diskussion

Beispiel ist der Selektions-Test von Seligman *et al.* [108], der, obwohl es dort um ein *screening* der Aktivität der zu selektierenden Enzyme geht, als Idee zur Entwicklung des Bindungs-Assays diente (siehe Abbildung 1.12). Ein Vektor dient dort als Träger der HE und der zweite Vektor beinhaltet eine I-CreI-Zielsequenz anstelle des Operators im *lacZ*-Gen.

Für den Bindungs-Assay wurde ein Zwei-Plasmidsystem gewählt. Es ist das am häufigsten verwendete System mit dem HE-Selektionen durchgeführt werden [76, 93]. Dabei wurde mit einem Endo-Plasmid, das eine inaktive Mutante von I-CreI (I-Cre<sup>t</sup>) oder eine Variante beinhaltet und einem Target-Plasmid mit *lacZ*-Kassette und vorgeschalteter Erkennungssequenz für I-CreI, anstelle der Operator-Sequenz, gearbeitet. Durch Expression von I-Cre<sup>t</sup> oder einer Varianten mit hoher Affinität zur Zielsequenz verhindert deren Bindung die Transkription der RNA-Polymerase und die Zellen bleiben weiß. Ist die Affinität des Enzyms niedrig, kann die I-Cre<sup>t</sup> Variante nicht binden und  $\beta$ -Galaktosidase wird exprimiert (siehe Abbildung 3.13). Dadurch kommt es in Kombination mit X-Gal in den Selektionsagarplatten (siehe 2.2.2.2) zu einer Blaufärbung der Zellen.

Zunächst wurden für den Bindungs-Assay geeignete Zellen sowie verschiedene Selektionsagarplatten getestet. Die Untersuchungen mit transformiertem Vektor pUC19 in KRX-Zellen zeigten auf den Selektionsagarplatten 80/0,6 (unter 80  $\mu$ g/ml X-Gal und 0,6 mM IPTG) die geeignetste Regelung für die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase und damit die sensitivste und zugleich intensivste Blaufärbung.

Selektiert wurde die Kotransformation der zwei Plasmide in einer Zelle durch die jeweilige Antibiotika-Resistenz. Zellen die lediglich ein Plasmid beinhaltenen, starben. Dabei war es problematisch, Plasmide mit verschiedenen Replikationsursprungsorten zu verwenden, denn zwei Plasmide mit demselben Replikationsursprung sind durch korrelative Inkompatibilität nicht vereinbar. Es ist ein sensibler Grad, eine genaue Anzahl an Target-Plasmiden für eine korrekte Blaufärbung und gleichzeitig so viele Kopien von Endo-Plasmiden in einer Zelle nachzuweisen, dass genügend Enzym exprimiert werden kann, um alle Erkennungssequenzen im Target-Plasmid gesättigt binden zu können. Eine zu hohe Expression des Enzyms wiederum, könnte für die Zellen toxisch werden.

Hergestellt und getestet wurden verschiedene Varianten an Target- und Endo-Plasmiden (siehe Tab.: 3.3 und Abbildung 3.15). Erreicht wurde das Ziel durch die Kotransformation mit dem *high copy*-Target-Plasmid pHAL3-HSCR, mit dem Replikationsursprung pMB1 und einer Anzahl von 500-700 Kopien in einer Zelle und

## 4. Diskussion

dem middle *copy* Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> mit Replikationsursprung RSF1030 und über 100 Kopien pro Zelle. Die Kontrollen der Kotransformation mit den Target-Vektoren pUC19 und pHAL-LACO zeigten wie gewünscht eine Blaufärbung der Zellen und die Kontrollplatten ohne IPTG zeigten eine weiße Färbung. Die Kontrollplatten (ohne IPTG) mit der Kotransformation von pRG3-Cre<sup>t</sup> mit pHAL-HSCR zeigten dagegen eine Blaufärbung der Zellen, da kein Cre<sup>t</sup> exprimiert und daher keine Blockierung der Gene eingeleitet werden konnte.

Durch Protein *engineering* wurden die zwei Varianten I-Cre<sup>t\*</sup> und I-Cre<sup>t\*</sup>K139M;Y33C hergestellt. Diese zeigen in ihrer aktiven Form eine geringere Affinität zu ihrer Zielsequenz und schienen so zur weiteren Kontrolle des Bindungs-Assays eine optimale und kostengünstige Wahl zu sein. Die Zellen wuchsen zwar in herkömmlicher Flüssigkultur und auf Selektiv-Agarplatten, aber nicht auf den Selektionsagarplatten an. Dies kann bedeuten, dass die hergestellten Mutanten der inaktiven Variante I-Cre<sup>t</sup> durch die weiteren Aminosäuresubstitutionen wieder aktiv geworden sind und die Zellen durch die damit einhergehende, ungenügende Antibiotika-Resistenz absterben bzw. nicht anwachsen. Dies liegt vermutlich an der G19S-Mutation. Das Glycin liegt direkt oberhalb des aktiven Zentrums und ist an der Metallionenbindung beteiligt. Das einklonierte Serin könnte evtl. zusammen mit den Asparaginresten der inaktiven Variante das katalytische Zentrum wieder aktivieren, indem die zwei Magnesiumionen erneut gebunden würden und die Phosphodiesterbindung der DNA durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls hydrolysiert wurde und so eine Spaltung der Zielsequenz einleiten könnte.

Der in dieser Arbeit entwickelte Bindungs-Assay steckt noch in den Anfängen und müsste weiter auf seine Funktion analysiert werden. Denn er könnte hilfreich zum Selektieren von bindungsstärkeren und evtl. aktiveren Enzymen mit veränderter Erkennungssequenz sein. Ebenso könnte er bei der Verbesserung der Bindung bzw. Angleichen der Bindung von Spalt- und Bindungsdomäne des Fusionsproteins Sce\*<sub>2</sub>Cre\* K139M;Y33C förderlich sein.

Außerdem könnte der Bindungs-Assay, durch die Fähigkeit die RNA-Polymerase nicht über die nachfolgenden Gene lesen zu lassen, zur Repression von Genen dienen und z.B. die Transkription bzw. Expression von toxischen Proteinen in *E. coli*-Zellen gezielt stoppen. Diese These müsste aber an gezielten Genen weiter untersucht werden.

## 4. Diskussion

### 4.3 Schlussfolgerung

Das Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  konnte durch Protein *engineering* so verändert werden, dass es nur seine Zielsequenz unter physiologischen Bedingungen sequenzspezifisch spalten kann. Allerdings ist die katalytische Aktivität gegenüber dem Wt  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  deutlich verringert. Untersuchungen zeigten eine kaum vorhandene Bindung der Spaltdomäne, weswegen eine komplette Bindung des Fusionsproteins zur Zielsequenz ausgeschlossen ist.

$\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  ist mit 91 kDa sehr groß und hat eine sehr lange Erkennungssequenz von 60 Bp. Diese macht das Fusionsprotein in der Theorie sehr sequenzspezifisch, denn diese Zielsequenz ist ca. vier mal länger als es nötig wäre, um einmalig innerhalb des menschlichen Genoms vorzukommen.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, führen zwei von drei möglichen Modellen zur Bindung der neuen Variante  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  an die Zielsequenz zwangsläufig zur Inaktivität. Durch Protein *engineering* in der Bindungsdomäne I- $\text{Sce}^*$  des Fusionsproteins könnte man neue Varianten mit herabgesetzter Affinität erzeugen, so dass das Enzym nur ein DNA-Molekül binden kann oder zum anderen könnte durch neue Mutationen in der Spaltdomäne die Affinität etwas angehoben werden, um dessen Bindung erneut anzuregen. Beide Veränderungen könnten dazu beitragen, das komplette Fusionsprotein und nicht nur einzelne Domänen an die adressierte bzw. spezifische Zielsequenz SCS binden zu lassen.

Ebenfalls könnte der 6-Aminosäuren-lange *linker* zwischen Spalt- und Bindungsdomäne gekürzt werden, um die Enzymflexibilität herabzusetzen und somit ebenfalls die unerwünschten Bindungsmodelle B und C aus Abbildung 4.1 zu umgehen.

TALEN sind in den letzten Jahren als hochspezifische Enzyme für den zielgerichteten Genaustausch die „Schneidwerkzeuge“ der Wahl und sind wesentlich leichter und schneller auf eine gewünschte Erkennungssequenz im Vergleich zu den HE zu programmieren. Um Probleme mit der unspezifischen Nukleasedomäne FokI umgehen zu können, wurden mittlerweile weitere TALEN aus Fusionen mit der Restriktionsendonuklease PvuII, der Endonuklease MutH und der HE I-SceI hergestellt und sind auf ihre Spezifität erfolgreich getestet worden [13, 128]. Deshalb scheinen sie für die Gentherapie am Menschen womöglich besser geeignet zu sein. Das entwickelte Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  könnte in der jetzigen Form



## 4. Diskussion

mit seiner Erkennungssequenz z.B. als „*safe harbour*“-Stelle zur gezielten Geninsertion eingesetzt werden [12, 129].

Interessant wäre aber die Frage, wie sich  $\text{Sc}e^*{}_{2}\text{Cre}^* \text{K139M;Y33C}$  *in vivo* verhalten würde, denn in eukaryotischen Zellen könnte das Enzym womöglich anders agieren als *in vitro*. Evtl. könnten die zwei Modelle zur Bindung von zwei DNA-Fragmenten, die  $\text{Sc}e^*{}_{2}\text{Cre}^* \text{K139M;Y33C}$  in die Inaktivität führen, mit genomischer DNA umgangen werden.

Die Verwendung des *high copy*-Plasmids pUC19 führte in KRX-Zellen auf den Selektionsplatten 80/0,6 zu einer  $\beta$ -Galaktosidase-Expression, die durch eine intensive und gleichzeitig sensitive Blaufärbung der Zellen für den Bindungs-Assay geeignet sein könnte. Durch Kotransformation des *high copy*-Target-Plasmids pHAL-HSCR mit dem *middle copy*-Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> konnte eine Sättigung im Binden der Zielsequenzen erzielt werden. Die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase bleibt in den Zellen aus und sie wachsen weiß an. Die Kotransformation der Kontrollen für das Target-Plasmid pUC19 und pHAL-LACO mit jeweils dem Endo-Plasmid pRG-Cre<sup>t</sup> führten zu einer stabilen Blaufärbung der Zellen. Auf den Kontrollplatten ohne IPTG blieben die Zellen, wie vermutet, weiß und bei der Kotransformation des Target-Plasmids pHAL-HSCR mit Endo-Plasmid pRG3-Cre<sup>t</sup> hatten die Zellen durch Ausbleiben der Expression eine blaue Farbe. Um sicher zu gehen, dass der Bindungs-Assay funktioniert, müssten weitere inaktive I-CreI-Varianten hergestellt werden, die nachweislich eine schwächere Bindungsaffinität zur Zielsequenz besitzen, wie z.B. I-CreS32K ( $K_D = 508 \text{ nM}$ ) [108] oder S138A ( $K_D = 250 \text{ nM}$ ) [121], die dann jeweils durch den Bindungs-Assay untersucht und mit einem *in vitro* Aktivitätstest (siehe z.B. Anhang 7.1) auf ihre Inaktivität getestet werden.

Von Vorteil wäre es, die in dieser Arbeit hergestellten Mutanten I-Cre<sup>t\*</sup> und I-Cre<sup>t\*</sup>K139M;Y33C ebenfalls auf ihre Aktivität hin zu analysieren. Die daraus resultierende Aussage könnte schon die Funktion oder Nichtfunktion des Bindungs-Assays bestätigen.

Ebenso könnte anschließend durch einen EMSA die *in vitro* Bindungsstärke der hergestellten Mutanten getestet werden um sie mit der Blaufärbung im Bindungs-Assay vergleichen zu können.

Die Repression der nachfolgenden Gene scheint im *lac*-Operon des Bakteriengenoms gut zu funktionieren. Ob sie auch für andere Gene etablierbar ist, müsste weiter

## 4. Diskussion

untersucht werden. Diese Methode könnte in der synthetischen Biologie eingesetzt werden, damit in Zukunft eine kontrollierte Blockierung von Genen eingeleitet werden kann, was z.B. die Expression von toxischen Proteinen in *E. coli*-Zellen gezielt stoppen würde.

## 5. Zusammenfassung

### 5. Zusammenfassung

Die zielgerichtete Integration eines therapeutischen Gens ist eine viel versprechende Möglichkeit der Gentherapie, um vererbte oder erworbene monogenetische Krankheiten „heilen“ zu können. In den letzten Jahren wurden verschiedene TALE-, Zinkfinger- und Meganukleasen entwickelt, die einen adressierten DSB in die genomische DNA einfügen können. Durch die hochspezifische Spaltung mittels generierter Designernukleasen wird das wirtseigene Reparatursystem der HDR ausgelöst. Steht eine exogen eingefügte DNA zur Verfügung, kann das „defekte“ Gen zielgerichtet ausgetauscht werden. HE sind natürlich vorkommende Endonukleasen mit sehr langen Erkennungssequenzen von 14-40 Bp. Durch die Möglichkeit des Protein *engineering* können nicht nur bestimmte Eigenschaften wie die Spezifität und Aktivität der Enzyme verändert werden, sondern auch die Erkennung von neuen Zielsequenzen herbeigeführt werden.

In dieser Arbeit wurden dazu zwei verschiedene Ansätze von *engineering* an LAGLIDADG-HE verfolgt.

Zum einen wurde das Fusionsprotein  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  so weiterentwickelt, dass es auch unter physiologischen Bedingungen seine Erkennungssequenz spezifisch spalten kann. Das Enzym besteht in der dimeren Form aus der Fusion einer I-CreI-Variante (G19S), die von zwei inaktiven I-SceI-Varianten (D44N/D145A) flankiert wird. Durch weitere Mutationen in der I-Cre\* Spaltdomäne konnte  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  hergestellt werden. Dieses Enzym spaltet zwar die Zielsequenz unter physiologischen Bedingungen adressiert bzw. „spezifisch“, hat aber im Vergleich zum Wt  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*$  an Aktivität verloren. Weitere Tests zeigten, dass diese geringe Aktivität wahrscheinlich auf die kaum vorhandene Bindungsstärke der Spaltdomäne zurückzuführen ist und so lediglich die I-Sce\*-Bindungsdomänen des Fusionsproteins für die Bindung essentiell sind. Dadurch könnten zwei DNA-Fragmente auf einmal gebunden werden, was das Enzym in die Inaktivität führt. Um das erzeugte Fusionsprotein in der Gentherapie anwenden zu können, müsste es weiter verändert werden, was sehr zeitaufwendig ist. Da TALEN wesentlich einfacher und schneller zu programmieren sind, werden diese Nukleasen zukünftig eher in der Therapie am Genom des Menschen eingesetzt werden. Das in dieser Arbeit hergestellte  $\text{Sce}^*_2\text{Cre}^*\text{K139M;Y33C}$  wäre aber ein optimaler Kandidat um dessen Erkennungssequenz *in vivo* einzusetzen

## 5. Zusammenfassung

um eine sogenannte „safe harbour“-Stelle zu schaffen die hoch spezifisch gespalten werden kann. Denn mittlerweile werden I-SceI Erkennungssequenzen als Insertionsstellen für genetische Modifikationen in einer Auswahl von bestimmten Kulturpflanzen angewendet.

Zum anderen wurde in dieser Arbeit ein Bindungs-Assay entwickelt, der noch nicht ausgereift ist und durch weitere Untersuchungen auf seine Effizienz getestet werden könnte. Der Bindungs-Assay besteht aus einem Zwei-Plasmidsystem (Endo- sowie Target-Plasmid) und ist an eine blau/weiß-Selektion angelehnt. Das Endo-Plasmid kodiert für die inaktive I-CreI-Variante (I-Cre<sup>t</sup>) oder eine Variante davon. Das Target-Plasmid beinhaltet das *lac*-Operon mit einer I-CreI-Erkennungssequenz anstelle des Repressorgens. Wird eine Enzymvariante mit hoher Affinität zur Zielsequenz exprimiert, bleiben die *E. coli*-Zellen weiß. Wird dagegen eine Variante mit niedriger Affinität hergestellt wird  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert und die Zellen färben sich blau. Durch Analysen verschiedener Eigenschaften von Endo- und Target-Plasmiden mit den dazugehörigen Kontrollen konnte durch Kotransformation des *high copy*-Target-Plasmids mit dem *middle copy*-Endo-Plasmid auf den Selektionsagarplatten 80/0,6 das gewünschte Ergebnis erzielt werden. Doch hat sich der Bindungs-Assay in weiteren Untersuchungen als nicht robust erwiesen und es müssten, um die Funktion des Assays verifizieren zu können, weitere Analysen durchgeführt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

### 6. Literaturverzeichnis

1. Lander, E.S., *Initial impact of the sequencing of the human genome*. Nature, 2001. 470(7333): p. 187-97.
2. Craig Venter, J., *et al.*, *The Sequence of the human genome*. Science, 2001. e 291(10.1126/science.1058040).
3. Weiner, B.M. and Kleckner, N., *Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast*. Cell, 1994. 1;77(7):977-91.
4. Kostriken, R. and Heffron, F., *The product of the HO gene is a nuclease: purification and characterization of the enzyme*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 1984. 49:89-96.
5. Pâques, F. and Haber, J.E., *Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev., 1999. 63(2):349-404.
6. Sung, P. and Klein, H., *Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions*. Nat Rev Mol Cell Biol., 2006. ;7(10):739-50.
7. Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M., *Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease*. Molecular and Cellular Biology, 1994. 14: p. 8096-8106.
8. Thomas, K.R. and Capecchi, M.R., *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell, 1987. 51(3):503-12.
9. Thomas, K.R. and Capecchi, M.R., *Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development*. Nature, 1990. 346(6287):847-50.
10. Cavazzana-Calvo, M., *et al.*, *Gene therapy for severe combined immunodeficiency*. Annu Rev Med. , 2005. 56:585-602.
11. Fischer, A., *et al.*, *Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy*. Immunol Rev., 2005. 203:98-109.
12. Silva, G., *et al.*, *Meganucleases and other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy*. Current gene therapy, 2011. 11(1): p. 11-27.
13. Yanik, M., *et al.*, *TALE-PvuII Fusion Proteins – Novel Tools for Gene Targeting*. PLoS One, 2013. 8(12):e82539. doi: 10.1371/journal.pone.0082539.
14. Townsend, J.A., *et al.*, *High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases*. Nature, 2009. 459(7245): 442-5.
15. Shukla, V.K., *et al.*, *Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases*. Nature, 2009. 459(7245): 437-41.
16. Bibikova, M., *et al.*, *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. Science, 2003. 300(5620): 764.
17. Doyon, Y., *et al.*, *Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases*. Nature Biotechnology, 2008. 26(6): 702-8.
18. Geurts, A.M., *et al.*, *Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases*. Science, 2009. 325(5939): 433.
19. Handel, E.M. and Cathomen, T., *Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity*. Curr Gene Ther, 2011. 11(1): 28-37.
20. Lippow, S.M., *et al.*, *Creation of a type IIS restriction endonuclease with a long recognition sequence*. Nucleic Acids Research, 2009. 37(9): 3061-73.

## 6. Literaturverzeichnis

21. Lieber, M.R., *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annual Review of Biochemistry, 2010. 79: 181-211.
22. Carroll, D., et al., *Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases*. Nat. Protoc., 2006. 1(3): 1329-41.
23. Segal, D.J., et al., *Structure of Aart, a designed six-finger zinc finger peptide, bound to DNA*. J Mol Biol, 2006. 363(2): 405-21.
24. Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S., *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(3): 1156-60.
25. Wright, D.A., et al., *Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly*. Nat. Protoc., 2006. 1(3): 1637-52.
26. Greisman, H.A. and Pabo, C.O., *A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites*. Science, 1997. 275(5300): 657-61.
27. Hurt, J.A., et al., *Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(21): 12271-6.
28. Klug, A., *The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation*. Annu Rev Biochem, 2010. 79:213-231.
29. Handel, E.M. and Cathomen, T., *Zinc-Finger Nuclease Based Genome Surgery: It's all About Specificity*. Current gene therapy, 2011. 11(1): 28-37.
30. Miller, J.C., et al., *An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing*. Nat Biotechnol, 2007. 25(7): 778-85.
31. Szczepek, M., et al., *Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases*. Nature Biotechnology, 2007. 25(7): 786-93.
32. Coen, D., et al., *Mitochondrial genetics. I. Methodology and phenomenology*. Symp Soc Exp Biol., 1970. 24: 449-96.
33. Dalgaard, J.Z., et al., *Statistical modeling, phylogenetic analysis and structure prediction of a protein splicing domain common to inteins and hedgehog proteins*. Journal of Computational Biology, 1997. 4: 193-214.
34. Gogarten, J.P., et al., *Inteins: structure, function, and evolution*. Annu Rev Microbiol., 2002. 56: 263-87.
35. Dujon, B., et al., *Mobile introns: definition of terms and recommended nomenclature*. Gene, 1989. 82: 115-118.
36. Dujon, B., *Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations--a review*. Gene, 1989. 82: 91-114.
37. Gimble, F.S., *Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes*. FEMS Microbiology Letters, 2000. 185(2): 99-107.
38. Arnould, S., et al., *Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells*. J Mol Biol., 2007. 371(1): 49-65.
39. Silva, G.H. and Belfort, M., *Analysis of the LAGLIDADG interface of the monomeric homing endonuclease I-DmoI*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(10): 3156-68.
40. Bogdanove, A.J., Schornack, S., and Lahaye, T., *TAL effectors: finding plant genes for disease and defense*. Current Opinion in Plant Biology, 2010. 13(4): 394-401.
41. Kay, S., et al., *A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator*. Science, 2007. 318(5850): 648-51.

## 6. Literaturverzeichnis

42. Romer, P., *et al.*, *Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene*. *Science*, 2007. 318(5850): 645-8.
43. Kay, S. and Bonas, U., *How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant*. *Curr Opin Microbiol.*, 2009. 12(1): 37-43.
44. Boch, J. and Bonas, U., *Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function*. *Annual Review of Phytopathology*, 2010. 48: 419-36.
45. Li, L., *et al.*, *Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification*. *Plant Molecular Biology*, 2012. 78(4-5): 407-16.
46. Scholze, H. and Boch, J., *TAL effectors are remote controls for gene activation*. *Science Direct*, 2010. 836; 14: 1-7.
47. Boch, J., *TALEs of genome targeting*. *Nature Biotechnology*, 2011. 29(2): 135-6.
48. Miller, J.C., *et al.*, *A TALE nuclease architecture for efficient genome editing*. *Nature Biotechnology*, 2011. 29(2): 143-8.
49. Christian, M., *et al.*, *TAL Effector Nucleases Create Targeted DNA Double-strand Breaks*. *Genetics*, 2010. 186(2): 757-61.
50. Cermak, T., *et al.*, *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting*. *Nucleic Acids Research*, 2011. 39(12): e82.
51. Li, T., *et al.*, *Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes*. *Nucleic Acids Research*, 2011. 39(14): 6315-6325.
52. Mussolino, C., *et al.*, *A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity*. *Nucleic Acids Research*, 2011. 39(21): 9283-93.
53. Rusling, D.A., *et al.*, *Four base recognition by triplex-forming oligonucleotides at physiological pH*. *Nucleic Acids Research*, 2005. 33(9): 3025-32.
54. Eisenschmidt, K., *et al.*, *Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage*. *Nucleic Acids Research*, 2005. 33(22): 7039-47.
55. Schierling, B., *et al.*, *Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. 107(4): 1361-6.
56. Rathert, P., *et al.*, *Reversible inactivation of the CG specific SssI DNA (cytosine-C5)-methyltransferase with a photocleavable protecting group*. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*, 2007. 8(2): 202-7.
57. Garneau, J.E., *et al.*, *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. *Nature*, 2010. 4;468(7320): 67-71.
58. Ishino, Y., *et al.*, *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. *J Bacteriol.*, 1987. 169(12): 5429-33.
59. Horvath, P. and Barrangou, R., *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea*. *Science*, 2010. 327(5962): 167-70.
60. Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. *Nature*, 2012. 482(7385): 331-8.
61. Cong, L., *et al.*, *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science*, 2013. 339(6121): 819-23.

## 6. Literaturverzeichnis

62. Wang, H., *et al.*, *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *Cell*, 2013. 153(4): 910-8.
63. Mali, P., *et al.*, *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. *Science*, 2013. 339(6121): 823-6.
64. Fu, Y., *et al.*, *High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells*. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(9): 822-6.
65. Cradick, T.J., *et al.*, *CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity*. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(20): 9584-92.
66. Dalgaard, J.Z., *et al.*, *Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family*. *Nucleic Acids Research*, 1997. 25: 4626-4638.
67. Stoddard, B.L., *Homing endonuclease structure and function*. *Q Rev Biophys*, 2005. 38(1): 49-95.
68. Thompson, A.J., *et al.*, *Cleavage and recognition pattern of a double-strand-specific endonuclease (I-CreI) encoded by the chloroplast 23S rRNA intron of Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 1992. 119: 247-251.
69. Wang, J., *et al.*, *Purification, biochemical characterization and protein-DNA interactions of the I-CreI endonuclease produced in Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(19): 3767-76.
70. Aagaard, C., Awayez, M.J., and Garrett, R.A., *Profile of the DNA recognition site of the archaeal homing endonuclease I-DmoI*, in *Nucleic Acids Research* 1997. 1523-30.
71. Lucas, P., *et al.*, *Rapid evolution of the DNA-binding site in LAGLIDADG homing endonucleases*. *Nucleic Acids Research*, 2001. 29(4): 960-9.
72. Silva, G.H., *et al.*, *From monomeric to homodimeric endonucleases and back: engineering novel specificity of LAGLIDADG enzymes*. *Journal of Molecular Biology*, 2006. 361(4): 744-54.
73. Belfort, M. and Roberts, R.J., *Homing endonucleases: keeping the house in order*. *Nucleic Acids Research*, 1997. 25(17): 3379-88.
74. Smith, J., *et al.*, *A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences*. *Nucleic Acids Research*, 2006. 34(22): e149.
75. Chames, P., *et al.*, *In vivo selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination*. *Nucleic Acids Research*, 2005. 33(20): e178.
76. Arnould, S., *et al.*, *Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets*. *Journal of Molecular Biology*, 2006. 355(3): 443-58.
77. Grizot, S., *et al.*, *Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease*. *Nucleic Acids Research*, 2009. 37(16): 5405-19.
78. Munoz, I.G., *et al.*, *Molecular basis of engineered meganuclease targeting of the endogenous human RAG1 locus*. *Nucleic Acids Research*, 2011. 39(2): 729-43.
79. Chevalier, B.S., *et al.*, *Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease*. *Molecular Cell*, 2002. 10(4): 895-905.
80. Grizot, S., *et al.*, *Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds*. *Nucleic Acids Research*, 2010. 38(6): 2006-18.



## 6. Literaturverzeichnis

81. Thierry, A., *et al.*, *Cleavage of yeast and bacteriophage T7 genomes at a single site using the rare cutter endonuclease I-Sce I*. Nucleic Acids Research, 1991. 19: 189-90.
82. Plessis, A., *et al.*, *Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus*. Genetics, 1992. 130: 451-60.
83. Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B., *Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease*. Nucleic Acids Research, 1993. 21: 5034-5040.
84. Lukacsovich, T., Yang, D., and Waldman, A.S., *Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-SceI*. Nucleic Acids Res., 1994. 22: 5649-57.
85. Machida, C., *et al.*, *Characterization of the transposition pattern of the Ac element in Arabidopsis thaliana using endonuclease I-SceI*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1997. 94: 8675-8680.
86. Cohen-Tannoudji, M., *et al.*, *I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells*. Mol. Cell. Biol., 1998. 18(3): 1444-1448.
87. Paques, F. and Duchateau, P., *Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy*. Current gene therapy, 2007. 7(1): 49-66.
88. Jacquier, A. and Dujon, B., *An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene*. Cell, 1985. 41: 383-94.
89. Colleaux, L., *et al.*, *Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988. 85: 6022-6.
90. Moure, C.M., Gimble, F.S., and Quioco, F.A., *Crystal structures of I-SceI complexed to nicked DNA substrates: snapshots of intermediates along the DNA cleavage reaction pathway*. Nucl. Acids Res., 2008
91. Perrin, A., Buckle, M., and Dujon, B., *Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions*. EMBO J, 1993. 12(7): 2939-47.
92. Moure, C.M., Gimble, F.S., and Quioco, F.A., *The crystal structure of the gene targeting homing endonuclease I-SceI reveals the origins of its target site specificity*. J Mol Biol, 2003. 334(4): 685-95.
93. Doyon, J.B., *et al.*, *Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI*. J Am Chem Soc, 2006. 128(7): p. 2477-84.
94. Durrenberger, F. and Rochaix, J.-D., *Chloroplast ribosomal intron of Chlamydomonas reinhardtii: in vitro self-splicing, DNA endonuclease activity and in vivo mobility*. The EMBO journal, 1991. 10: 3495-3501.
95. Chevalier, B., *et al.*, *Metal-dependent DNA cleavage mechanism of the I-CreI LAGLIDADG homing endonuclease*. Biochemistry, 2004. 43(44): 14015-26.
96. Jurica, M.S., Monnat, R.J., and Stoddard, B.L., *DNA recognition and cleavage by the LAGLIDADG homing endonuclease I-CreI*. Mol Cell, 1998. 2(4): 469-76.
97. Seligman, L.M., *et al.*, *Genetic analysis of the Chlamydomonas reinhardtii I-CreI mobile intron homing system in Escherichia coli*. Genetics, 1997. 147(4): 1653-64.
98. Lin, J. and Vogt, V.M., *Functional alpha-fragment of beta-galactosidase can be expressed from the mobile group I intron PpLSU3 embedded in yeast pre-ribosomal RNA derived from the chromosomal rDNA locus*. Nucleic Acids Research, 2000. 28(6): 1428-38.

## 6. Literaturverzeichnis

99. Waters, T.R. and Connolly, B.A., *Continuous spectrophotometric assay for restriction endonucleases using synthetic oligodeoxynucleotides and based on the hyperchromic effect*. Analytical Biochemistry, 1992. 204(1): 204-9.
100. Jeltsch, A., et al., *A fast and accurate enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the DNA cleavage activity of restriction endonucleases*. Analytical Biochemistry, 1993. 213(2): 234-40.
101. Cirino, P.C., Mayer, K.M., and Umeno, D., *Generating mutant libraries using error-prone PCR*. Methods Mol Biol., 2003. 231: 3-9.
102. Zhao, H., Chockalingam, K., and Chen, Z., *Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(2): 104-10.
103. Tracewell, C.A. and Arnold, F.H., *Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time*. Current Opinion in Chemical Biology, 2009. 13(1): 3-9.
104. Gruen, M., et al., *An in vivo selection system for homing endonuclease activity*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(7): e29.
105. Yang, Z., et al., *Structure of HinP1I endonuclease reveals a striking similarity to the monomeric restriction enzyme MspI*. Nucleic Acids Research, 2005. 33(6): 1892-901.
106. Chen, Z. and Zhao, H., *A highly sensitive selection method for directed evolution of homing endonucleases*. Nucleic Acids Research, 2005. 33(18): e154.
107. Arnould, S., et al., *Engineered I-CreI Derivatives Cleaving Sequences from the Human XPC Gene can Induce Highly Efficient Gene Correction in Mammalian Cells*. J Mol Biol, 2007. 371(1): 49-65.
108. Seligman, L.M., et al., *Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(17): 3870-9.
109. RC, D., et al., *Genetic regulation: the Lac control region*. Science, 1975. 187(4171): 27-35.
110. Tang, G.Q., Bandwar, R.P., and Patel, S.S., *Extended upstream A-T sequence increases T7 promoter strength*. J Biol Chem., 2005. 280(49): 40707-13.
111. Mullis, K.B., Ferre, F., and Gibbs, R.A., *The polymerase chain reaction (PCR)*. Journal of Evolutionary Biology, 1994. 8: 399-401
112. RB, W., et al., *Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch*. Nucleic Acids Research, 1979. 6(11): 3543-57.
113. RM, H., et al., *Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction*. BioTechniques, 1990. 8(5): 528-535.
114. Lefebvre, B., Formstecher, P., and Lefebvre, P., *Improvement of the gene splicing overlap (SOE) method*. BioTechniques, 1995. 19(2): 186-8.
115. Ge, L. and Rudolph, P., *Simultaneous introduction of multiple mutations using overlap extension PCR*. BioTechniques, 1997. 22(1): 28-30.
116. Kirsch, R.D. and Joly E., *An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes*. Nucleic Acids Res., 1998. 26(7): 1848-50.
117. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): 680-5.
118. Kang, D.H., et al., *Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. Bull. Korean Chem. Soc., 2002. 23(11): 1151-1152.
119. Pace, C.N., et al., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Science, 1995. 4(11): 2411-23.

## 6. Literaturverzeichnis

120. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. 72: 248-54, 1976.
121. Prieto, J., *et al.*, *The C-terminal loop of the homing endonuclease I-CreI is essential for site recognition, DNA binding and cleavage*. Nucleic Acids Res, 2007. 35(10): 3262-71.
122. Sussman, D., *et al.*, *Isolation and characterization of new homing endonuclease specificities at individual target site positions*. J Mol Biol, 2004. 342(1): 31-41.
123. Broering, J.M. and Bommarius, A.S., *Evaluation of Hofmeister effects on the kinetic stability of proteins*. J Phys Chem B, 2005. 109(43): 20612-9.
124. Robert, L.B., *How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability*. Biophysical Journal, 1996. 71.
125. Pingoud, V., *et al.*, *On the divalent metal ion dependence of DNA cleavage by restriction endonucleases of the EcoRI family*. Journal of Molecular Biology, 2009. 393(1): 140-60.
126. Horwitz, J.P., *et al.*, *Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- $\beta$ -D-glycopyranosides*. Journal of Medicinal Chemistry, 1964. 7: 574-575.
127. Kiernan, J.A., *Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes*. Biotechnic & Histochemistry, 2007. 82(2): 73-103.
128. Gabsalilow, L., *et al.*, *Site- and strand-specific nicking of DNA by fusion proteins derived from MutH and I-SceI or TALE repeats*. Nucleic Acids Res, 2013. Apr;41(7): e83.
129. D'Halluin, K., *et al.*, *Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize*. Plant Biotechnol J., 2008. 6(1): 93-102.

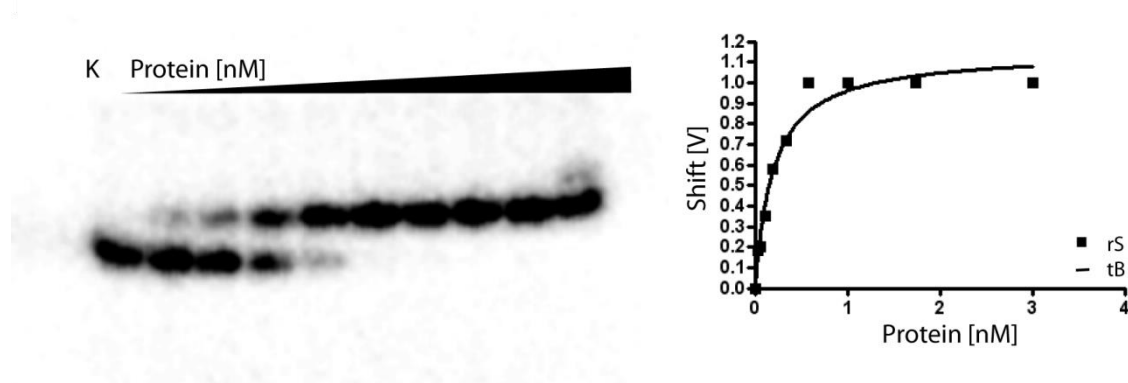
## 7. Anhang

### 7. Anhang

#### 7.1 EMSA mit I-Cre<sup>t</sup>

Mithilfe der quantitativen *Bandshift*-Analyse bzw. eines EMSA wurde die Affinität von I-Cre<sup>t</sup> zu seiner Zielsequenz bestimmt. Mittels PCR wurde ein 146 Bp großes DNA-Fragment mit integrierter I-CreI-Erkennungssequenz hergestellt und mit [ $\alpha^{32}$ P]-dATP radioaktiv markiert (siehe 2.2.1.8.4). Dazu wurden in der PCR das Plasmid pDMHS-Cre und die Primer G026/G027 verwendet (die Primersequenzen s.u.). Die Reaktion und Analyse wurde wie im Punkt 2.2.2.3.6 beschrieben, aber im DBB-Puffer (Pufferzusammensetzung ist s.u. aufgeführt), durchgeführt. Die Quantifizierung des EMSA erfolgte anschließend anhand der Bandenintensitäten von ungebundenen (ungeshifteten) und gebundenen (geschifteten) DNA-Fragmenten, die über den Instand Imager analysiert wurden.

Dabei wurde ein  $K_D$ -Wert von  $0,16 \pm 0,06$  nM für I-Cre<sup>t</sup> verifiziert.



**Abbildung 7.1: Quantitative Bandshift-Analyse von I-Cre<sup>t</sup>**

Die autoradiographische Untersuchung zur Bindung von der inaktiven I-CreI Variante (I-Cre<sup>t</sup>) zur Zielsequenz wurde mittels EMSA durchgeführt. Dabei wurde bei konstanter DNA Konzentration (0,31 nM) die Proteinkonzentration immer weiter erhöht bis sich eine Sättigung einstellt (0,04; 0,06; 0,11; 0,19; 0,34; 0,85; 1; 1,74; 3,01 nM). Der ermittelte  $K_D$ -Wert beträgt  $0,16 \pm 0,05$  nM. Die Graphische Auswertung wurde aus drei EMSA-Gelbildern analysiert und dabei Shift gegen Proteinkonzentration dargestellt.

(rS= relativer Shift, tB= theoretische Bindung)

(K= Kontrolle, ohne Protein)

**DBB-Puffer:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM CaCl, 10% Glycerin

**Primersequenzen:**

G026: AAGAGGCCCGCACCGATCGC

G027: ACCATATGCGGTGTGAAATAC