

Funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur ternären Komplexbildung zwischen MutS und MutL im *mismatch*-Reparatursystem

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Diplom-Biologin Ines Winkler

Gießen, 2010

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2006 bis März 2010 im Institut für Biochemie des Fachbereichs 08 an der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Betreuung von Prof. Dr. Peter Friedhoff angefertigt und unterstützt durch das von der DFG finanzierte IRTG (International Research Training Group) „*Enzymes and Multienzyme complexes acting on nucleic acids*“ und das EU-Projekt „*mismatch2model*“.

Dekan:

Prof. Dr. Volkmar Wolters
Institut für Ökologie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26
35392 Gießen

Erstgutachter:

Prof. Dr. Peter Friedhoff
Institut für Biochemie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58
35392 Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Alexander Brehm
Institut für Molekularbiologie und
Krebsforschung (IMT)
Philipps-Universität Marburg
Emil-Mannkopff-Straße 2
35033 Marburg

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. 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.“

(Ines Winkler)

Gießen, den

**„Viel mehr als unsere Fähigkeiten sind es unsere Entscheidungen,
die zeigen wer wir wirklich sind.“**

J. K. Rowling: Harry Potter und die Kammer des Schreckens

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud danke ich für die Möglichkeit meinen Doktor in seinem Institut zu erlangen, die stetige Motivation und die sehr hilfreichen Diskussionen im Seminar. Außerdem für den Beweis, dass Zielstrebigkeit und Ausdauer zum Erfolg führen können und für die Chance gute Wissenschaft zu erkennen und selbst zu erlernen.

Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die anhaltend gute Betreuung, für die vielen, neuen Ideen, die anregenden Diskussionen, die Möglichkeit aus eigenen Fehlern zu lernen ohne angemotzt zu werden, die unendliche Geduld und das erwiesene Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Alexander Brehm danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gute Zusammenarbeit und Ko-Betreuung im Rahmen des IRTGs.

Dank auch an alle Kooperanden in Hannover, Amsterdam, Rotterdam und Moskau.

Ich danke allen Mitglieder der „MMR-Gruppe“ für die doch immer abwechslungsreiche Atmosphäre und die vielen Tipps und Tricks beim Arbeiten. Beim Andi für seine unglaubliche Gelassenheit und die nette gemeinsame Zeit am Schreibtisch und der *bench*.

Bei den drei Damen im Sekretariat, Karina, Ina und Anja, möchte ich mich für die aufopfernde Unterstützung bei den unendlichen vielen bürokratischen Probleme bedanken und bei Anja insbesondere für das schnelle Herausfinden der optimalsten Transfer- und Übernachtungsmöglichkeiten in die großen, weiten Welt.

Claudia „Dekanöse“ Nickel danke ich für das schnelle und sorgfältige Lesen meiner Arbeit, das offene Ohr, das Gut-zu-reden, wenn mal wieder nix geht und für die regelmäßigen Kontrollgänge des Heinrich-Buff-Rings bei Wind und Wetter.

Ein besonderer Dank geht an Gregor Meiss für die Beantwortung all meiner „dummen“ Fragen (auch wenn keine Zeit dafür war), die moralische Unterstützung bei zwischenmenschlichen Problemen, den Humor und die Geduld sowie die kraftraubenden Kämpfeleien auf dem Gang, die mir seit seinem Weggang sehr fehlen. ☺

Außerdem geht mein Dank an die DFF-Gruppe die mich als Gruppenmitglied „adoptiert“ haben und immer für mich da waren. Natürlich bedanke ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts, insbesondere bei Jasmina für das Lesen der Arbeit und die Möglichkeit mein Englisch noch etwas zu verbessern.

Bei Jana und Uta möchte ich mich für die schönen langen nicht-wissenschaftlichen Telefonate bedanken, auch wenn diese in letzter Zeit doch selten geworden sind. Bei der Familie Löwe, die mir gezeigt haben, dass man sich nicht immer zu ernst nehmen sollte. Sorry, dass es mir nicht gelungen ist, Sarah vom Biostudium abzuhalten. ☺

Kathi, Ilse und Silke danke ich für die vielen Kinobesuche, die lustigen Feiern in der Villa und die unkomplizierte Aufnahme in eure Runde. Es ist schön euch zu kennen!

Ein Dank geht an Marika, besser bekannt als Peanut, für den nicht enden wollenden Optimismus und die Motivation bei unlösbaren Aufgaben. Sowie die stetige Versorgung des hungrigen „Tigers“ mit leckerem, selbstgekochten Essen und das dabei hinterlassene Chaos in unserer Küche.

Ein großer Dank geht an meine Familie, die im Hintergrund immer da war, mich unterstützt hat und für die nötige Abwechslung in Dresden sorgt.

Ein weiterer Dank geht an all die verrückten Muromachi-Krieger und SKID-Mitglieder, die mich nie vergessen haben, auch wenn die Trainingseinheiten und Lehrgangsfeiern immer häufiger ohne mich stattfanden. Domo arigato!

„Nur die Besten sterben jung“ und ihr beiden zähltet dazu!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	9
Abstract	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Das DNA- <i>mismatch</i> -Reparatursystem (MMR).....	14
1.1.1 Biologische Funktion und Folgen bei Defekten im MMR.....	14
1.1.2 Das MMR-System in unterschiedlichen Organismen.....	15
1.1.3 Erkennung und Reparatur der Fehlpaarung im <i>E. coli</i> MMR-System	18
1.2 Die <i>mismatch</i> Reparaturproteine (MutHLS).....	20
1.2.1 MutS, das <i>mismatch</i> -Erkennungsprotein	20
1.2.2 Durch ATP-Bindung und -Hydrolyse vermittelte Konformationsumwandlung	24
1.2.3 MutL, Vermittler zwischen <i>mismatch</i> -Erkennung und Strangdiskriminierung	27
1.2.4 MutH, die Endonuklease.....	29
1.3 Ziel der Arbeit.....	31
1.4 Crosslinken und Modifikation von MMR-Proteinen	31
2 Material und Methoden.....	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Chemikalien.....	37
2.1.2 Crosslinker.....	38
2.1.3 Fluorophore.....	38
2.1.4 Enzyme	39
2.1.5 Proteine.....	39
2.1.6 Primer	41
2.1.7 Oligonukleotide	42
2.1.8 Protein und DNA-Marker	42
2.1.9 Komplettsysteme (<i>Kits</i>) und Säulen zur Proteinreinigung	42
2.1.10 Puffer	43
2.2 Mikrobiologisches Arbeiten.....	46
2.2.1 Bakterienstämme	46
2.2.2 Plasmide.....	46
2.2.3 Medium.....	47
2.2.4 Herstellung elektrokompenter Zellen.....	47
2.2.5 Herstellung TSS-kompenter Zellen.....	47
2.3 Molekularbiologische Methoden	48
2.3.1 Gelelektrophorese	48
2.3.2 PCR-Reaktion	48

2.3.3	PCR-Produktreinigung.....	48
2.3.4	Plasmidreinigung	48
2.3.5	DNA-Sequenzierung.....	48
2.3.6	Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren.....	49
2.3.7	Bestimmung der Konzentrationen von Proteinen	49
2.3.8	Zielgerichtete Mutagenese zur Herstellung von Einzelcysteinvarianten.....	49
2.3.9	Proteinreinigung über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	55
2.3.10	Zielgerichtete Fluorophormodifikation von SC-MutS und SC-MutL Varianten	57
2.3.11	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	57
2.3.12	Thrombinspaltung	58
2.3.13	Crosslink-Experimente.....	58
2.3.14	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	61
2.3.15	Herstellung linearer DNA-Substrate	63
2.3.16	Herstellung zirkulärer DNA-Substrate.....	65
2.3.17	Mismatch-abhängige MutH-Aktivierung	67
3	Ergebnisse	69
3.1	Photo- und thiol-spezifischer Crosslink zwischen MutS und MutL	69
3.2	Bestimmung der Crosslinkposition im MutS ^{WT}	74
3.3	MutL ^{N131C} crosslinkt zu Cys-246 in der <i>connector</i> -Domäne von MutS	77
3.4	MutS Dimer ist ausreichend für die Interaktion mit MutL.....	82
3.5	LN40 ist für die Interaktion mit MutS ausreichend.....	85
3.6	Fluorophormodifikation von Cysteinresten in MutS und MutL.....	88
3.7	Funktionelle Analyse von markierten MutS und MutL Varianten mittels FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)	92
3.8	Fluorophormarkiertes Cys-246 in der <i>connector</i> -Domäne in MutS behindert die MutH-Aktivierung	96
3.9	Konformationsumwandlung im MutS	100
4	Diskussion.....	105
5	Zusammenfassung	117
6	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	125
7.1	Zusatzinformationen.....	125
7.2	Abkürzungsverzeichnis	129
7.3	Veröffentlichungen.....	133
7.4	Teilnahme an Konferenzen/Workshops	133

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung

1-I:	DNA-Schädigung, Reparaturmechanismen und Konsequenzen	13
1-II:	Schema des MMR-Systems	16
1-III:	Mechanismus zur <i>mismatch</i> -Erkennung und Reparatur	19
1-IV:	Darstellung der <i>E. coli</i> MutS Struktur (pdb 1e3m)	22
1-V:	<i>Clamp</i> - und <i>mismatch</i> -Bindungsdomäne vermittelte Interaktion mit der Fehlpaarung	23
1-VI:	Modell für die ATPase Aktivität von eukaryotischem MutS	25
1-VII:	Modell für die Konformationsumwandlung von MutS	27
1-VIII:	Modell des <i>E. coli</i> MutL Gesamtproteins, basierend auf den Strukturen der N-terminalen (LN40) und C-terminalen (LC20) Fragmente	28
1-IX:	Ko-Kristallstruktur von <i>Haemophilus influenzae</i> MutH	30
1-X:	Vereinfachte Darstellung der Crosslinkreaktion zwischen MutS und MutL	33
1-XI:	Strategie zur Untersuchung des MutS-MutL-Komplexes	34
1-XII:	Schematische Darstellung der verwendeten FRET-Assays	35

2 Material und Methoden

2-I:	Struktur von Alexa 488-Maleimid und Alexa 594-Maleimid	39
2-II:	Schematische Darstellung verschiedener Crosslinkreaktionen	60
2-III:	Crosslinkprotokoll	61
2-IV:	484 bp G/T- <i>mismatch</i> -Substrat mit GATC-Erkennungssequenz	63
2-V:	Lineare <i>mismatch</i> -Substratherstellung	64
2-VI:	Zirkuläre <i>mismatch</i> -Substratherstellung	65
2-VII:	DNA-Spaltung durch <i>mismatch</i> -abhängige MutH-Aktivierung	68

3 Ergebnisse

3-I:	Photocrosslink zwischen MutS ^{WT} und MutL ^{N131C}	70
3-II:	ATP- und DNA-abhängiger thiol-spezifischer MutS-MutL-Crosslink	71
3-II:	Crosslinkausbeute ist unabhängig von der Crosslinkerlänge und Crosslinkchemie	72
3-IV:	<i>Mismatch</i> -Abhängigkeit des MutS-MutL-Crosslinks	73
3-V:	Darstellung der endogenen Cysteinreste in MutS	74
3-VI:	Nukleotid- und DNA-Abhängigkeit des MutS-MutL-Crosslinks	76
3-VII:	Zu Cysteinresten veränderte Aminosäuresreste in SC-MutS	77
3-VIII:	Ausbeute der Crosslinkreaktion zwischen SC-MutS zu Cys-131 von MutL ^{N131C}	79
3-IX:	Crosslink zwischen MutS ^{D246C} und MutL ^{N131C}	80
3-X:	Zeitlicher Verlauf der Crosslinkreaktion von MutS ^{93C} und MutS ^{D246C} mit MutL ^{N131C}	81
3-XI:	Kristallstruktur von LN40	82
3-XII:	Konzentrationsabhängigkeit des MutL-MutL-Crosslinks	83
3-XIII:	MutS-MutL-Crosslink mit zirkulärer <i>mismatch</i> -DNA	84
3-XIV:	Thrombinspaltung von MutL ^{N131C} und anschließendes Crosslinken mit MutS ^{D246C}	86
3-XV:	Crosslink zwischen MutS ^{D246C/D835R} und LN40 ^{N131C}	87

3-XVI:	Analytische Ultrazentrifugation mit Alexa 488 modifizierten SC-MutS Varianten	90
3-XVII:	Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen des MutS-MutL-Komplexes	92
3-XVIII:	Ternäre Komplexbildung zwischen MutS und MutL beobachtet durch FRET	95
3-XIX:	MutH-Aktivierung durch nicht-modifiziertes und modifiziertes MutL ^{H297C}	97
3-XX:	Aktivitätstest der modifizierten MutS ^{R449C/D835R} und MutS ^{D246C/D835R} Varianten	99
3-XXI:	ATP- und DNA-Abhängigkeit des internen Crosslinks in MutS	101
3-XXII:	Der interne Crosslink in MutS tritt auch mit kurzer DNA auf	102
3-XXIII:	Modell zur Konformationsumwandlung der <i>mismatch</i> -Bindungsdomäne in MutS	103

4 Diskussion

4-I:	Modell des Komplexes zwischen MutS und MutL	106
4-II:	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen MutS und MutL	109
4-III:	Darstellung eines MutS Heterodimers	113
4-IV:	SC-MutL Varianten für weitere FRET-Messungen	116

7 Anhang

7-I:	Crosslink zwischen MutS ^{WT} und MutL ^{N131C} in Anwesenheit von unterschiedlich langen hetero- oder homoduplex DNA-Substraten	125
7-II:	Crosslink zwischen MutS ^{D162C} und MutL ^{N131C} bzw. MutL ^{K135C} mit unterschiedlich langen Methanthiosulfonat-Crosslinkern	126
7-III:	DNA-Bindung von MutS ^{D246C/D835R} oder MutS ^{R449C/D835R} gemessen durch FRET	126
7-IV:	DNA-Biegung nach DNA-Bindung durch MutS ^{D246C/D835R} oder MutS ^{R449C/D835R} gemessen durch FRET	127
7-V:	MutS-abhängige MutH-Aktivierung durch nicht- bzw. mit Alexa 488 markiertes MutL ^{N131C}	127
7-VI:	MutS-MutL-Crosslinkausbeute zwischen MutS ^{WT} und verschiedenen SC-MutL	128

Abstract

The ternary MutS-MutL-DNA complex is a key intermediate in the mismatch repair (MMR) system for which up to date little structural information is available. Though several research groups have tried to solve this issue employing different biochemical, biophysical and bioinformatics approaches, the structure of the ternary complex still remains elusive. One of the major problems hampering the structural analyses is the highly dynamic nature of this complex. Therefore the aim of the present thesis was the identification of transient MutS-MutL interaction sites in the MMR-system, in order to characterize the ternary complex functionally, to generate a structural model of the complex and to trap the complex chemically for high resolution structural studies.

As a method of choice, chemical modifications with fluorescent dyes and crosslinking of single-cysteine variants of MutS and MutL were used in order to (i) identify positions that are in close proximity within the complex and (ii) to trap the complex for further structural studies. To this end, single-cysteine MutL variants with cysteine residues in all three domains were generated. Furthermore, single-cysteine MutS variants were generated with a cysteine residue located in one of its seven domains (except for the C-terminal dimerization domain). Using these variants, I could demonstrate that position 131 in the N-terminal domain of MutL can be crosslinked to positions 8, 78 or 93 in the mismatch-binding domain (domain I) of MutS. This crosslinking reaction was highly specific as it only occurred under conditions known to induce ternary complex formation, i. e. in the presence of a mismatched-DNA as well as of ATP that had been proposed previously to induce a conformational change in MutS (Iyer, Modrich, 2006)¹.

In addition, two other crosslinked complexes were obtained using MutS variants containing a single-cysteine in the connector domain (domain II) and in the lower part of the core/levers domain (domain III), which is in close proximity to the connector domain. These complexes are DNA and nucleotide dependent but independent of ATP. Residue 246 in the connector domain forms the crosslink with the highest yield which is also observed when using a short crosslinker.

Finally, an important mismatch and- ATP-induced conformational change could be monitored via the formation of an internal crosslink between the mismatch-binding domain, at Cys-93, and the connector domain, at Cys-239 of MutS. The observed crosslink suggests a movement of the mismatch-binding domain towards the connector domain.

The results presented in this thesis are in full agreement with a work published very recently (Mendillo, Kolodner; Nov. 2009)² showing that MutL binds to the connector domain of MutS. Results from the crosslinking experiments were supported by chemical modification and functional analyses via MutS dependent MutH activation and analytical ultracentrifugation with fluorescence detection (in cooperation with Dr. Ute Curth, Hannover). Furthermore, anisotropy and Förster resonance energy transfer (FRET) assays were established to monitor MutS-DNA and MutS-MutL complex formation.

In summary, we have for the first time obtained structural information for two key events in DNA mismatch repair, i. e. the mismatch- and ATP-induced conformational change in MutS and the interaction between MutS and MutL on DNA. For both events, covalently trapped complexes are available that will allow further studies and, last but not least, can result in crystals for high resolution structural studies such as SAXS, AFM, Cryo-EM or X-ray crystallography.

1 Einleitung

Der Erhalt der DNA-Integrität und damit eine identische Weitergabe der Erbinformationen durch die Zellteilung spielt eine wichtige Rolle für das Überleben der Organismen³.

Die genetische Information, welche in der Doppelhelix der DNA gespeichert ist, steht allerdings unter ständigen Attacken durch Umweltfaktoren sowie durch zelleigene Stoffwechselnebenprodukte und spontane Reaktionen, wie Desaminierung. Solche Schädigungen, z. B. Oxidation von Basen, Alkylierung und Methylierung oder die Schädigung durch UV-Strahlung treten einige Tausend Male am Tag in der DNA auf⁴.

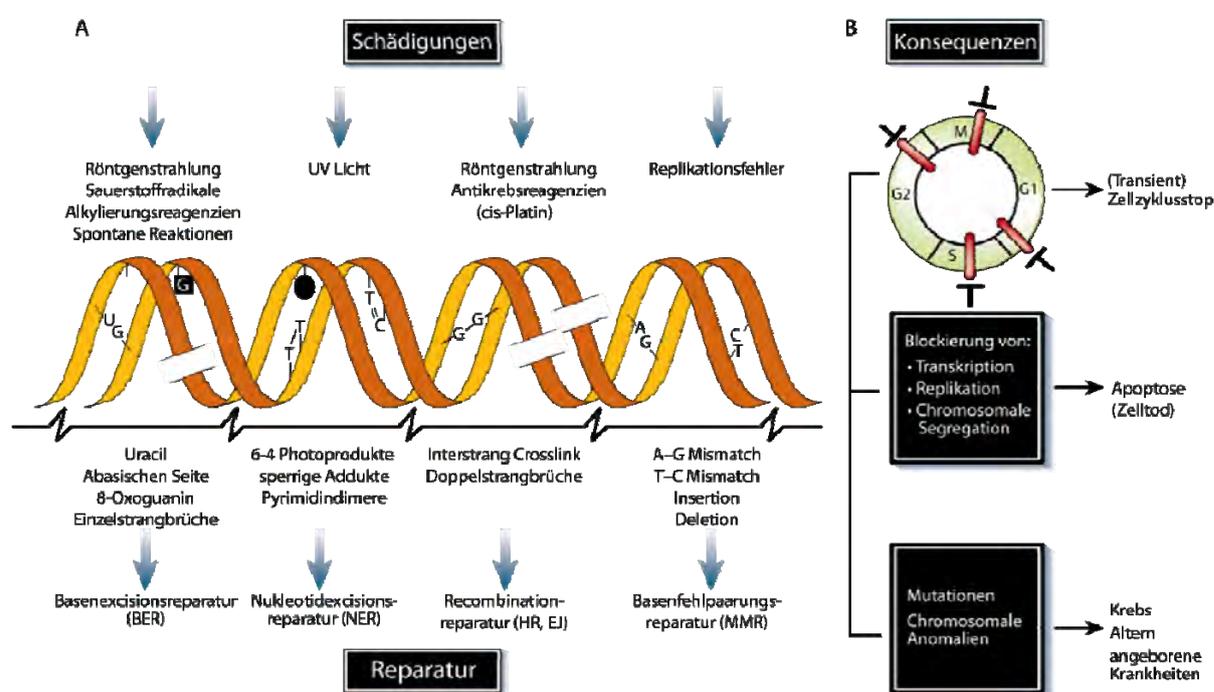


Abbildung 1-I: DNA-Schädigungen, Reparaturmechanismen und Konsequenzen

A) Darstellung der bekanntesten Reagenzien und Umwelteinflüsse (oben), die zur DNA-Schädigung führen können (Mitte) und der Reparaturssysteme, die die auftretenden Veränderungen korrigieren (unten). B) Bei nicht erfolgreicher DNA-Reparatur führen die Fehler an spezifischen Kontrollpunkten (oben) zu transienten Stopps des Zellzyklus und zur Inhibierung von DNA-Stoffwechselmechanismen (Mitte). Langzeitkonsequenzen sind zum Beispiel Punktmutationen, welche einzelne Gene beeinflussen oder chromosomale Anomalien hervorrufen können, die ihrerseits mehrere Gene beeinflussen (unten) und damit biologische Veränderungen verursachen können (Krebs, Altern). Abkürzungen: HR, Homologe Rekombination; EJ, *end joining*; Abbildung modifiziert nach Hoeijmakers⁴

Diese Veränderungen können vor, während oder nach der Zellteilung eintreten, erfolgt keine Reparatur durch die in der Zelle vorhandenen DNA-Reparatursysteme (Abbildung 1-I), können die auftretenden Mutationen Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, hervorrufen⁵.

In der Zelle gibt es verschiedene Reparatursysteme, die an bestimmten Kontrollpunkten innerhalb des Zellzyklus einen Stopp hervorrufen und die Schädigung dann entfernen können. Blockierung der Transkription, Replikation oder spezifischer Sensoren verursachen einen solchen Stopp. Ist der Zellschaden über diesen Schritt hinaus, kann größerer Schaden oftmals nur noch mittels des programmierten Zelltodes (Apoptose) verhindert werden⁴.

Um auf die vielfachen, unterschiedlichen DNA-Schäden reagieren zu können, haben sich im Laufe der Evolution unterschiedliche Reparatursysteme auf die Erkennung und Reparatur bestimmter Fehler hin spezialisiert entwickelt.

Eines dieser Systeme ist das Basenfehlpaarungskorrektursystem (*mismatch repair system*, MMR-System), dessen Untersuchung Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit ist. Dieses Reparatursystem existiert in fast allen Organismen von Bakterien bis zu den höheren Eukaryoten. Es wird vor allem während der Replikation aktiv und behebt Fehlpaarungen und *insertion-deletion loops* (IDL), die durch die DNA-Polymerase entstehen und nicht mit Hilfe ihrer Korrekturleseaktivität ausgebessert wurden. Die IDL entstehen bei der Replikation von Mikrosatelliten (repetitive DNA-Sequenzen), wenn sich Folgestrang und Leitstrang zwischenzeitlich nicht korrekt zusammenlagern. In *Escherichia coli* (*E. coli*) sorgt das Basenfehlpaarungskorrektursystem für die Senkung der Fehlerrate um das bis zu 1000fache auf 10^{-10} Fehler pro eingebautem Nukleotid⁶.

1.1 Das DNA-*mismatch*-Reparatursystem (MMR)

1.1.1 Biologische Funktion und Folgen bei Defekten im MMR

Kommt es zur Basenfehlpaarung während der Replikation oder bei homologer Rekombination, wird diese erkannt und damit das Reparatursystem aktiviert. Verschiedene Proteine werden dabei rekrutiert und bewirken nach der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung letztendlich die Entfernung eines längeren einzelsträngigen DNA-Bereichs und die Neusynthese der DNA mit anschließender Verknüpfung zum bereits vorhandenen Strang. Defekte im MMR-System konnten mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht werden: Mutationen in Genen von Proteinen, die an der Reparatur beteiligt sind, können die Ursache für die Entstehung einer speziellen Form des Darmkrebses (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC oder Lynch-Syndrom) sein⁷. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zum Auftreten von vereinzelt Tumoren kommen kann, wenn Promotorregionen von *mismatch*-Reparaturgenen durch Methylierung inaktiviert werden⁸.

Mikrosatelliten sind lange, instabile und sich wiederholende DNA-Sequenzen, welche durch Strangverschiebung und ineffiziente Korrekturlesung falsch amplifiziert werden. Das Basenfehlpaarungskorrektursystem ist das Hauptreparatursystem gegen die Veränderung der Mikrosatellitensequenzen. Die Veränderlichkeit innerhalb der Mikrosatelliten wird daher in der Krebsforschung als Biomarker für den Aktivitätsverlust des *mismatch*-Reparatursystems in Krebszellen verwendet⁹.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass das *mismatch*-Reparatursystem auch eine Rolle bei der Zellantwort auf DNA verändernde Faktoren, wie Cisplatin, ionisierende Strahlung, UV-Strahlung oder DNA interkalierende Reagenzien spielt. Dabei werden Kontrollpunkte im Zellzyklus initiiert, wenn DNA-Schäden von *mismatch*-Reparaturproteinen erkannt wurden, aber ihre Reparatur fehlgeschlagen ist. Es scheint, dass die Intermediate dieser Prozesse die Apoptose und den damit verbundenen Zelltod auslösen¹⁰. Schäden im MMR-System führen dazu, dass die sofortige Zellantwort in Form von Apoptose ausbleibt, eine erhöhte Überlebensrate der Zellen eintritt und eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, wie Cisplatin, entsteht⁹.

Zusätzlich zur Rolle in der Reparatur direkt nach der Replikation dient das MMR-System auch als Kontrolle zur Verhinderung von homeologer Rekombination zwischen ähnlichen aber nicht identischen Sequenzen. Es stellt damit eine Barriere für den genetischen Austausch zwischen verschiedenen Arten dar¹¹. Des Weiteren ist es an der Regulation von meiotischer Chromosomenpaarung und Segregation sowie Immunglobulinklassenwechsel und Hypermutationen beteiligt^{12; 13}.

Für die Zelle ist es wichtig, DNA-Schäden zu reparieren, aber auch das Wie, Wo und Wann dieser Korrektur ist relevant und von immenser Bedeutung für die genetische Integrität der Zelle. Daher sind Untersuchungen der MMR-Proteine, der Interaktionen der einzelnen Proteine untereinander und zur DNA sowie des Ablaufs der Reparatur und der Aktivierung von nachfolgenden Partnern von großer Bedeutung für das Verständnis des Systems.

1.1.2 Das MMR-System in unterschiedlichen Organismen

Das methylvermittelte MutHLS System in *Escherichia coli* ist das am besten charakterisierte bakterielle *mismatch*-Reparatursystem. Es konnte bereits 1989 mit gereinigtem Protein *in vitro* rekonstruiert werden^{1; 9; 14}. An den ersten Schritten beteiligt sind die drei Proteine MutS, MutL und MutH. Das *mismatch*-Erkennungsprotein MutS ist für die Erkennung und Bindung der Fehlpaarung und die damit verbundene DNA-Biegung verantwortlich. MutL ist der

Vermittler zwischen der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung durch die Endonuklease MutH (Abbildung 1-II).

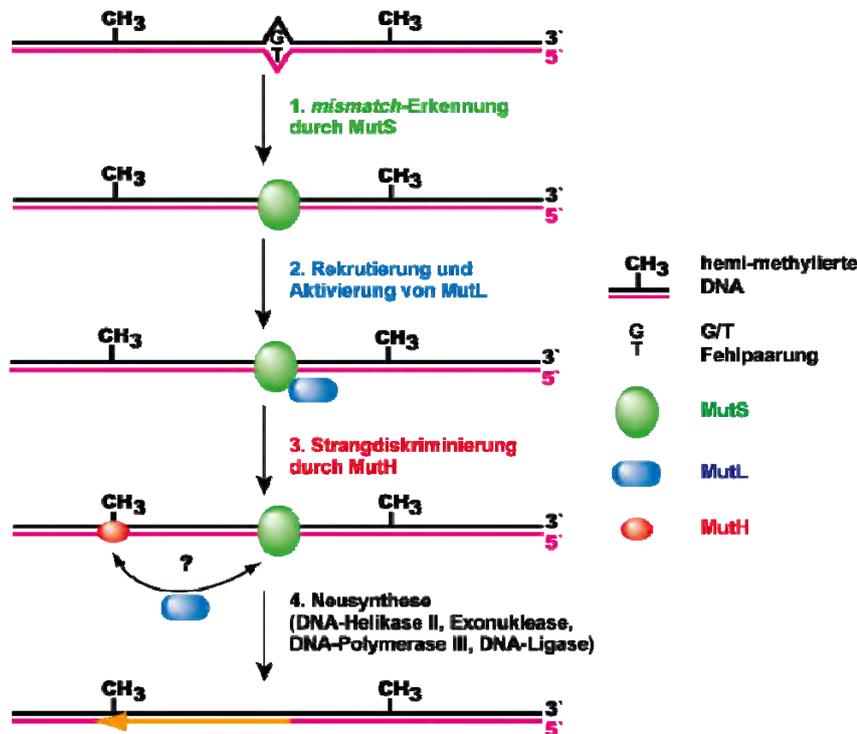


Abbildung 1-II: Schema des MMR-Systems

Eine Fehlpaarung in hemimethylierter DNA (Mutterstrang in Schwarz mit Methylierung (CH₃-Gruppe) und Tochterstrang in Magenta) wird durch MutS (Grün) erkannt. MutL (Blau) wird rekrutiert und aktiviert die Endonuklease MutH (Rot), welche für die Strangdiskriminierung sorgt. Nachfolgende Proteine (DNA-Helikase II, Exonukleasen, DNA-Polymerase III, DNA-Ligase) entfernen das fehlerhafte DNA-Fragment und synthetisieren den neuen, fehlerfreien DNA-Strang (Gelb).

Auch das eukaryotische MMR-System konnte, allerdings erst 20 Jahre nach dem *E. coli* System, vollständig *in vitro* rekonstruiert werden¹⁵. In Eukaryoten existieren mehrere MutS- (MSH-Proteine) und MutL-Homologe (MLH-Proteine) in der Zelle (Tabelle 1-I). Diese liegen, im Gegensatz zu ihren bakteriellen Vertretern, nicht als Homodimere, sondern als Heterodimere vor^{1; 12; 13}. MutS α , bestehend aus zwei der sechs bisher charakterisierten MutS-Homologen MSH2/MSH6, bindet bevorzugt an Basen-Basen Fehlpaarungen und einbasischen IDL, wohingegen MutS β (MSH2/MSH3) bevorzugt an 2-4 Basen IDL bindet. Andere MutS-Homologe wie MSH4 und MSH5 sind während der meiotischen Rekombination aktiv¹⁶; ¹⁷. Für die *mismatch*-Erkennung innerhalb menschlicher Zellen scheint MutS α die wichtigste Rolle zu spielen, obwohl MutS α und MutS β ähnliche Fehlpaarungen erkennen¹³. Zurzeit wird angenommen, dass, genauso wie im *E. coli* System, die Bindung der MutS-Homologen an der Fehlpaarung der Auslöser für einen ATP-abhängigen Schritt ist, der eine Interaktion mit den humanen MutL α (MLH1/PMS2) und/oder MutL β (MLH1/PMS1) erlaubt. Dieser ternäre

Komplex zwischen MutS, MutL und DNA im *E. coli* System bzw. im humanen System scheint in folgenden Schritten weitere Partner zu rekrutieren, welche nach der *mismatch*-Erkennung für die Strangdiskriminierung, die Entfernung des fehlerhaften Stranges und die Neusynthese verantwortlich sind. Interessanterweise wurde bisher kein strukturelles oder funktionelles MutH-Homolog in Eukaryoten und den meisten anderen Bakterien gefunden. Daher ist nicht klar, welche Komponente für die Strangdiskriminierung in diesen Organismen verantwortlich ist. Außerdem fehlt in einigen eukaryotischen Systemen, wie Hefe, die Methylierung, aber es wird vermutet, dass die Strangdiskriminierung ebenfalls durch einen Einzelstrangbruch vermittelt wird. Eine viel diskutierte Hypothese ist die direkte Kopplung der MMR an die Replikationsgabel, wobei das System die 5' oder 3' Enden der Okazaki Fragmente im Folgestrang oder die 3' Enden im Leitstrang erkennt¹³. Ferner könnte das humane MutL, das eine Endonukleaseaktivität besitzt, an der Strangdiskriminierung und der Erzeugung des initialen Strangbruchs beteiligt sein¹⁸.

Tabelle 1-I: Vergleich zwischen *E. coli* und eukaryotischen Reparaturproteinen (unvollständig)^{9; 11}

<i>E. coli</i> Proteine	Eukaryotische Homologe	Funktion
MutS (Homodimer)	hMutSa (MSH2/MSH6) ^{a)}	Erkennung von Fehlpaarungen und DNA-Schäden
	hMutSβ (MSH2/MSH3)	Reparatur von IDL (2-16 Basen)
	MSH4/MSH5 (<i>S. cerevisiae</i> , human)	Meiotische Rekombination
MutL (Homodimer)	hMutLa (MLH1/PMS2) ^{a)} , yMutLa (Mlh1/Pms1)	Vermittler zwischen verschiedenen Reparaturproteinen
	hMutLβ (MLH1/PMS1)	unbekannt ^{b)}
	yMutLβ (Mlh1/Mlh2)	an der Reparatur von IDL beteiligt
	hMutLγ (MLH1/MLH3), yMutLγ (Mlh1/Mlh3)	an der Reparatur von IDL und meiotische Rekombination beteiligt
MutH	unbekannt ^{b)}	Strangdiskriminierung
DNA-Helikase II	unbekannt ^{b)}	Entwinden der DNA
ExoI, ExoX, RecJ, ExoVII	EXO1	DNA-Abbau
DNA-Polymerase III	DNA-Polymerase δ	DNA-Neusynthese
SSB	RPA (<i>ssDNA binding protein</i>)	Beteiligt an DNA-Exzision und Synthese
DNA-Ligase	DNA-Ligase	schließt Einzelstrangbrüche

a) Hauptkomponente in der Zelle

b) bis jetzt noch nicht identifiziert

1.1.3 Erkennung und Reparatur der Fehlpaarung im *E. coli* MMR-System

Die grundlegenden Mechanismen im prokaryotischen und eukaryotischen MMR-System zur Erkennung von Insertionen, Deletionen und Basenfehlpaarungen (außer C-C Paarungen) scheinen gleich zu sein¹¹. Allerdings weichen die Systeme bei der Unterscheidung zwischen dem fehlerfreien Mutterstrang und dem neusynthetisierten, fehlerhaften Strang ab. In *E. coli* erfolgt die sogenannte Strangdiskriminierung durch die fehlende Methylierung. Die DNA-Adenin-Methyltransferase (DAM) überträgt eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin (SAM) auf das N⁶-Atom des Adenins innerhalb der GATC-Erkennungssequenz der Endonuklease MutH. Dieser Methylierungsprozess setzt allerdings etwas zeitversetzt nach der Replikation ein. In diesem kurzen Zeitraum, in dem der neusynthetisierte Strang unmethyliert und der Mutterstrang methyliert vorliegen, ist eine Strangdiskriminierung durch die Endonuklease MutH, die nur un- bzw. hemimethylierte GATC-Sequenzen spaltet, möglich. Durch die Markierung des fehlerhaften Stranges kann dieser in darauffolgenden Schritten entfernt und neusynthetisiert werden.

An dem vollständigen Reparaturprozess sind insgesamt bis zu elf Genprodukte beteiligt, die drei bereits erwähnten und für diese Arbeit relevanten Proteine MutS, MutL und MutH sind dabei für die *mismatch*-Erkennung und die Strangdiskriminierung zuständig. Die anderen beteiligten Komponenten sind die DNA-Helikase II, das Einzelstrangbindeprotein (SSB, *single-strand binding protein*), die Exonukleasen I, X, VII oder RecJ, die DNA-Polymerase III-Holoenzym und die DNA-Ligase (Tabelle 1-I).

Das homodimere MutS ist im ersten Schritt der Reparatur für das Überprüfen der DNA nach einer Fehlpaarung verantwortlich. Wurde ein *mismatch* durch MutS erkannt, erfolgt eine Biegung der DNA um $\sim 60^\circ$ am *mismatch*¹⁹ und die ATP-abhängige Rekrutierung und Aktivierung von MutL (Abbildung 1-III). Beide Proteine sind ATPasen, allerdings ist bisher nur für MutS geklärt, dass es nach der *mismatch*-Erkennung zum Nukleotidaustausch und zur Konformationsumwandlung in die *sliding-clamp* kommt (Abschnitt 1.2.2). Für MutL ist der Zeitpunkt der Nukleotidbindung (Nukleotidaustausch) und der ATP-Hydrolyse unbekannt. Der ternäre Komplex aktiviert im nächsten, ebenfalls noch mechanistisch wenig verstandenen Schritt, die Endonuklease MutH, welche den unmethylierten DNA-Strang 5' zum G der GATC-Erkennungssequenz spaltet. Die Erkennungssequenz kann bis zu 1000 bp vom *mismatch* entfernt liegen²⁰. Der folgende, erneut MutS- und MutL-abhängige Schritt lädt die DNA-Helikase II auf den Strangbruch und entwindet den DNA-Doppelstrang in Richtung der Fehlpaarung^{21; 22}. Das MMR-System ist bidirektional, eine Fehlpaarung kann demzufolge 5' oder 3' der hemimethylierten GATC-Sequenz korrigiert werden. Die DNA-Helikase II

entwindet aber ausschließlich in 3' → 5' Richtung. Das Laden der DNA-Helikase II in der richtigen Orientierung auf die DNA erfolgt vermutlich durch die Interaktion mit MutL, welches die DNA-Helikase II 3' zum *mismatch* auf den entsprechenden Strang lädt²³. Liegt der Strangbruch 3' vom *mismatch*, erfolgt die Hydrolyse durch die Exonukleasen I oder X (3' → 5' Richtung) bis wenige Basenpaare hinter den *mismatch*. Die Exonuklease VII oder RecJ entfernen den fehlerhaften Strang in 5' → 3' Richtung¹. Das SSB-Protein stabilisiert, den durch die DNA-Helikase II entwundenen Einzelstrang während des Abbaus des fehlerhaften Stranges bis hin zur Neusynthese des fehlenden Stückes des Tochterstrangs durch das DNA-Polymerase III-Holoenzym. Zum Schluss wird der Einzelstrangbruch von der DNA-Ligase I verschlossen¹⁴, und die DAM-Methyltransferase methyliert den nun fehlerfreien Tochterstrang⁵.

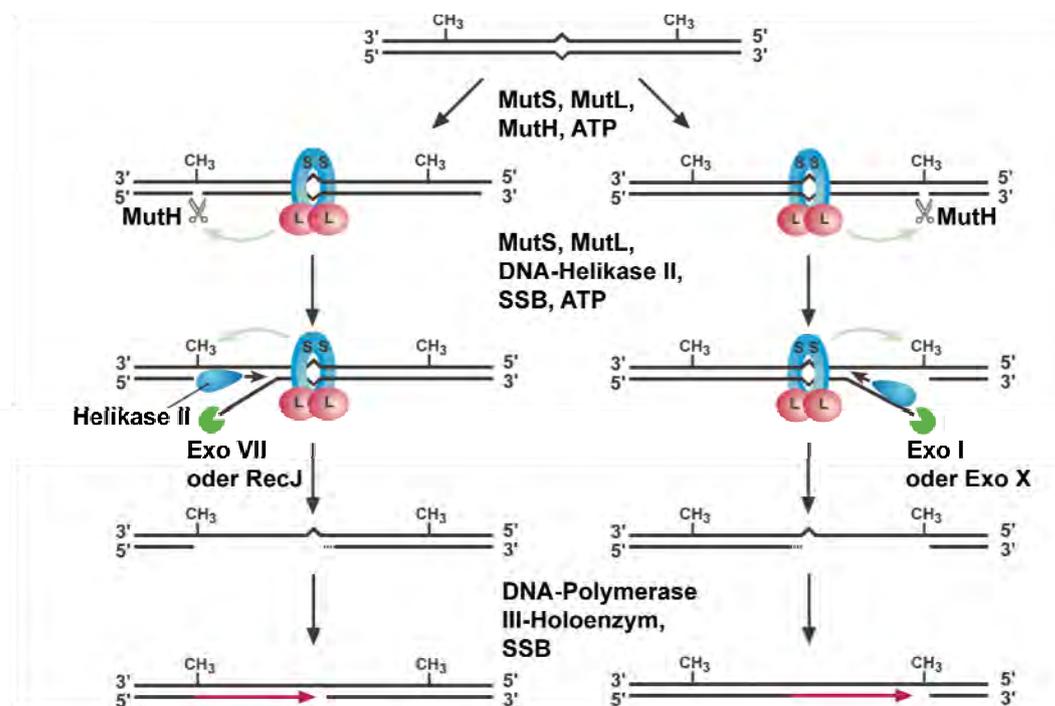


Abbildung 1-III: Mechanismus zur *mismatch*-Erkennung und Reparatur

Die Abbildung zeigt die Reparatur von Fehlpaarungen die 3' (links) oder 5' (rechts) zur GATC-Erkennungssequenz der Endonuklease MutH liegen. Nach Fehlpaarungserkennung durch MutS und MutH-Aktivierung werden weitere Reparaturenzyme rekrutiert bis es zur Neusynthese des fehlerhaften Stranges durch das DNA-Polymerase III-Holoenzym kommt. Weitere Erklärungen im Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Iyer¹. Anmerkung: Die gewöhnlich verwendete Orientierung der DNA (5' - 3' oben und 3' - 5' unten) ist hier vertauscht.

Eine der meistdiskutierten Fragen ist, wie die Kommunikation zwischen der Fehlpaarungserkennung und der bis zu 1000 bp entfernten Strangdiskriminierung erfolgt. In der Literatur gibt es dazu verschiedene Modelle, welche in stationäre und bewegliche unterteilt werden können^{1; 12; 24}. Im stationären Modell wird spekuliert, dass MutS nach der

mismatch-Erkennung an der Fehlpaarung verbleibt, MutL aktiviert und für eine *loop*-Bildung der DNA sorgt. Diese *loop*-Bildung bringt MutL, im ternären Komplex an der Fehlpaarung, mit der Endonuklease MutH an der GATC-Erkennungssequenz in Kontakt und aktiviert diese. Nach dem beweglichen Modell hingegen wird MutS nach der *mismatch*-Bindung durch eine Konformationsumwandlung innerhalb des Proteins in eine *sliding-clamp* umgewandelt. Dies passiert vermutlich durch eine ATP-Hydrolyse abhängige Bewegung (*translocation model*) oder durch ADP-ATP Austausch in einer oder beiden Untereinheiten von MutS¹.

1.2 Die *mismatch* Reparaturproteine (MutHLS)

In den vergangen 25 Jahren ist es gelungen, viele Lücken in unserem Wissen über das Basenfehlpaarungskorrektursystem (MMR) zu schließen. Trotzdem existieren immer noch offene Fragen, wie zum Beispiel die Kommunikation zwischen MutS und MutH stattfindet oder wann es in MutL zur ATP-Hydrolyse kommt¹. Mit Hilfe von Kristallstrukturen und biochemischen Analysen der verschiedenen Proteine war es möglich, neue Ideen über den molekularen Ablauf zu entwickeln. Der folgende Abschnitt soll einzelne, bereits im ersten Teil der Einleitung erwähnte Proteine, hauptsächlich aus *E. coli*, strukturell und funktionell genauer beschreiben.

1.2.1 MutS, das *mismatch*-Erkennungsprotein

Ein Schlüsselmoment für die DNA-Reparatur ist die Erkennung der Fehlpaarung durch MutS. In *E. coli* hat das homodimere, 853 Aminosäuren große MutS Monomer ein Molekulargewicht von 97 kDa und besteht aus sieben Domänen. Die Struktur konnte aus den Ko-Kristallstrukturen aus *E. coli* und *Thermus aquaticus* (*Taq*) mit heteroduplex DNA bestimmt werden (Tabelle 1-II).

Allerdings wurden die Strukturen mit am C-Terminus verkürzten MutS Varianten von *E. coli* (statt 853 nur 800 Aminosäuren) und *Taq* (statt 811 nur 768 bzw. 782 Aminosäuren) gelöst¹⁹; ²⁵. Die Struktur der fehlenden 53 Aminosäuren des *E. coli* MutS wurde für ein Fusionsprotein mit dem Maltosebindungsprotein bestimmt²⁶.

Tabelle 1-II: Kristallstrukturen von bakteriellen MutS Proteinen aus der PDB-Datenbank (unvollständig)

<i>MutS</i>	<i>Ko-Faktor</i>	<i>Fehlpaarung</i>	<i>PDB code</i>	<i>Referenz</i>
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg ²⁺	G/T	1e3m	19
<i>Taq</i> (1-768)	-	Extra T	1ewq	25
<i>Taq</i> (1-782)	-	-	1ewr	25
<i>Taq</i> (1-768)	2 ADP, Mg ²⁺	Extra T	1fw6	27
<i>E. coli</i> R697A (1-800)	ADP, Mg ²⁺	G/T	1ng9	28
<i>Taq</i> (1-768)	ADP, BeF ₃ ⁻	Extra T	1nne	29
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg ²⁺	C/A	1oh5	30
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg ²⁺	A/A	1oh6	30
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg ²⁺	G/G	1oh7	30
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg ²⁺	Extra T	1oh8	30
<i>E. coli</i> (1-800)	ATP, Mg ²⁺	G/T	1w7a	31

Zwei kommaförmige Monomere von MutS bilden das aktive, nach DNA-Bindung funktionell und strukturell asymmetrische Homodimer in Form des griechischen Buchstabens Theta θ mit zwei unterschiedlich großen Kanälen¹. Im größeren der beiden Kanäle wird die heteroduplex DNA gebunden. Dass auch homoduplex DNA dort gebunden wird, ist sehr wahrscheinlich, konnte aber bisher nicht durch Kristallstrukturen belegt werden. Die Funktion des kleineren Kanals ist bislang unbekannt, aber die Größe und die hauptsächlich positive Ladung innerhalb des Kanals könnte auf eine weitere DNA-Bindungsstelle hindeuten²⁹.

Die ersten sechs Domänen von MutS (Abbildung 1-IV), erfüllen mindestens drei Funktionen innerhalb der Basenfehlpaarungskorrektur, nämlich die *mismatch*-Erkennung, ATPase-Aktivität und die Rekrutierung und Aktivierung von MutL.

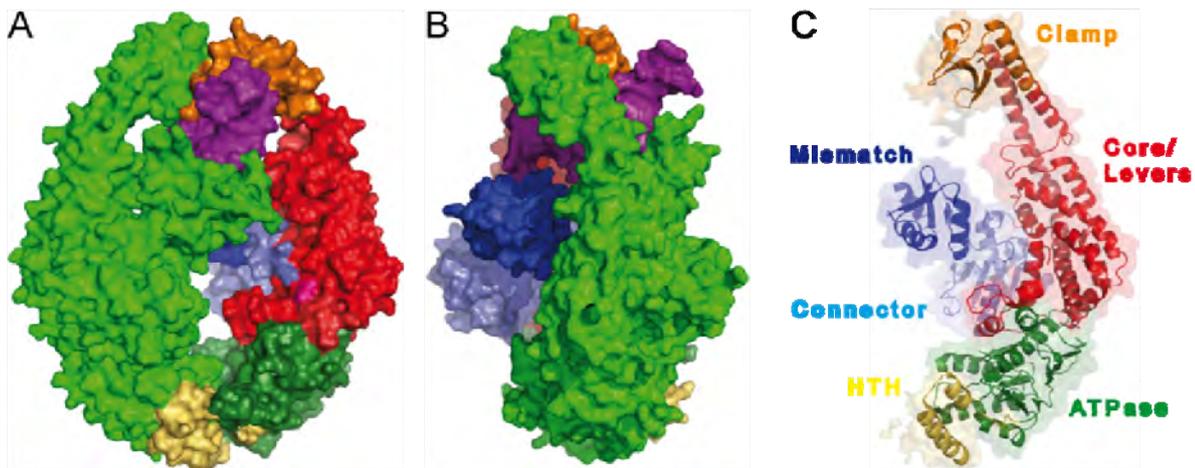


Abbildung 1-IV: Darstellung der *E. coli* MutS Struktur (pdb 1e3m)

A) Darstellung der beiden Untereinheiten von MutS (Frontansicht), welches die DNA (Magenta) gebunden hat. Die Kette A ist in Grün dargestellt und in Kette B sind die einzelnen Domänen (genauere Beschreibung siehe C) in Regenbogenfarben hervorgehoben. B) MutS gebunden an den *mismatch* mit der charakteristischen 60° Biegung der DNA (Magenta). C) Darstellung der verschiedenen Domänen im MutS Monomer gekennzeichnet durch unterschiedliche Farben. Die *mismatch*-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-115, MBD, Domäne I) in Dunkelblau, die *connector*-Domäne (116-266, Domäne II) in Hellblau, die *core/levers*-Domäne (267-443 und 504-567, Domäne III) in Rot, die *clamp*-Domäne (444-503, Domäne IV) in Orange, die ATPase Domäne (568-765, Domäne V) in Grün und das *Helix-Turn-Helix* (HTH) Motiv (766-800) in Gelb¹⁹. Erstellt in PyMol (Delano 2006).

Die DNA-Bindung und die Interaktion mit der Basenfehlpaarung werden durch die *clamp*-Domäne (IV) und die *mismatch*-Bindungsdomäne (I) vermittelt. Die positiv geladene Oberfläche der *clamp*-Domäne formt zum negativ geladenen DNA-Phosphatrückgrat mehrere Salzbrücken aus und bindet dadurch an die DNA (Abbildung 1-V). Nur eine Untereinheit (strukturelle und funktionelle Asymmetrie) interagiert spezifisch über das hoch konservierte Phe-X-Glu Motiv in der *mismatch*-Bindungsdomäne zur Basenfehlpaarung. Dabei interkaliert das Phenylalanin-36 (*E. coli*) zwischen die Basen und wird über das Thymin der Fehlpaarung angeordnet. Durch die Neuorientierung der fehlerhaften Base wird das Stickstoffatom N³ in nähere Umgebung zum Glutamat-38 (*E. coli*) gebracht und eine Wasserstoffbrücke ausgebildet¹⁹. Die *mismatch*-Bindungsdomäne in der zweiten Untereinheit bildet nur wenige Kontakte zum Phosphatrückgrat aus. Nach der *mismatch*-Erkennung wird die DNA, mit dem *mismatch* am Knickpunkt, charakteristisch um 45 - 60° gebogen.

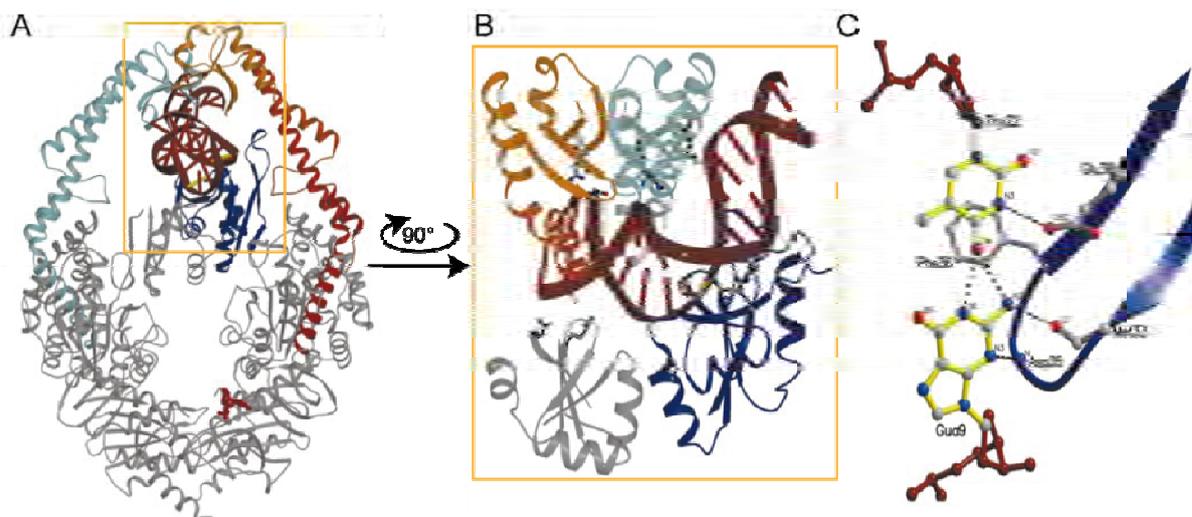


Abbildung 1-V: Clamp- und mismatch-Bindungsdomäne vermittelte Interaktion mit der Fehlpaarung

A) Darstellung von MutS (pdb 1e3m) gebunden an die in Rot dargestellte DNA. In der Untereinheit A ist die *mismatch*-Bindungsdomäne in Dunkelblau, die *levers*-Domäne in Rot, die *clamp*-Domäne in Orange und das gebundene ADP in Rot dargestellt. Die Untereinheit B zeigt die *levers*- und *clamp*-Domäne in Hellblau. Die restliche Struktur wurde in Grau dargestellt. Der gelbumrahmte Bereich ist in B) um 90° im Uhrzeigersinn gedreht und zeigt alle Aminosäurereste, die Wasserstoffbrücken und Ionenbindungen zur DNA (Rot) ausbilden. Die Fehlpaarung wurde in Gelb hervorgehoben und die Domänen weisen die gleiche Farbgebung wie in A) beschrieben auf. C) stellt die *mismatch*-spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Glu-38 zum Stickstoffatom N³ dar. Außerdem erkennt man das Phe-36, welches über der fehlerhaften Base (Thymin-22) in die DNA interkaliert. Abbildung modifiziert nach Lamers¹⁹.

Mutiert man das Phe-36, wird die DNA-Bindung und damit auch die Reparatur verhindert³²; ³³. Eine Mutation des Glu-38 in Alanin steigert die Affinität von MutS zu homoduplex DNA signifikant und weist, durch die fehlende Unterscheidung zwischen korrekter Paarung und Fehlpaarung, einen Mutatorphänotyp im *in vivo* Komplementationsassay (Abschnitt 2.3.8) auf ³²; ³⁴. Die *mismatch*-Bindungsdomäne wird durch die *connector*-Domäne (II) mit der *core*-Domäne (III) verbunden und ist offensichtlich ohne DNA-Bindung extrem flexibel, denn es war bisher nicht möglich, die *clamp*-Domäne ohne DNA zu kristallisieren¹⁹; ²⁵. In Anwesenheit von DNA konnte die Struktur gelöst werden, was zeigt, dass die Bindung der DNA eine Konformationsumwandlung und damit eine Stabilisierung des Proteins hervorruft²⁵. Von der *core*-Domäne ausgehend ragen zwei Helices (*levers*-Domäne) in die *clamp*-Domäne und umschließen die DNA ohne Ausbildung von direkten Kontakten.

In Lösung liegt MutS in einem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht vor, wobei sehr unterschiedliche K_D -Werte (1 - 100 nM) durch verschiedene Methoden bestimmt wurden³¹; ³⁵. Die C-terminale Domäne (VII) ist für die Dimerisierung und Tetramerisierung des Proteins verantwortlich, dabei spielen die Aminosäurereste Asp-833, Asp-835 und Asp-840 eine entscheidende Rolle²⁶. Die Tetramerbildung, welche auch bei MutS von *Thermus spec.* durch Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) gezeigt werden konnte³⁶, spielt eine

Rolle bei der Anti-Rekombination^{37; 38}. Zurzeit gibt es keinerlei Hinweise, dass das humane MutS Tetramere bilden kann^{26; 39}. Ersetzt man im *E. coli* MutS das Asp-835 durch Arginin, zeigt die Variante *in vivo* keinen Mutatorphänotyp und ist in der Lage, DNA zu binden und MutH zu aktivieren³⁹.

1.2.2 Durch ATP-Bindung und -Hydrolyse vermittelte Konformationsumwandlung

Die ATPase Domäne von MutS gehört zu der Familie der ABC-Transporter (ATP-Bindungskassette)⁴⁰. ABC-ATPasen besitzen ein zusammengesetztes aktives Zentrum (*composite active site*), d. h., dass jedes aktive Zentrum des MutS sich aus beiden Untereinheiten bildet. Die ATPase-Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei der *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung. Nach ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von MutL durch MutS. In der Literatur wird angenommen, dass der Austausch von ADP mit ATP nach der *mismatch*-Erkennung stattfindet, und dass dadurch die Konformationsumwandlung zur *sliding-clamp* eingeleitet und nach der MutL Rekrutierung MutH aktiviert wird.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass beide Untereinheiten unterschiedliche Affinitäten zu ATP und ADP haben (funktionelle Asymmetrie). Diese Asymmetrie kommt besonders im eukaryotischen System zum Ausdruck, da die MutS-Homologen als Heterodimere und nicht, wie das bakterielle MutS, als Homodimere (Untereinheit A und B) vorliegen. Daher soll die ATPase Aktivität an Hand des eukaryotischen Hefe (*S. cerevisiae*) MutS Homologen MSH2/MSH6 erklärt werden. MSH6 entspricht der Untereinheit A im *E. coli* MutS und ist die Untereinheit, welche die Fehlpaarung direkt bindet. MSH6 besitzt eine hohe Affinität zu ATP ($K_D = 0.3 \mu\text{M}$) und eine schwache Affinität zu ADP. Im Gegensatz dazu weist MSH2 eine schwache ATP-Bindung ($K_D = 37 \mu\text{M}$), aber eine hohe Bindeaffinität zu ADP ($K_D = 1.3 \mu\text{M}$) auf.

Das nukleotidfreie MSH2/MSH6 bzw. das mit einem ADP gebundene MSH2(ADP)/MSH6 bindet mit hoher Affinität an fehlgepaarte DNA (10 bis 1500fach höher als an korrekt gepaarte DNA)⁹; diese Bindung an eine Fehlpaarung durch MSH6 verhindert die ATP-Hydrolyse in dieser Untereinheit (Abbildung 1-VI A). Durch das Stabilisieren der ATP-Bindung wird die ADP-Affinität in der anderen Untereinheit (MSH2) verringert, wodurch das ADP dissoziiert⁴¹. Dies bedeutet, dass die beiden ATPase Domänen auf einem bestimmten Weg miteinander kommunizieren müssen, da die Nukleotidbindung in der einen Untereinheit die andere Nukleotidbindung beeinflusst.

Darüber hinaus muss es eine Kommunikation zwischen den N-terminalen DNA-bindenden Domänen (*clamp-Domäne* und/oder MBD) und der ATPase Domäne am C-terminalen Ende geben, die sehr wahrscheinlich durch Konformationsumwandlung innerhalb des Proteins realisiert wird.

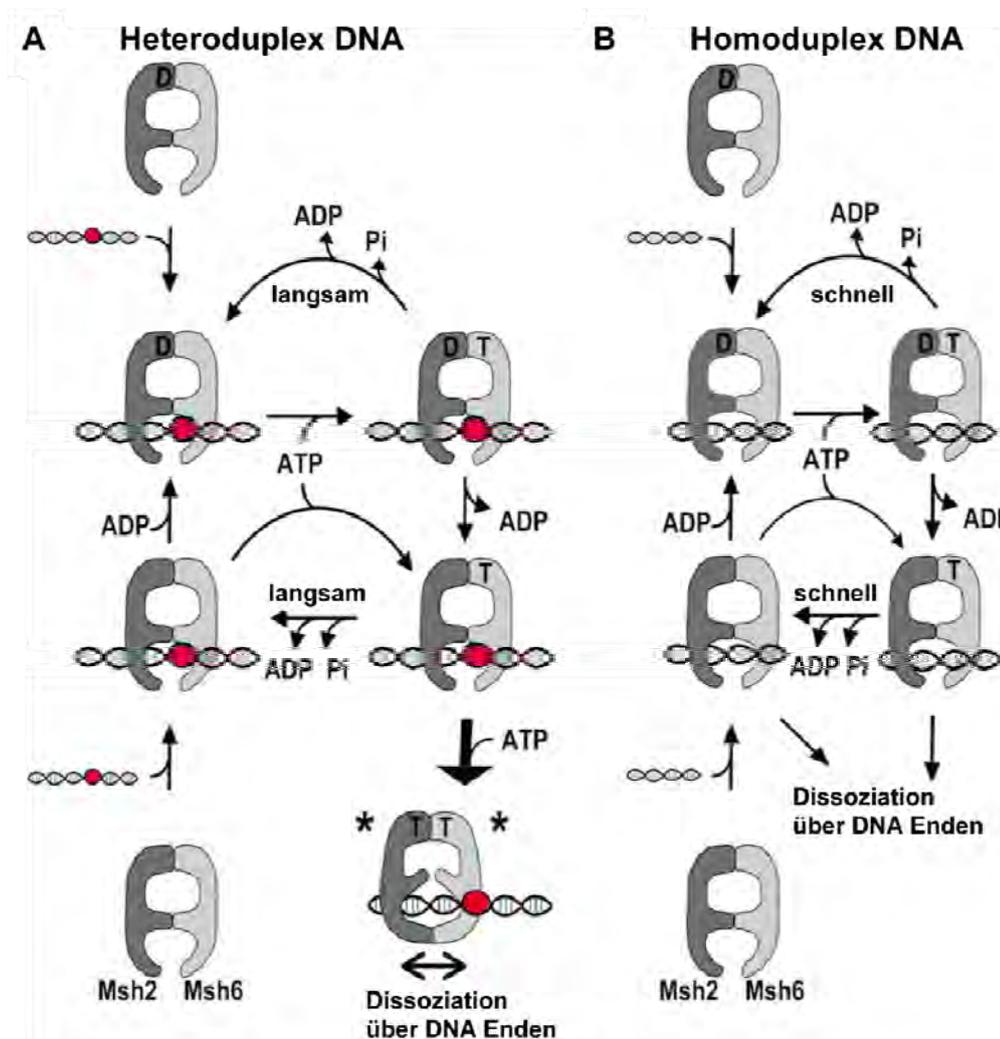


Abbildung 1-VI: Modell für die ATPase Aktivität von eukaryotischem MutS

Darstellung der Nukleotidbindung und des Nukleotidaustauschs A) nach *mismatch* (Rot) Erkennung und B) an homoduplex DNA. Die MSH2 und MSH6 Untereinheiten sind in Dunkelgrau und Hellgrau dargestellt. Der *sliding-clamp* Zustand, bei dem in beiden Nukleotidbindetaschen ATP gebunden ist, wurde durch * gekennzeichnet und das Ausklappen der *mismatch*-Bindungsdomänen dargestellt. Die Abbildung wurde aus Mazur, 2006 entnommen und modifiziert⁴¹. Abkürzungen: D: gebundenes ADP; T: gebundenes ATP

Nach der ADP-Dissoziation bindet die MSH2 Untereinheit ebenfalls ATP und ermöglicht so das Ausklappen der *mismatch*-Bindungsdomäne und die Bildung der *sliding-clamp* (mit * markierter Zustand in der Abbildung 1-VI A). Dies ist nur dann möglich, wenn beide ATPase Domänen ATP oder ATP γ S (ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon) gebunden haben. Durch die Konformationsumwandlung kann MSH2/MSH6 über die DNA-Enden dissoziieren

und benötigt dafür keine ATP-Hydrolyse, denn auch mit ATP γ S konnte die Bildung der *sliding-clamp* beobachtet werden⁴¹.

Bei Abwesenheit einer Fehlpaarung findet nach der DNA-Bindung durch das nukleotidfreie MSH2/MSH6 bzw. das mit einem ADP gebundene MSH2(ADP)/MSH6 ebenfalls eine ATP-Bindung in MSH6 statt (Abbildung 1-VI B). Diese Bindung kann aber in homoduplex DNA nicht durch eine Fehlpaarung stabilisiert werden, und es kommt zur schnellen ATP-Hydrolyse. In Folge dessen kann es nicht oder nur weniger oft zur Ausbildung eines Zustandes kommen, in dem beide ATPase Domänen ATP gebunden haben. Daher ist es kaum möglich, eine Dissoziation durch die *sliding-clamp* an homoduplex DNA zu beobachten⁴¹.

Die ATPase Domäne und die DNA-Bindungsdomänen sind, wie bereits erwähnt, über einen relativ großen Abstand getrennt, scheinen aber trotzdem in Kommunikation miteinander zu stehen¹⁹. In der Literatur lassen sich dazu viele Daten finden^{42; 43; 44}, welche von Lamers und Mitarbeitern verwendet wurden, um die Ausbildung der *sliding-clamp* zu modellieren (Abbildung 1-VII).

Hat MutS in Abwesenheit von DNA ADP gebunden, nimmt man an, dass die DNA-Bindungsdomänen beweglich und die *clamp*-Domäne offen vorliegen²⁵. Nach DNA-Bindung schließen sich die *clamp*-Domänen, und es läuft ein *scanning*-Prozess ab, bis es zur *mismatch*-Erkennung durch Stapelung des Phe-36 mit der fehlgepaarten Base kommt. Dadurch wird die DNA um $\sim 60^\circ$ gebogen, und es kommt zum ADP-ATP Austausch in der hochaffinen ATPase Domäne der Untereinheit A. Dies führt zur engeren Umschließung der DNA durch die beiden *clamp*-Domänen und zum ADP Austausch in der Untereinheit B und in Folge dessen zum Ausklappen einer *mismatch*-Bindungsdomäne^{31; 34}. Das Modell von Lamers zeigt genauso wie die Abbildung von Mazur das Ausklappen beider *mismatch*-Bindungsdomänen. Allerdings lassen neuere Daten, welche auf *normal-mode analysis* (NMA) Untersuchungen beruhen, darauf schließen, dass nur eine *mismatch*-Bindungsdomäne ausgeklappt, nämlich jene, deren Phe-36 zuvor zwischen die Basen interkaliert⁴⁵.

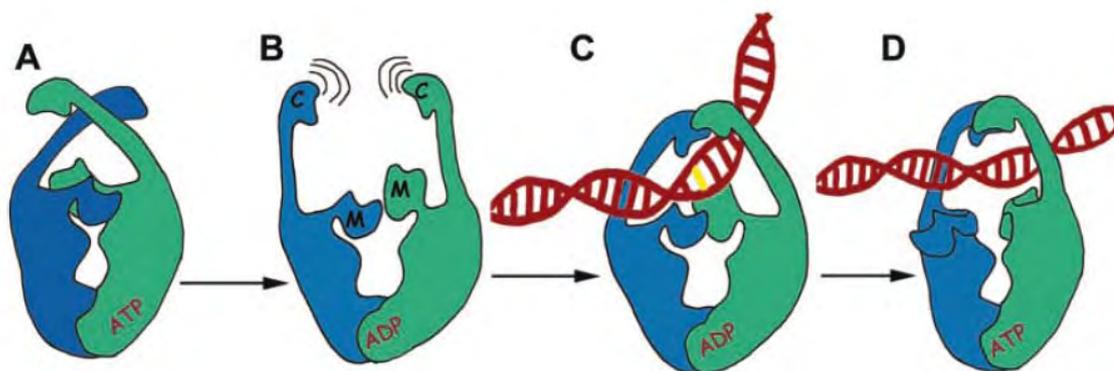


Abbildung 1-VII: Modell für die Konformationsumwandlung von MutS

A) Darstellung einer möglichen Konformation von MutS bei ATP-Bindung in Abwesenheit von DNA, die durch den Vergleich mit der ATPase Domäne von RAD50-ATP entstanden ist. B) Unter ADP liegen die *clamp*-Domäne (gekennzeichnet mit C) und die *mismatch*-Bindungsdomäne (M) frei beweglich vor und können an die DNA binden. C) Nach Bindung der Fehlpaarung (Gelb) und Biegung der DNA um $\sim 60^\circ$ wird die DNA von den beiden *clamp*-Domänen umschlossen. Diese Struktur konnte durch Kristallisation bestätigt werden. D) Die anschließende ATP-Bindung ermöglicht eine engere DNA-Bindung durch die *clamp*-Domänen. Außerdem kommt es zum Ausklappen der *mismatch*-Bindungsdomänen und der Freigabe der DNA, wodurch MutS in eine *sliding-clamp* umgewandelt wird. Abbildung aus Lamers, 2004 entnommen³¹.

Diese Konformationsumwandlung ermöglicht die Dissoziation von MutS entlang der DNA. Bisher konnte nicht geklärt werden, welche ATPase Domäne das ATP zuerst hydrolysiert, und wann MutL von MutS rekrutiert und aktiviert wird.

Die Bildung und die Struktur der *sliding-clamp* werden seit vielen Jahren diskutiert und untersucht, doch bisher ist es nicht gelungen, diese aufzuklären.

1.2.3 MutL, Vermittler zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung

Das homodimere MutL, welches auch als „molekularer matchmaker“ bezeichnet wird⁴⁶, koppelt die Fehlererkennung durch MutS mit der durch die Endonuklease MutH vermittelte Strangdiskriminierung. MutL kann sowohl mit MutS als auch mit MutH interagieren^{47; 48; 49}. Allerdings ist unklar, ob diese Interaktion gleichzeitig stattfindet, d. h. ob ein Komplex aus MutS-MutL-MutH während der MMR vorliegt. MutL besteht aus 615 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 70 kDa. MutL besteht, wie auch MutS, aus einem N-terminalen (NTD) und einem C-terminalen (CTD) Fragment, die durch einen etwa 100 Aminosäurereste umfassenden, flexiblen Linker verbunden sind (Abbildung 1-VIII). Die Dimerbildung erfolgt über die CTD, wohingegen die Aktivität durch die ATP-abhängige Dimerisierung der NTD vermittelt wird. Strukturell gehört die ATPase Domäne zur GHKL-Familie, wozu auch Typ-II-Topoisomerasen (Gyrasen), Hsp 90 Chaperone, Histidin Kinasen und eben MutL zählen. Die Nukleotidbindungstasche dieser Proteinfamilie, weicht von dem bekannten Walker A Motiv ab^{1; 13; 50}. Die ATP-Bindung und -Hydrolyse durch die doch eher schwache ATPase scheint für die Interaktion mit den unterschiedlichen Partnern benötigt zu werden⁵⁰.

Die Kristallstruktur der beiden Domänen ist bekannt, das Gesamtprotein hingegen konnte bisher nicht kristallisiert werden (Abbildung 1-VIII)^{51; 52; 53}. Das 20 kDa große C-terminale Fragment (LC20) formt stabile 40 kDa große Dimere. Es konnte gezeigt werden, dass LC20 mit MutH interagieren kann und zur DNA-Bindungsaffinität im Gesamtprotein beiträgt^{48; 54}. Allerdings ist LC20 weder in der Lage, MutH zu aktivieren noch an DNA zu binden⁵². Vom N-terminalen, 40 kDa großen Fragment (LN40) sind auch die Strukturen mit ADP, AMPPNP und ohne Nukleotid wie auch für das humane PMS2 (NhPMS2) bekannt^{47; 50; 51}.

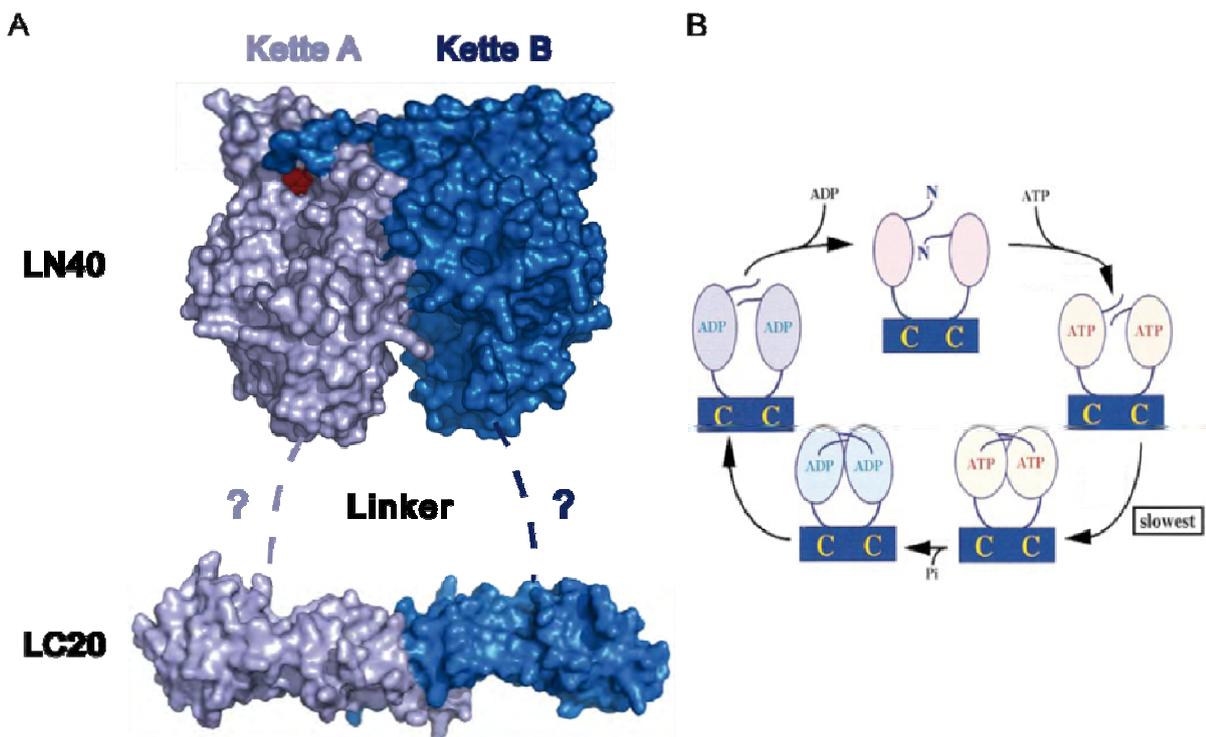


Abbildung 1-VIII: Modell des *E. coli* MutL Gesamtproteins, basierend auf den Strukturen der N-terminalen (LN40) und C-terminalen (LC20) Fragmente

A) Die Darstellung zeigt die Frontansicht von LN40 (pdb 1b63) mit gebundenem AMPPNP in Rot, dieses Fragment ist über den 100 Aminosäuren langen Linker (gestrichelte Linie) mit LC20 (pdb 1x9z) verbunden. Die Orientierung der beiden Fragmente zueinander sowie der Verlauf der beiden Linker konnten bisher nicht kristallisiert werden. Die Ketten A und B des Proteins sind in Grau und Blau dargestellt. Erstellt in PyMol (DeLano 2006). B) Schematische Darstellung des ATPase Zyklus von MutL⁴⁷.

LN40-ADP liegt in Lösung als Monomer vor. Durch Inkubation von LN40 mit AMPPNP kommt es jedoch zur Dimerisierung⁵². Es scheint also, dass das γ -Phosphat die Dimerbildung beeinflusst. Durch die AMPPNP-Bindung kommt es zur Umorientierung innerhalb von LN40: Drei neue Oberflächenstrukturen entstehen. Die erste Struktur besteht aus zwei Schleifen am N-Terminus des Proteins, welche an der Interaktion mit MutS beteiligt sind (Guido Plotz, unveröffentlichte Daten). Die zweite Struktur ist eine Furche, welche etwas unterhalb des N-Terminus verläuft und die Interaktionsstelle für MutH darstellt⁵⁵. Die dritte

Struktur ist eine sattelförmige Spalte, die mit basischen Resten besetzt ist und wahrscheinlich eine DNA-Bindungsstelle darstellt¹¹. Mutationen innerhalb dieser Spalte, z. B. am konservierten Arg-266, führen zu einer reduzierten DNA-Bindung und verhindern die DNA-abhängige Stimulation der ATPase Aktivität^{47; 56}. Trotzdem ist die Rolle der DNA-Bindung von MutL während der Reparatur noch unklar. Einige Studien legen aber nahe, dass MutL im Zuge der MMR-Prozesse an die DNA binden muss, wobei einzelsträngige DNA besser gebunden wird als doppelsträngige DNA⁵⁶. Dies könnte für die Bindung der DNA-Helikase II an das durch MutH gespaltene *mismatch*-Substrat notwendig sein. In diesem Zusammenhang konnte interessanterweise gezeigt werden, dass das eukaryotische MutL α (MLH1/PMS2) eine Endonukleaseaktivität aufweist, wobei das Motiv DQHA(X)₂E(X)₄E wahrscheinlich von der PMS2 Untereinheit erkannt wird⁵⁷. Dieses Motiv findet sich in eukaryotischen PMS2 Homologen und in einer Vielzahl bakterieller MutL Proteine wieder, aber nur, wenn in dem MMR-System die Strangdiskriminierung nicht über die Methylierung der GATC Sequenz erfolgt.

Es wurde von A. Guarne und Mitarbeitern ein Modell für die Gesamtstruktur von MutL erstellt. In diesem Modell bilden die beiden Domänen einen zentralen Kanal, durch welchen die DNA laufen soll⁵². Da das Gesamtprotein allerdings bis jetzt nicht kristallisiert werden konnte, kann über die Orientierung der beiden Domänen zueinander und das Vorhandensein eines DNA-Kanals nur spekuliert werden.

MutL interagiert im Rahmen der DNA-Reparatur außer mit MutS noch mit weiteren Proteinen, wie MutH, UvrD, PCNA, DNA-Helikase II oder VSR, und verbindet so unterschiedliche Prozesse miteinander^{48; 58; 59; 60}. Bis jetzt ist es allerdings nicht gelungen, einen dieser Komplexe zwischen MutL und einem Partnerprotein zu kristallisieren.

1.2.4 MutH, die Endonuklease

Die Endonuklease MutH ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa. MutH fügt Einzelstrangbrüche (*nick*) am unmethylierten DNA-Strang entweder vor einem hemimethylierten oder einem unmethylierten Adenin (methyliertes N⁶ Atom) der GATC-Erkennungssequenz ein⁶¹. Methylierte DNA wird um das 200 - 400fache schwächer gespalten als unmethylierte DNA⁶². Durch den eingefügten Strangbruch wird der zu reparierende, fehlerhafte DNA-Strang in der Zelle für die anschließende Exzision gekennzeichnet. Ist die DNA unmethyliert, spaltet MutH beide Stränge jeweils unabhängig voneinander, was zu Doppelstrangbrüchen führt. Durch die Anwesenheit von MutS, MutL und ATP wird die geringe Endonukleaseaktivität von MutH um das 50fache erhöht^{63; 64}. Bei

geringer Salzkonzentration ist MutL aber in der Lage, die Endonukleaseaktivität von MutH auch *mismatch*- und MutS-unabhängig zu steigern.

E. coli MutH konnte in Abwesenheit von DNA kristallisiert werden. Ko-Kristallstrukturen sind von *Haemophilus influenzae* MutH mit un- und hemimethylierter DNA verfügbar^{50; 65}. Strukturell ähnelt MutH einer Klammer mit zwei Armen, welche durch eine große Spalte voneinander getrennt sind (Abbildung 1-IX).

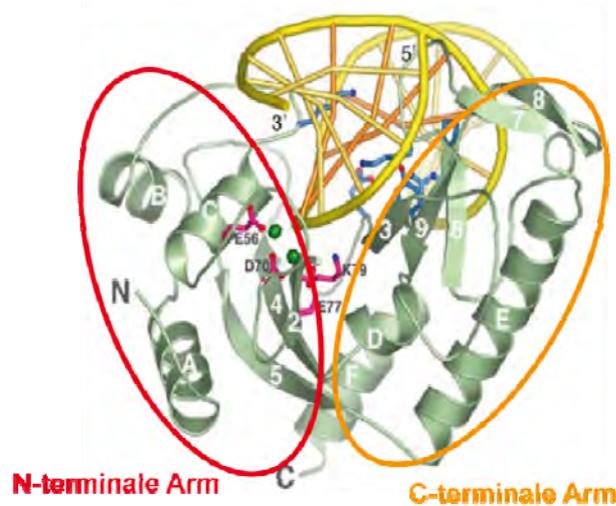


Abbildung 1-IX: Ko-Kristallstruktur von *Haemophilus influenzae* MutH

MutH ist im Komplex mit unmethylierter DNA dargestellt. Die Endonuklease MutH ist in Grün, die Reste im aktiven Zentrum in Pink und die Reste für die sequenzspezifische DNA-Erkennung in Hellblau dargestellt. In Rot und in Orange ist der N-terminale und der C-terminale Arm umrahmt. Die DNA ist in Gelb mit der GATC-Sequenz in Orange abgebildet. Abbildung modifiziert aus Lee⁶⁵ (pdb 2aoq)

Der N-terminale Arm trägt das katalytische Zentrum und ist über drei Polypeptid-Linker mit dem C-terminalen Arm verbunden, der für die Basenerkennung und die DNA-Bindung verantwortlich ist^{50; 65}. Das katalytische D(X)_nEXK Motiv (Asp-X(n)-Glu-X-Lys), welches auch die Typ-II-Restriktionsenzyme aufweisen, ist für die Koordination der Metallionen und die Katalyse wichtig. Obwohl die Struktur homolog zu den Typ-II-Restriktionsenzymen, wie PvuII und EcoRV, ist, teilen sich diese Proteine keine signifikante Sequenzähnlichkeit⁵⁰. MutH bindet spezifisch an die GATC-Sequenz, aber interagiert zusätzlich noch unspezifisch mit zwei bis drei Basenpaaren links und rechts davon. Wird MutH an DNA gebunden, drehen sich die beiden Arme zueinander und engen dadurch die DNA-Bindungsstelle ein. Mutationsanalysen lassen vermuten, dass das hochkonservierte Tyr-212 in der Bindungstasche den Methylierungsgrad der DNA erkennt⁶² und zusätzlich mit zwei weiteren Resten, Arg-184 und Pro-185, einen sequenzspezifischen Kontakt zur DNA herstellt⁶⁵. Das

aktive Zentrum von MutH bestehend aus Glu-56, Asp-70, Glu-77 und Lys-79 koordiniert zwei Metallionen. Diese Koordination des Magnesiums ermöglicht die substratspezifische Spaltung durch MutH⁶⁵.

1.3 Ziel der Arbeit

Der ternäre Komplex MutS-MutL-DNA ist ein Schlüsselintermediat im *mismatch*-Reparatursystem. Dennoch ist bisher nur sehr wenig über die Struktur des Komplexes bekannt, obwohl die Kristallstrukturen von MutS und MutL schon vor über zehn Jahren gelöst wurden. Viele Gruppen arbeiten mit unterschiedlichen biochemischen, biophysikalischen und bioinformatischen Methoden daran, die Struktur des Komplexes zu bestimmen^{9; 13}.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Interaktion zwischen MutS und MutL im MMR-System zu untersuchen, den ternären Komplex funktionell und strukturell zu charakterisieren und ein Modell des Komplexes zu erstellen. Weitere Ziele waren, Bedingungen zu finden, unter denen der transiente Komplex stabilisiert werden kann, um so hochauflösende Strukturanalysen, wie Kristallisation und Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS), zu ermöglichen. Ferner sollte ein Assay entwickelt werden, um die dynamische Komplexbildung zu verfolgen. Um diese Ziele zu erreichen, wurden die Strategien des chemischen Crosslinkens und der Fluorophormodifikation gewählt.

Als Ausgangsposition wurden vorhandene Einzelcysteinvarianten (SC) von MutS und MutL verwendet, bzw. neue Einzelcysteinvarianten von MutS hergestellt, so dass für jede Domäne von MutS eine Einzelcysteinvariante zur Verfügung stand. Diese SC-Proteine ermöglichten selektive Modifikation, interpretierbare Crosslinkergebnisse und präparatives Crosslinking zur Herstellung definierter Produkte. Durch Kombination verschiedener SC-MutS und MutL Varianten (kombinatorische Crosslink-Experimente) sollten Positionen in MutS und MutL identifiziert werden, die in räumlicher Nähe zueinander liegen. Ferner sollten die Crosslinkbedingungen optimiert werden, um eine hohe Spezifität der Crosslinkreaktion zu gewährleisten. Zusätzlich mussten die Bedingungen für das chemische Modifizieren von SC-MutL mit Fluorophoren optimiert werden.

1.4 Crosslinken und Modifikation von MMR-Proteinen

Obwohl das MMR-System sehr gut untersucht ist, sind wichtige Fragen sowohl zu Strukturen von MutS als auch zu den Komplexen offen. Einer der Gründe für die Schwierigkeiten, mittels Röntgenstrukturanalysen die Struktur der Komplexe zu lösen, liegt in der Dynamik der

Komplexe und der hieraus resultierenden Heterogenität der Proben, die die Kristallisation erschwert. Das chemische Crosslinken gekoppelt mit hochauflösenden Strukturanalysen, wie Kristallisation, könnte sich hierbei als die Methode der Wahl herausstellen, um transiente Strukturen „einzufrieren“. Durch Crosslinken können weniger ausgeprägte Populationen erfasst und für weitere Untersuchungen stabilisiert werden. Mit dieser Methode war es Banerjee und Verdine bereits 2006 möglich, die Struktur der DNA-Glykosylase MutM während des *scanning*-Prozesses „einzufrieren“ und zu lösen^{66; 67}. Auch im Laufe der vorliegenden Arbeit konnten mittels dieses Verfahrens weitere transiente Strukturen von biologisch relevanten Komplexen gelöst werden^{68; 69}.

Das Crosslinken muss dazu nicht innerhalb einer Interaktionsstelle stattfinden. Im Gegenteil, die Reste, die an der Interaktion beteiligt sind, sind für die meisten Crosslinker unzugänglich. Eine Ausnahme sind hier die *zero-length* Crosslinker, wie z. B. EDC, oder auch das Photocrosslinken mit UV-Licht. Demgegenüber können Reste, die sich in der Nähe der Interaktionsstelle befinden und innerhalb eines für die Crosslinkerlänge möglichen Bereiches liegen, gecrosslinkt werden. Die Nähe wird hierbei durch die „Reichweite“ des verwendeten Crosslinkers definiert. Diese liegt typischerweise zwischen 0 - 20 Å. Durch den Einsatz unterschiedlich langer Crosslinker kann eine Aussage über die Distanz von zwei Positionen innerhalb eines Komplexes getroffen werden.

Man unterscheidet dabei zwischen a) unspezifischem Crosslinken, z. B. dem Photocrosslinken und b) gruppenspezifischem Crosslinken, z. B. mit thiol-spezifischen Crosslinker (Abbildung 1-X), welche mit Cysteinresten reagieren und in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurden, oder NHS-Crosslinker, welche Lysinreste modifizieren. Durch das Crosslinken von Lysinresten oder Argininresten miteinander ist es also nicht unbedingt nötig, Cysteine über Mutagenese einzubauen oder zu entfernen, damit die vorhandene Proteinstruktur zu destabilisieren und die Funktion eventuell einzuschränken oder zu zerstören. Je mehr Reste mit der zu modifizierenden Gruppe, z. B. Lysinreste, in einem Protein vorhanden sind, desto wichtiger ist eine Analyse des Crosslinkergebnisses z. B. durch Massenspektrometrie, um die Position des Crosslinks zu bestimmen. Besitzt das Protein aber nur eine reaktive Gruppe, z. B. eine Thiol-Gruppe in einem Cysteinrest einer Einzelcysteinvariante, so ist dies nicht notwendig. Die Daten aus den Crosslinkexperimenten können dann in bioinformatischen Analysen für Strukturanalysen und zur Modellierung verwendet werden.

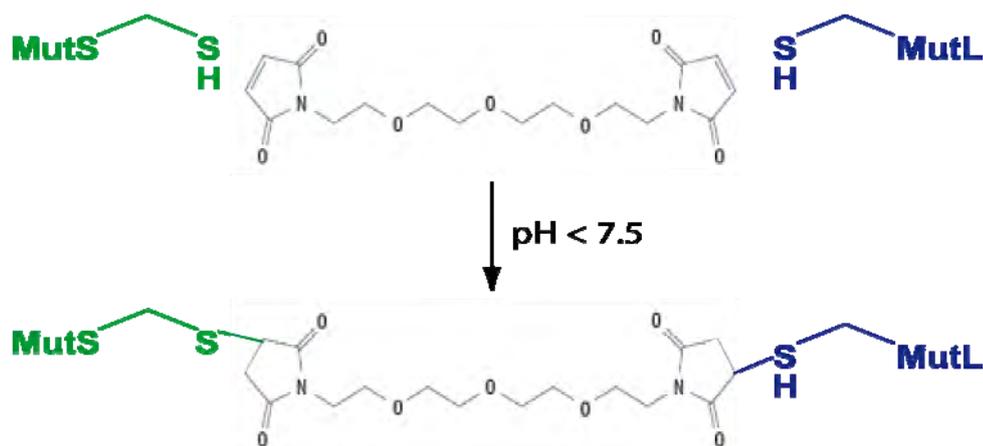


Abbildung 1-X: Vereinfachte Darstellung der Crosslinkreaktion zwischen MutS und MutL

Dargestellt ist das thiol-spezifische Crosslinken von MutS in Grün und MutL in Blau mit dem Maleimid-Crosslinker BM[PEO]₃. Weitere Erklärungen siehe Text und Abschnitt 2.3.13.

Auch in *in vivo* Untersuchungen kann das Crosslinken verwendet werden, z. B. um Interaktionspartner zu bestimmen. Dies kann durch Photocrosslinken zu Leucinen oder Methionin erfolgen⁷⁰. Eine weitere Anwendung des Photocrosslinkens ist der genetische Einbau von Benzophenon⁷¹.

Als Ausgangspunkt für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden die in der Arbeitsgruppe hergestellten cysteinfreien (CF) Varianten von MutS und MutL verwendet^{39; 55}. Die sechs endogenen Cysteine in MutS sind durch Alanin, Serin oder Valin³² und die sieben Cysteine in MutL durch Leucin, Phenylalanin oder Serin⁴⁷ ersetzt (Abschnitt 2.3.8). Ausgehend von diesen cysteinfreien Varianten konnten im nächsten Schritt Aminosäurereste an strategischen Positionen gegen Cysteinreste ausgetauscht werden, um so SC-Varianten von MutS und MutL herzustellen.

Diese SC-Varianten sollten zum Crosslinken mit thiol-spezifischen Crosslinkern oder aber mit anderen thiol-spezifischen Reagenzien, wie Maleimid-Fluorophore, modifiziert werden. Diese modifizierten Varianten sollten in biophysikalischen Untersuchungen, wie analytische Ultrazentrifugation (AUZ; Abschnitt 2.3.14) oder FRET-Experimenten (Förster-Resonanzenergietransfer; Abschnitt 2.3.11) oder biochemischen Inhibitionsassays (Abschnitt 2.3.17) eingesetzt werden (Abbildung 1-XI).

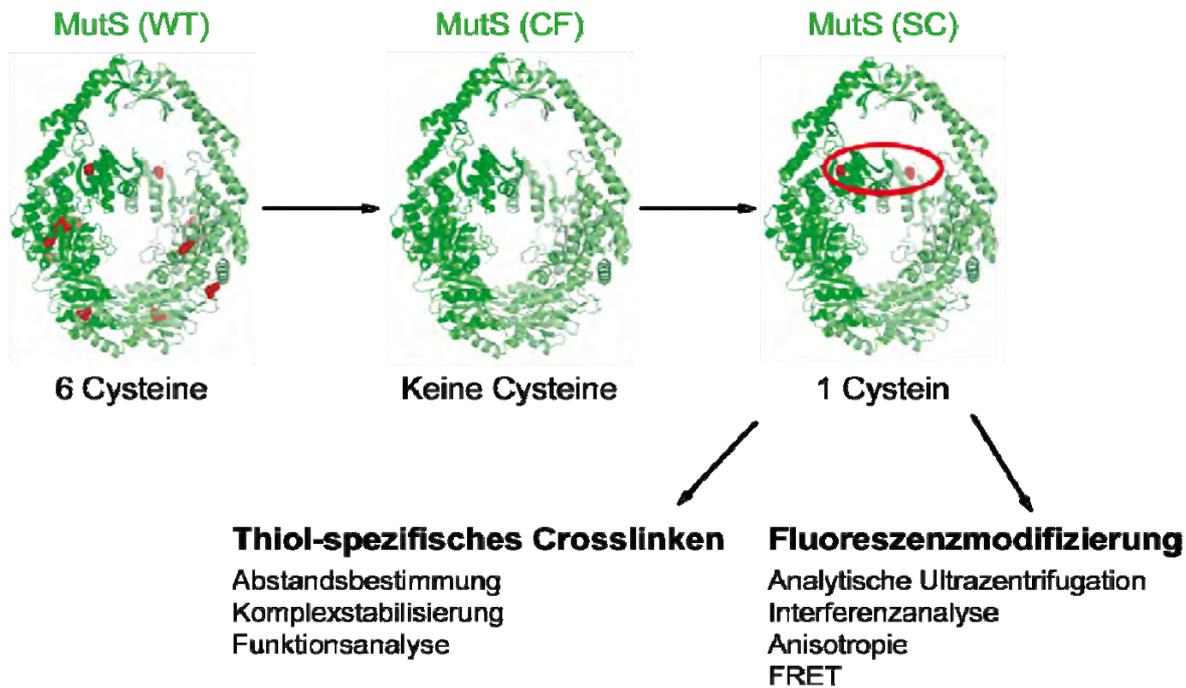


Abbildung 1-XI: Strategie zur Untersuchung des MutS-MutL-Komplexes

Herstellung der MutS^{CF} Variante durch Entfernen der sechs endogenen Cysteine und gezieltes Einbringen von strategischen Cysteinen in MutS, wie z. B. das Cystein an Position 93 in der *mismatch*-Bindungsdomäne. Das gleiche Verfahren wurde für MutL angewendet (nicht dargestellt). Beide Ketten von MutS (pdb 1e3m) sind in Grün dargestellt und die Position der Cysteinreste in Rot hervorgehoben. Die SC-MutS Varianten wurden dann mit einem thiol-spezifischen Crosslinker und/oder mit Fluorophoren modifiziert und durch die im Text beschriebenen Verfahren charakterisiert. WT: Wildtyp; CF: cysteinfrei; SC: Einzelcystein.

Die mit Fluorophoren modifizierten SC-Varianten konnten vielfältig untersucht werden (Abbildung 1-XI):

- die Änderung der Fluoreszenzintensität bzw. Fluoreszenzanisotropie in Abhängigkeit von Interaktionspartnern (DNA, Proteinen),
- mittels FRET lassen sich Abstände und Interaktionsanalysen durchführen,
- durch Kopplung an andere analytische Verfahren, z. B. analytische Ultrazentrifugation (AUZ) mit Fluorophoren, lassen sich Quartärstrukturen und Komplexbildung analysieren.

Für diese Messungen werden zwei Fluorophore, ein Donor und ein Akzeptor, benötigt. Diese müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um einen strahlungsfreien Energietransfer (FRET) zu ermöglichen. Erstens muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen. Zweitens muss die Orientierung der beiden Fluorophore zueinander möglichst gleich (parallel) sein und drittens muss der Abstand 10 - 100 Å betragen. Sind diese Voraussetzungen gegeben, kann die Emissionsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen werden. Diese Anregung führt dann zur Emission und

damit zu Fluoreszenz. Durch die Übertragung der Energie nimmt die Donorfluoreszenz ab und die Akzeptorfluoreszenz steigt an.

Diese FRET-Messungen konnten auf unterschiedliche Weise durchgeführt und dadurch verschiedene Aspekte untersucht werden (Abbildung 1-XII).

Erstens konnte die DNA mit beiden für den FRET notwendigen Fluorophoren (Donor und Akzeptor) markiert werden, um die DNA-Biegung durch MutS zu testen (A). Zweitens konnte die DNA mit dem Donor und MutS mit dem Akzeptor markiert werden, um die spezifische MutS-Bindung an die Basenfehlpaarung und die Dissoziationsgeschwindigkeit von MutS von der DNA zu testen (B). Und drittens konnte MutS mit dem Akzeptor und MutL mit dem Donor markiert werden, um so die Komplexbildung an der DNA zu untersuchen (C).

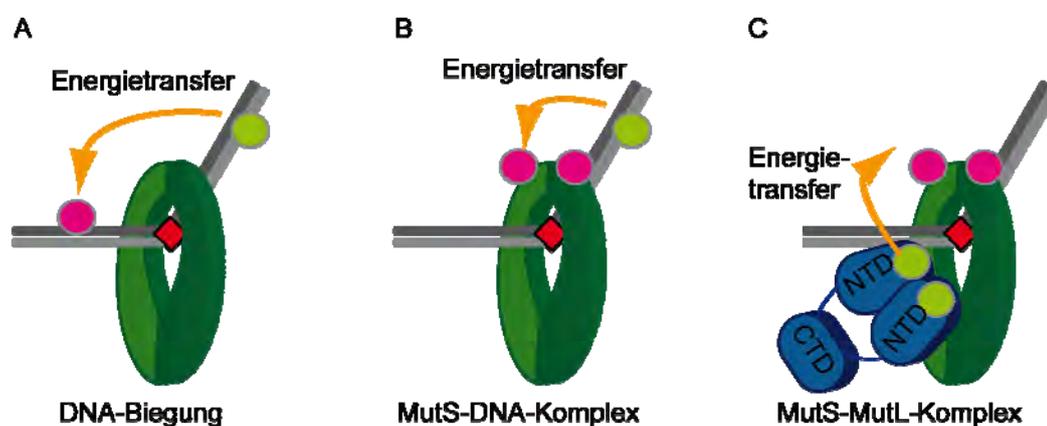


Abbildung 1-XII: Schematische Darstellung der verwendeten FRET-Assays

A) Die DNA-Biegung wurde mittels doppelmarkierter DNA analysiert. B) Die Bindung von MutS an die Fehlpaarung konnte mit Hilfe von einfachmarkierter DNA (Donor) und einfachmarkierter SC-MutS Variante (Akzeptor) beobachtet werden. C) Die Bildung des MutS-MutL-Komplex wurde durch den Energieübertrag zwischen mit Donor markierten SC-MutL und Akzeptor markierten SC-MutS getestet. MutS ist in Grün, MutL in Blau, die DNA in Grau mit in Rot hervorgehobenen Fehlpaarung, der Donorfluorophor ist als grüner und der Akzeptorfluorophor als pinker Kreis dargestellt. Der orangefarbene Pfeil gibt die Richtung der Energieübertragung an. Abbildung wurde von Michele Cristovao übernommen und modifiziert⁷².

2 Material und Methoden

Gängige Standardverfahren wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach den Ausführungen der Laborhandbücher *Current Protocols in Molecular Biology*⁷³ durchgeführt.

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besitzen einen großen Reinheitsgrad und sind in Tabelle 2-I aufgelistet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit filtriertem Wasser hergestellt, die verwendeten Filtersysteme waren Seralpur Pro 90 CN Wasseraufbereitungssystem (Seral, Ransbach-Baumbach) und Milli-Q Synthesis G-Gard 2 (Millipore).

Tabelle 2-I: Chemikalien

<i>Chemikalien</i>	<i>Firma</i>
Acrylamid/Bis-Acrylamid 40 % (29:1)	AppliChem
ADP (Adenosindiphosphat)	Sigma
Agar	AppliChem
Agarose (Ultra PURE™)	Invitrogen
Alexa-Maleimid	Invitrogen
Aluminiumsulfat	AppliChem
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Ampicillin	AppliChem
AMPPNP (ADPNP)	Sigma
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma
Benzamidin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovine Serumalbumin)	Pierce
Coomassie Brilliant Blue	AppliChem
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
dNTPs (Desoxyribonukleotide)	Peqlab
DTT (1,4-Dithiothreitol)	AppliChem
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roche
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem
HEPES	AppliChem
Imidazol	AppliChem
IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid)	AppliChem
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck

Kanamycin	AppliChem
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
NEM (N-Ethylmaleimid)	Sigma
Ni ²⁺ -NTA Agarose	QIAGEN
Oligodesoxyribonukleotide	Biomers
PEG 6000 (Polyethylenglykol)	Fermentas
Phosphorsäure (85 %)	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	AppliChem
Rifampicin	Sigma
Saccharose	Merck
Salzsäure (konz.)	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Merck
Tetracyclin	AppliChem
Tris	Merck
Triton X-100	AppliChem
Trypton	AppliChem
Tween 20	Merck

2.1.2 Crosslinker

Tabelle 2-II: Crosslinker

<i>Crosslinker</i>	<i>Firma</i>
Benzophenonmaleimid (BPM)	Sigma-Aldrich
BMOE	Pierce
BM[PEO] ₃	Pierce
MTS-2-MTS	Toronto Research Chemicals
MTS-6-MTS	Toronto Research Chemicals
MTS-11-MTS	Toronto Research Chemicals
MTS-17-MTS	Toronto Research Chemicals

2.1.3 Fluorophore

Zum Modifizieren verschiedener Einzelcysteinvarianten (SC) von MutS und MutL wurden Alexa Fluorophore mit Maleimid-Gruppe verwendet: Alexa 488-C₅-Maleimid als Donor und Alexa 594-C₅-Maleimid als Akzeptor (Abbildung 2-I). Alle Fluorophore wurden bei Invitrogen bestellt.

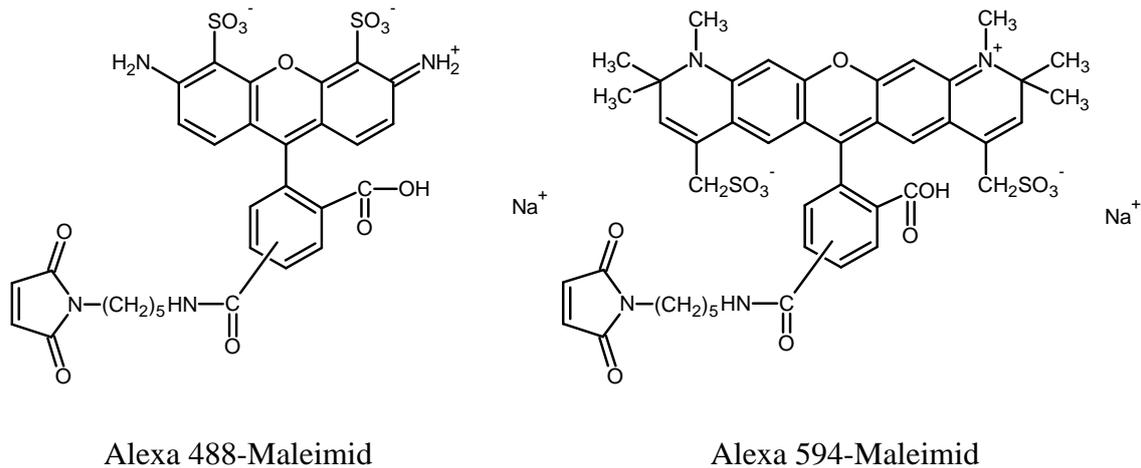


Abbildung 2-I: Struktur von Alexa 488-Maleimid und Alexa 594-Maleimid

2.1.4 Enzyme

Tabelle 2-III: DNA-Modifikationsenzyme

<i>Name</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Firma</i>
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	PCR	im Labor aufgereinigt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	PCR	im Labor aufgereinigt
T4 DNA-Ligase	DNA-Substratherstellung	New England BioLabs (NEB)

Tabelle 2-IV: Restriktionsenzyme

<i>Name</i>	<i>Spaltsequenz</i>	<i>Firma</i>
AluI	5'-AG [^] CT-3'	MBI Fermentas
AvaI	5'-C [^] YCGRG-3'	New England BioLabs (NEB)
BseMII	5'-CTCAG (N) ₁₀ [^] NNNN-3'	MBI Fermentas
BspMI	5'-ACCTGC NNNN [^] NNNN-3'	New England BioLabs (NEB)
Cfr13I	5'-G [^] GNCC-3'	MBI Fermentas
DpnI	5'-GmA [^] TC-3'	MBI Fermentas
PsiI	5'-TTA [^] TAA-3'	New England BioLabs (NEB)
Nb.BtsI	5'-NN [^] CACTGC-3'	New England BioLabs (NEB)

Tabelle 2-V: Exonukleasen

<i>Name</i>	<i>Aktivität</i>	<i>Firma</i>
Exonuklease I	3' → 5' (ssDNA)	New England BioLabs (NEB)
Exonuklease III	3' → 5' (dsDNA)	New England BioLabs (NEB)
λ-Exonuklease	P-5' → 3'	New England BioLabs (NEB)

2.1.5 Proteine

Die Proteine MutH, MutL und MutS wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt.

Tabelle 2-VI: MutH Varianten***MutH Varianten***

Cysteinefrei (CF)

Wildtyp (WT)

CF: Cysteinfrei; WT: Wildtyp

Tabelle 2-VII: MutL Varianten***MutL Varianten***

Cysteinefrei (CF)

Wildtyp (WT)

SC-Q4C

SC-Q118C

SC-N131C

SC-K135C

SC-Q198C

SC-H297C

SC: Einzelcysteinvarianten (*single-cysteine*);

CF: Cysteinfrei; WT: Wildtyp

Tabelle 2-VIII: MutS Varianten***MutS Varianten***

Cysteinefrei (CF)

Wildtyp (WT)

2C-93/239C

2C-93/239C/D835R

3C-93/239/711C

3C-93/239/297C

4C-93/239/569/711C

5C-93/235/239/297/711C

SC-D8C

SC-N78C

SC-A93C

SC-K103C

SC-D162C

SC-A239C

SC-D246C

SC-D246C/D835R

SC-A284C

SC-297C

SC-S427C

SC-R449C

SC-R449C/D835R

SC-Q526C

SC-569C

SC-E686C

SC-711C

SC: Einzelcysteinvariante (*single-cysteine*); CF: Cysteinfrei; WT: Wildtyp;

2C bis 5C: Anzahl der Cysteine

2.1.6 Primer

Alle Primer wurden über die Firma Biomers bezogen und über RP (reverse phase) Kartusche gereinigt.

Tabelle 2-IX: Primer

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
<i>Lineare DNA (484 bp)</i>	
BBseq A302	ATCTTCCCCATCGGTGATGTC
BBseq A302-P	P- ATCTTCCCCATCGGTGATGTC
BBseq B111	TCATCCTCGGCACCGTCAC
BBseq B111-P	P-TCATCCTCGGCACCGTCAC
<i>Zirkuläre DNA (505 bp)</i>	
A_Adapter_HindIII_Nb.BtsI-B111	CTCAAGCTTCACTGCTCATCCTCGGCACCGTCAC
A2_Adapter_HindIII_Nb.BtsI-A302	AAGCTTGAGCACTGCATCTTCCCCATCGGTGATGTC
A2_XhoI_Nb.BtsI-A302	AAGCTCGAGCACTGCATCTTCCCCATCGGTGATGTC
Forward_T_bottom-12GATC_HindIII	CTCAAGCTTCACTGCCATGAGCGGATACATATTT
Reverse_A_top_12GATC_deltaHindIII	AAGCTTGAGCACTGCGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
Reverse_G_top_12GATC_deltaHindIII	AAGCCTGAGCACTGCGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
<i>Mutagenese</i>	
BBseq A	CCCGCGAAATTAATACGACTC
BBseq B	CTTCCTTTCGGGCTTTGTTAG
MutS_A93C_back_AluI	CCGTTGCCATCTGCGAACAAATTGGC
MutS_A239C_back_BspMI	ACTGCAACAGACAACCGGCGGCCGAAA
MutS_CTD	GTTATTAAGCGCGCACGGCAAAGCTG
MutS_D246C_BseMII	GAGTCGTACGCTGAGTGCATTTTCGCATAC
MutS_D835R_Cfr13I	GGTGAGTGATCTCGGGTCCAGATTTTCCA
MutS_Fw_Ines	AGCAACTGCCGGAGCTGCGTG
MutS_F1_Peter	TTGCAGGAGCGTCAGGACAA
MutS_F3_Peter	CAACTATATGCGTCGCCAGA
MutS_Q526C_AvaI	CTTCATAAAGGCATTTCTCGAGTGCCAGTGCT
MutS_R1_Peter	CCTGACTGCGTTAGCAATTTAAC
MutS_R2_Peter	TTATTCGCCAGATTTTCCGC
MutS_R3_Peter	GGTCGAACAGCTCTTCATAAAG
MutS_R4_Peter	AATACGTTCCAGGTCGCCGA
MutS_R5_Peter	AGTTCTGCCGCCATCGTTTC
MutS_S427C_PsiI	CAGCTCTTCGTTATAACCGCATGCGATAACA

P – markiert 5'-phosphorylierten Primer

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über die Firma Biomers bezogen und über RP (reverse phase) Kartusche gereinigt.

Tabelle 2-X: Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
<i>42 bp Oligonukleotid</i>	
G-XhoI	TATTAATTTTCGCGGGCTCGAG <u>G</u> AGCTTCATCCTCTACGCCGGA
Homo-C-XhoI	TCCGGCGTAGAGGATGAAGCTCTCGAGCCC GCGAAATTAATA
T-HindIII	TCCGGCGTAGAGGATGAAGCT <u>T</u> TCGAGCCC GCGAAATTAATA
<i>30 bp Oligonukleotid</i>	
G-XhoI	TTTCGCGGGCTCGAG <u>G</u> AGCTTCATCCTCTAC
Homo-C-XhoI	GTAGAGGATGAAGCTCTCGAGCCC GCGAAA
T-HindIII	GTAGAGGATGAAGCT <u>T</u> TCGAGCCC GCGAAA
<i>20 bp Oligonukleotid</i>	
G-XhoI	CGGGCTCGAG <u>G</u> AGCTTCATCC
Homo-C-XhoI	GGATGAAGCTCTCGAGCCCG
T-HindIII	GGATGAAGCT <u>T</u> TCGAGCCCG
<i>15 bp Oligonukleotid</i>	
G-XhoI	GGCTCGAG <u>G</u> AGCTTCA
Homo-C-XhoI	TGAAGCTCTCGAGCC
T-HindIII	TGAAGCT <u>T</u> TCGAGCC

Die unterstrichenen Basen geben die Position der Fehlpaarung an.

2.1.8 Protein und DNA-Marker

Tabelle 2-XI: Bei der Elektrophorese verwendete Marker

<i>Name</i>	<i>Art</i>	<i>Bereich</i>	<i>Firma</i>
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Protein Marker	10 – 200 kDa	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	DNA-Marker	0.5 – 10.0 kb	Fermentas
pUC 8 Mix Marker	DNA-Marker	60 – 1100 bp	Fermentas
O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	DNA-Marker	25 – 700 bp	Fermentas
O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	DNA-Marker	10 – 300 bp	Fermentas

2.1.9 Komplettsysteme (*Kits*) und Säulen zur Proteinreinigung

Tabelle 2-XII: Säulen zur Reinigung von DNA und Proteinen

<i>Name</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Firma</i>
Zeba™ Desalting Spin Columns; ThermoScientific	Fluorophorabtrennung	Pierce
<i>Poly-Prep Chromatography Columns</i> (0.8 x 4 cm)	Ni ²⁺ -NTA Reinigung	BioRad
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	PCR-Produktreinigung	Promega
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Plasmid Reinigung	Promega

2.1.10 Puffer

2.1.10.1 Medium

LB-Medium

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
pH 7.5 eingestellt mit NaOH und autoklaviert

2.1.10.2 TSS-kompetente Zellen

TSS-Lösung

1 M MgCl₂; 10 % PEG 6000; 5 % DMSO
pH 6.5 – 6.8 muss nicht eingestellt werden

2.1.10.3 Proteinreinigung

Für die Reinigung von MutS und MutH wurden noch zusätzlich 10 % Glycerin zu den Bindungs-, Wasch- und Elutionspuffer hinzugefügt.

1 x STE Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA

1 x Bindungspuffer

20 mM Tris/HCl, pH 7.9; 5 mM Imidazol; 1 M NaCl
pH 7.9 eingestellt mit HCl

1 x Waschpuffer

20 mM Tris/HCl, pH 7.9; 20 mM Imidazol; 1 M NaCl
pH 7.9 eingestellt mit HCl

1 x Elutionspuffer

20 mM Tris/HCl, pH 7.9; 200 mM Imidazol; 1 M NaCl
pH 7.9 eingestellt mit HCl

1 x Dialysepuffer

10 mM Hepes/KOH, pH 7.9; 200 mM KCl; 1 mM EDTA
pH 7.9 eingestellt mit KOH

1 x Gelfiltrationspuffer

10 mM Hepes/KOH, pH 7.9; 200 mM KCl; 1 mM EDTA; 10 % Glycerin
pH 7.9 eingestellt mit KOH

2.1.10.4 Aktivitätsassay

10 x Puffer Gelb

100 mM Tris/HCl, pH 7.5; 100 mM MgCl₂; 1 mg/ml BSA

2.1.10.5 Crosslinkexperimente

10 x Bindungspuffer Grün

200 mM Hepes/KOH; 50 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA
pH 7.5 eingestellt mit KOH

2.1.10.6 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

1 x FRET Puffer

25 mM Hepes/KOH; 0.05 % Tween20; 125 mM KCl; 5 mM MgCl₂
pH 7.5 eingestellt mit KOH

2.1.10.7 Gelelektrophorese

6 % natives Acrylamidgel

6 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1 Mix); 420 mM Tris/HCl, pH 8.8; 1 x TPE
Laufpuffer; 2 % TEMED; 0.8 % APS

10 x TPE Laufpuffer

800 mM Tris/Phosphat; 20 mM EDTA
pH 8.2 eingestellt mit konz. H₃PO₄

5 x Agarose-Auftragspuffer (AAP)

250 mM EDTA; 25 % (w/v) Saccharose; 1.2 % (w/v) SDS;
0.1 % (w/v) Bromphenolblau
pH 8.0 eingestellt mit NaOH

6 % SDS-Trenngel

6 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1 Mix); 420 mM Tris/HCl, pH 8.8;
0.1 % SDS; 2 % TEMED; 0.8 % APS

6 % SDS-Sammelgel

6 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1 Mix); 130 mM Tris/HCl, pH 6.8;
0.1 % SDS; 2 % TEMED; 0.8 % APS

10 x SDS Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8.3; 190 mM Glycin; 0.1 % (w/v) SDS

5 x Laemmli-Auftragspuffer (LAP)

160 mM Tris/HCl, pH 6.8; 2 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin;
0.1 % Bromphenolblau

Kolloidales Coomassie

0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 2 % (w/v) Phosphorsäure;
5 % Aluminiumsulfat; 10 % Ethanol

2.1.10.8 PCR Reaktionspuffer

10 x *Taq*-DNA-Polymerase Puffer

100 mM Tris/HCl, pH 8.8; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 1 % Triton X-100

10 x *Pfu*-DNA-Polymerase Puffer

200 mM Tris/HCl, pH 9; 100 mM (NH₄)SO₄; 100 mM KCl; 25 mM MgCl₂;
1 % Triton-X100

2.1.10.9 Substratherstellung

10 x Ligase Puffer (Fermentas)

400 mM Tris/HCl, pH 7.8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 5 mM ATP

10 x Exonuklease I Puffer (Fermentas)

670 mM Glycin/KOH, pH 9.5; 67 mM MgCl₂; 10 mM DTT

10 x Puffer R (Fermentas)

10 mM Tris/HCl, pH 8.5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0.1 mg/ml BSA

10 x NEB-Puffer 4 (New England BioLabs)

200 mM Tris/Acetat, pH 7.9; 500 mM Kaliumacetat; 10 mM DTT; 100 mM
Magnesiumacetat

2.2 Mikrobiologisches Arbeiten

2.2.1 Bakterienstämme

1. HMS174(λ DE3) (Novagen)

Im *Escherichia coli* HMS174(λ DE3) Expressionsstamm wurden MutL und MutS exprimiert und die Plasmide amplifiziert, die für die Mutagenese als *template* verwendet wurden⁷⁴. Die Zellen wurden mit einem Derivat des pET-15b Vektors transformiert, welches die *mutS* und *mutL* Gene trägt. Die HMS174(λ DE3) Zellen weisen eine Rifampicinresistenz und eine geringe Rekombination auf und codieren für die T7 RNA-Polymerase, welche die Expression der *mutS* und *mutL* Gene unter dem T7 Promotor ermöglicht.

Genotyp: F⁻, *recA hsdR* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) Rif^R (DE3).

2. TX2929

Dieser Bakterienstamm ist *mutS* negativ und wurde für den *in vivo* Komplementationsassay (Mutatorrest) eingesetzt. Er ist ein Derivat der *E. coli* CC106 Zelllinie, bei der das *mutS* Gen durch eine Transposon-Insertion inaktiviert ist⁷⁵.

Genotype: *E. coli* K12 strains CC106: (P90C [*ara* Δ [*lac-proXIII*] [F'*lacIZ proB*⁺]])

TX2929: CC106 *mutS201::Tn5*;Km^r

3. XL1 Blue (Stratagene)

Dieser Bakterienstamm wurde für die Überexpression von MutH und während der Mutagenese als Rezeptor für die Elektrotransformation verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10* (Tet^r)].

2.2.2 Plasmide

pET-15b (His-tag Vektor, Ap^r (Novagen))

pTX412: pET-15b (*E. coli* K-12 ϕ (*his*₆-tag-*mutS*⁺)Hyb)⁷⁴

pTX412:CF:pTX412 (*mutS* [C93A/C23SS/C239A/C297S/C569S/C711V])³⁹

pET-15b-XhoI und pET-15b-HindIII⁷⁶

2.2.3 Medium

Für die LB-Agar Platten wurden 1.5 % (v/w) Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben. Nach dem Abkühlen des Mediums auf etwa 40 °C wurde das benötigte Antibiotikum (Tabelle 2-XIII) hinzugegeben und das Medium in Petrischalen gegossen. Gelagert wurden die Platten bei 4 °C.

Tabelle 2-XIII: Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika

<i>Name</i>	<i>Stockkonzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Gelöst in</i>
Ampicillin	25 mg/ml	75 - 100 µg/ml	Wasser
Kanamycin	25 mg/ml	25 µg/ml	Wasser
Rifampicin	50 mg/ml	100 ng/ml	Methanol
Tetracyclin	12 mg/ml	10 µg/ml	Ethanol

2.2.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Eine 25 ml Kultur wurde mit dem notwendigen Antibiotikum und dem gewünschten *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus der Vorkultur wurden 10 ml in eine 500 ml Hauptkultur überführt und bis zu einer OD^{600nm} von 0.8 – 1.0 wachsen lassen. Die Kultur wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert (J6-HC, Beckmann). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit 250 ml gekühlten Glycerin (10 %) behandelt und danach erneut zentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Der zweite Waschschrift wurde mit 150 ml Glycerin durchgeführt und der dritte und letzte Waschschrift mit 40 ml Glycerin. Zum Schluss wurden die Zellen vorsichtig in 2 ml 10 % Glycerin resuspendiert, in 80 µl Aliquots aufgeteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alle Schritte wurden in sterilen Gefäßen und auf Eis durchgeführt.

2.2.5 Herstellung TSS-kompetenter Zellen

Eine 3 ml Kultur wurde mit dem notwendigen Antibiotikum und dem gewünschten *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen. Aus der Vorkultur wurden 1 ml in eine 100 ml Hauptkultur überführt. Die Kultur wurde bis zu einer OD^{600nm} von 0.3 – 0.5 wachsen lassen und für 10 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert (J6-HC, Beckmann). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit 10 ml gekühlter TSS-Lösung vorsichtig resuspendiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alle Schritte wurden in sterilen Gefäßen und auf Eis durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen und DNA-Fragmenten wurden elektrophoretische Verfahren verwendet⁷³. Die verwendeten Marker sind in Tabelle 2-XI aufgeführt.

Die 6 % Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von bis zu 1000 bp verwendet. Größere DNA-Fragmente wurden über 2 %ige Agarosegele analysiert. Die DNA-Fragmente im Gel wurden mit Ethidiumbromidlösung inkubiert und durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zur Analyse von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt, wobei unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen es ermöglichen, Proteine mit verschiedenen Molekulargewichten aufzutrennen. In dieser Arbeit wurde vorwiegend mit 6 % SDS-Polyacrylamidgelen gearbeitet. Die anschließende Färbung wurde in kolloidalem Coomassie durchgeführt.

2.3.2 PCR-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)⁷⁷ wurde für die Synthese von homo- und heteroduplex DNA-Substraten und bei der zielgerichteten Mutagenese verwendet. Dabei wurde die *Taq*- oder die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Die Amplifikationen wurden in einem Thermocycler „Perkin Elmer GeneAmp PCR Systeme 2400“ durchgeführt.

2.3.3 PCR-Produktreinigung

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) unter Anleitung des Herstellerprotokolls. Die Zentrifugations- und Inkubationszeiten wurden jeweils von 1 auf 2 min erhöht.

2.3.4 Plasmidreinigung

Die Isolierung von Plasmiden (Minipräparationen) erfolgte mit dem *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) unter Verwendung des Herstellerprotokolls.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

Plasmide, die die Gene der in dieser Arbeit erstmals verwendeten MutS Varianten tragen, wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Dazu wurde 0.75 bis 1,5 µg Plasmid-DNA (Abschnitt 2.3.4) und 2 pmol/µl Primer eingeschickt.

Für die MutS Varianten wurden 5 Primer (Abschnitt 2.1.6) verwendet, um das Gen vollständig zu sequenzieren, die Primer decken jeweils Abschnitte von etwa 800 bp ab, die zueinander überlappend sind.

2.3.6 Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Spektrophotometer Nanodrop® (*ND-1000 Spectrophotometer*, PeqLab) verwendet. Hierbei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und davon ausgegangen, dass 1 OD^{260nm} einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA entspricht.

2.3.7 Bestimmung der Konzentrationen von Proteinen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein Absorptionsspektrum von 250 nm bis 350 nm mit dem Spektrophotometer Nanodrop® (*ND-1000 Spectrophotometer*, PeqLab) aufgenommen. Aus der Absorption bei 280 nm wurde dann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von MutL ($\epsilon = 54890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bzw. MutS ($\epsilon = 68000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Konzentration berechnet. Die Extinktionskoeffizienten sind theoretische Werte, welche aus der Aminosäuresequenz über Vektor NTI® bestimmt wurden.

2.3.8 Zielgerichtete Mutagenese zur Herstellung von Einzelcysteinvarianten

Das verwendete Protokoll zur zielgerichteten PCR–Mutagenese lehnt sich an das von Kirsch und Joly, 1998 an⁷⁸. Zwei PCR Schritte sorgen für den nötigen Basenaustausch im zu mutierenden Gen. Innerhalb dieser Arbeit wurden acht neusynthetisierte Einzelcysteinvarianten (SC) von MutS hergestellt (Tabelle 2-XXI).

- I. 1. PCR
- II. 2. PCR (Megaprimer PCR)
- III. Restriktionsverdau mit DpnI
- IV. Plasmidreinigung durch Ethanol-fällung
- V. Elektrotransformation der *E. coli* XL1 Blue Zellen mit dem mutierten Plasmid
- VI. *Screening*
- VII. Transformation von TSS-kompetenten *E. coli* HMS 174(λ DE3) Zellen
- VIII. Glycerinkulturherstellung
- IX. *In vivo* Komplementationsassay

I. 1. PCR

In der ersten PCR (Tabelle 2-XIV und Tabelle 2-XV) wurden mit Hilfe des Mutageneseprimers (Tabelle 2-IX), welcher über die Firma Biomers bezogen wurde, die gewünschte Mutation und die spezifische Schnittstelle für ein Restriktionsenzym in den Megaprimer eingeführt. Als *templates* für die verschiedenen MutS Varianten dienten die in Tabelle 2-XXI angegebenen Plasmide. Für die PCR wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet.

Tabelle 2-XIV: 50 µl Reaktionsansatz

Konzentration	Komponente
50 - 100 ng	<i>template</i> (Plasmid)
5 U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
0.4 µM	Mutageneseprimer
0.4 µM	Gegenprimer
0.2 mM	dNTPs
1 x	<i>Pfu</i> -Puffer

Tabelle 2-XV: PCR Programm für die 1. PCR

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
94	120 s	1 x
94	30 s	} 20 x
55	60 s	
68	60 s	
55	60 s	1 x
68	300 s	1 x
4	∞	1 x

Ein Teil des PCR-Produktes wurde auf korrekte Länge und Spezifität (ohne Nebenprodukt) mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

II. 2. PCR (Megaprimer PCR)

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde als Megaprimer verwendet. Mit diesem Primer wurde die gesamte Plasmid-DNA linear amplifiziert (Tabelle 2-XVI und Tabelle 2-XVII). Das Endprodukt der 2. PCR ist zirkulär stabil, obwohl die Enden nicht durch Ligation verschlossen wurden. Als *templates* dienten auch hier wieder die in Tabelle 2-XXI angegebenen Plasmide und die *Pfu*-DNA-Polymerase wurde zur Vervielfältigung verwendet.

Tabelle 2-XVI: 50 µl Reaktionsansatz

<i>Konzentration</i>	<i>Komponente</i>
100 ng	<i>template</i> (Plasmid)
5 U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
200 ng	Megaprimer
0.4 mM	dNTPs
1 x	<i>Pfu</i> -Puffer

Tabelle 2-XVII: PCR-Programm für die 2. PCR

<i>Temperatur[°C]</i>	<i>Zeit</i>	<i>Anzahl der Wiederholungen</i>
95	120 s	1 x
95	50 s	} 8 x
55	50 s	
68	25 min	
95	50 s	} 8 x
55	50 s	
68	25 min, 10 s	
68	11 min	1 x
4	∞	1 x

Als Kontrolle der korrekten Länge wurde ein Teil des PCR-Produktes mittels PAGE analysiert.

III. Restriktionsverdau mit DpnI

Das PCR-Produkt der 2. PCR wurde mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, wodurch die *dam*-methylierte *template*-DNA abgebaut wurde. Die unmethylierte und mutierte DNA wurde zur Transformation von *E. coli* XL1 Blue Zellen weiter verwendet. Das Gesamte PCR-Produkt wurde mit 2 µl DpnI (20 U) für 3 Stunden bei 37 °C verdaut.

IV. Plasmidreinigung durch Ethanol-fällung

Das mutierte Plasmid wurde über Elektrotransformation in XL1 Blue Zellen eingebracht, um die DNA dafür salzfrei zu bekommen, wurde eine Ethanol-fällung vor der Transformation durchgeführt.

Zum Reaktionsprodukt (Volumen V) aus dem DpnI Verdau wurden 1/3 V einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4.6) und 3 V 100 % Ethanol (v/v) hinzugefügt und bei 4 °C für 30 min bei 12000 rpm abzentrifugiert (Sorvall MC 12V, DuPont). Der Überstand wurde entfernt und die DNA mit 6 V 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach der Zentrifugation (4 °C, 14000 rpm für 20 min; Sorvall MC 12V, DuPont) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet vollständig getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in Wasser resuspendiert.

V. Elektrotransformation der *E. coli* XL1 Blue Zellen mit dem mutierten Plasmid

Für die Elektrotransformation wurde der Elektroporator der Firma Invitrogen (NV Keek, Niederlande) verwendet. Die Transformation wurde in speziellen Küvetten (Invitrogen) durchgeführt.

Die elektrokompententen XL1 Blue Zellen (Abschnitt 2.2.4) wurden bei -80 °C gelagert und auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen der Zellen wurden 50 – 100 ng Plasmid-DNA hinzu gegeben und für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Mix aus Zellen und DNA in eine spezielle Küvette überführt und die Elektrotransformation mit 1250 V, 25 mA und 25 Ohm durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden 800 µl LB Medium (ohne Ampicillin) in die Küvette gegeben, der Mix aus Zellen, Medium und DNA in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen 4 min bei RT und 4000 rpm (Sorvall MC 12V, DuPont) abzentrifugiert und der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 30 - 50 µl entfernt. In diesem Rest wurde das Pellet resuspendiert und auf Ampicillin- bzw. Ampicillin-/Tetracyclin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

VI. Screening

Die Plasmid-DNA der nach der Elektrotransformation gewachsenen Klone, wurden auf das Vorhandensein der gewünschten Mutationen kontrolliert. Für jede Mutation wurden 10 Klone aufgenommen und die mutierte Region wurde mittels PCR (Tabelle 2-XVIII und Tabelle 2-XIX) und spezifischem Primer (Tabelle 2-IX) amplifiziert. Als Kontrolle diente das *template* Plasmid. Die PCR wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit dem spezifischen Restriktionsenzym (Tabelle 2-IV) nach Herstellerangaben verdaut und über eine PAGE analysiert. Positive Klone wurden gepickt, in einer 3 ml Kultur bei 37 °C über Nacht wachsen lassen und am nächsten Tag das Plasmid über eine Minipreparation (Abschnitt 2.3.4) isoliert. Die Konzentration wurde (Abschnitt 2.3.6) bestimmt und die Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle sequenziert (Abschnitt 2.3.5).

Tabelle 2-XVIII: 30 µl Reaktionsansatz für die *Screening* PCR

Konzentration	Komponente
5 U	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
0.4 µM	BB seq A
0.4 µM	BB seq B
0.2 mM	dNTPs
1 x	<i>Taq</i> -Puffer

Tabelle 2-XIX: *Screening* PCR-Programm

Temperatur[°C]	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
94	5 min	1 x
94	30 s	} 20 x
55	30 s	
72	180 s	
72	5 mi	1 x
4	∞	1 x

Tabelle 2-XX: 20 µl Reaktionsansatz für Restriktionsverdau

Konzentration	Komponente
10 µl	PCR-Produkt
5 U	Enzym (AluI bzw. BspMI)
1 x	Puffer (Tango bzw. „0“, Fermentas)

VII. Transformation von TSS-kompetenten *E. coli* HMS 174(λDE3) Zellen

Im nächsten Schritt wurden Zellen des Expressionsstammes HMS 174(λDE3) mit der Plasmid-DNA der positiven Klone der MutS Varianten mittels sogenannter Hitzetransformation transformiert.

Die TSS-kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 100 – 150 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und für 40 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 2 min auf 42 °C erwärmt und vor der Zugabe von 800 µl LB-Medium für 3 min auf Eis abgekühlt. Dieser Mix wurde für 1 Stunde auf 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 min bei 4000 rpm; Sorvall MC 12V, DuPont). Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 30 - 50 µl abgenommen und das Pellet darin resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf Ampicillinplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Bakterien konnten zur Herstellung einer Glycerinkultur bzw. zur Proteinproduktion verwendet werden.

VIII. Glycerinkulturherstellung

Aus einer 3 ml Übernachtskultur wurden 100 µl entnommen und erneut in eine 3 ml LB-Kultur überführt, woraufhin die Zellen für 4 - 5 Stunden bei 37 °C inkubierten. Danach wurden zu 800 µl dieser 3 ml Kultur mit 200 µl 87 % Glycerin versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurde die Kultur in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

IX. *In vivo* Komplementationsassay

Der *in vivo* Komplementationsassay wurde in Anlehnung an das Protokoll von Wu & Marinus durchgeführt⁷⁹.

Besitzen Zellen kein funktionsfähiges, chromosomal-kodiertes *mutS* Gen, weisen sie aufgrund eines unvollständigen *mismatch*-Reparatursystems einen veränderten, mutierten Phänotyp auf. Eine höhere Mutationsrate, zeigt sich in Form einer erhöhten Frequenz von rifampicinresistenten Klonen, die durch Mutationen im *rpoB* Gen hervorgerufen werden⁸⁰. Zellen mit einem funktionierenden Reparatursystem sind nicht fähig auf Rifampicinplatten zu wachsen, da ihre Mutationsrate zu gering ist, um eine Rifampicinresistenz auszubilden. Plasmid-DNA, die ein *mutS* Gen zur Komplementation trägt, wurde mittels Hitzeschocktransformation in *mutS*⁻ TX2929 Zellen eingebracht. Danach wurden Klone gepickt und in 3 ml LB-Medium bei 37 °C für 17 Stunden inkubiert. Von diesen Kulturen wurden 50 µl entnommen, auf Ampicillin-/Rifampicinplatten ausgestrichen und für 16 bis 17 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt.

Als Negativ- und Positivkontrolle wurden TX2929 Zellen mit den pET-15b Plasmid (Vektorkontrolle) und mit dem pTX412 Plasmid (MutS Wildtyp) transformiert. Diese Zellen besitzen ebenfalls ein aktives *mutS* Gen und zeigen daher kaum Klone auf den Platten.

Tabelle 2-XXI: Klonierte MutS Varianten

<i>MutS Variante</i>	<i>Template-DNA</i>	<i>Primer für 1. PCR</i>	<i>Restriktionsenzym</i>
MutS ^{93C}	S_Cysteinfrei_Plasmid ³⁹	MutS_A93C_back_Alul MutS_R3_Peter	AluI
MutS ^{239C}	S_Cysteinfrei_Plasmid ³⁹	MutS_A239C_back_BspMI MutS_F1_Peter	BspMI
MutS ^{D246C}	S_Cysteinfrei_Plasmid ³⁹	MutS_D246C_BseMII MutS_F1_Peter	BseMII
MutS ^{D246C/D835R}	S_D246C_Plasmid	MutS_CTD MutS_D835R_Cfr13I	Cfr13I
MutS ^{S427C}	S_Cysteinfrei_Plasmid ³⁹	MutS_S427C_PsiI MutS_Fw_Ines	PsiI
MutS ^{Q526C}	S_Cysteinfrei_Plasmid ³⁹	MutS_Q526C_AvaI MutS_R3_Peter	AvaI
MutS ^{93/239C}	S_239C_Plasmid	MutS_A93C_back_Alul MutS_R5_Peter	AluI
MutS ^{93/239C/D835R}	S_93_239C_Plasmid	MutS_CTD MutS_D835R_Cfr13I	Cfr13I

In Tabelle 2-XXI sind alle über zielgerichtete Mutagenese klonierten MutS Varianten mit den verwendeten *templates*, Primern und Restriktionsenzymen dargestellt.

2.3.9 Proteinreinigung über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Alle Gene stehen unter Kontrolle des T7-Promotors und können mit IPTG induziert und überexprimiert werden.

Rekombinate Proteine MutS, MutL und MutH wurden mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen, daher war es möglich, die drei *mismatch*-Reparaturproteine über Ni²⁺-NTA-Agarose IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) zu reinigen. Die Proteinreinigung wurde immer auf Eis oder im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Alle verwendeten LB-Medien wurden mit Ampicillin (75 µg/ml) versetzt.

Es wurden 25 ml LB-Medium mit den entsprechenden Bakterien (HMS-Zellen) angeimpft und über Nacht bei 37 °C Luftschtler (Innova® 40, Incubator Shaker Series) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml der Bakterienvorkultur in 500 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert, bis eine OD^{600nm} (Spektrometer U-1100, Hitachi) von 0.8 – 1.2 erreicht wurde. Danach wurde die Temperatur auf 28 °C gesenkt und durch Zugabe von 1 mM IPTG die Induktion und Überexpression gestartet. Nach 4 Stunden wurden die Bakterien bei 4200 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert (J6-HC, Beckmann). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 15 ml eiskaltem STE-Puffer (1fach) resuspendiert. Die Zellen aus 2 x 500 ml Kulturen wurden in ein Greinerröhrchen überführt, und nach erneutem

Zentrifugieren für 15 min bei 4 °C und 4200 rpm (Beckmann, J6-HC) und der Entfernung des Überstand wurden die Pellets bei -20 °C eingefroren.

Für die Ni²⁺-NTA Reinigung wurden die Pellets aus 4 x 500 ml Kulturen (2 Greinerröhrchen) aufgetaut und in 30 ml Bindungspuffer resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung mit dem Branson Sonificator für 12 x 30 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause (*Duty cycle* 50 %, *Output control* 5) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proben danach bei 20000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert (JA20, Beckman). Der Überstand wurde in ein Greinerröhrchen mit 0.75 ml Ni²⁺-NTA überführt und zum Binden des Proteins an das Nickelchelat für 60 min auf dem Rolltisch (TRM 56, IDL) bei 4 °C inkubiert. Danach wurde für 5 min bei 800 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckmann, J6-HC), die Ni²⁺-NTA befand sich mit dem gebundenen Protein als Pellet im Röhrchen und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Danach wurde dreimal mit 30 ml Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift wurden 5 min bei 800 rpm und 4 °C zentrifugiert (J6-HC, Beckmann) und der Überstand entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Ni²⁺-NTA mit dem gebundenen Protein auf eine BioRad[®]Säule (*Poly-Prep Chromatography Columns*, 0.8 x 4 cm) gegeben. Nach Absetzen des Ni²⁺-NTA wurde der restliche Waschpuffer entfernt und viermal mit 0.5 ml Elutionspuffer das Protein eluiert. Die Proteinkonzentration der vier Eluate wurde mit dem Spektrophotometer Nanodrop[®] (Abschnitt 2.3.7) bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden für 20 min mit 20 mM DTT auf Eis inkubiert, um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Nach der DTT Inkubation konnten die Fraktionen über Nacht im Kühlraum gegen Dialysepuffer dialysiert oder direkt über eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 Säule) weiter gereinigt werden.

Am nächsten Tag wurden die dialysierten Fraktionen aus den Dialyseschläuchen (Durchlassgröße < 14.000Da, Roth) genommen und für 30 min und 4 °C bei 13000 rpm abzentrifugiert (Centrifuge 5417C, Eppendorf). Nach der Zentrifugation wurde die Konzentration des gereinigten Proteins bestimmt (Abschnitt 2.3.7). Das Protein wurde im nächsten Schritt a) Fluoreszenz markiert (Abschnitt 2.3.10), mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingefroren oder b) es wurde ein weiterer Reinigungsschrift, die Gelfiltration durchgeführt.

Für eine bessere Proteinqualität wurde nach der Ni²⁺-NTA Reinigung eine Größenausschlusschromatographie oder auch Gelfiltration angeschlossen. Dabei wurde 1 ml über Ni²⁺-NTA gereinigte Proteinlösung auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare), welche mit einer HPLC (Elite LaChrom, VWR Hitachi L-2455) verbunden war, gegeben. Bei einer Flussrate von 0.5 ml/min eluiert der MutL Dimer nach 23 - 25 min

und MutS Dimer eluiert aufgrund des höheren Molekulargewichtes schon nach 20 – 23 min. Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen und deren Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 2.3.7). Im nächsten Schritt wurden die Fraktionen aliquotiert und schockgefroren oder mit Fluorophoren modifiziert (Abschnitt 2.3.10).

2.3.10 Zielgerichtete Fluorophormodifikation von SC-MutS und SC-MutL Varianten

Für die Modifikation der DNA-Reparaturproteine wurden die Fluorophore Alexa 488-Maleimid als Donor und/oder Alexa 594-Maleimid als Akzeptor verwendet. Die Markierung kann direkt an die Proteinreinigung angeschlossen werden, aber auch mit bereits schockgefrorenem Protein durchgeführt werden. Das verwendete Verfahren war in beiden Fällen das Gleiche, allerdings mit variierenden Volumina. Direkt nach der Proteinreinigung wurden 500 bis 800 µl Proteinlösung zur Modifikation eingesetzt. Waren die Proteine vorher bereits eingefroren, wurden Volumina zwischen 50 und 200 µl markiert.

Für die Modifikation mit nur einem Fluorophor (einfachmarkiert) wurde ein Verhältnis zwischen Protein und Fluorophor (Donor oder Akzeptor) von 1:4 verwendet. Beim Modifizieren mit zwei Fluorophoren (doppelmarkiert) betrug das Verhältnis 1:0,5-1:4 (Protein:Donor:Akzeptor). Das zu modifizierende Protein wurde für 30 – 60 min auf Eis mit dem jeweiligen Fluorophor oder einer Fluorophormischung aus Donor und Akzeptor inkubiert und danach über zwei Ionenaustauschsäulen (Zeba™ Desalting Spin Columns; ThermoScientific, Pierce) gereinigt. Nach der Entfernung des freien Fluorophors wurde die Proteinlösung für 30 min bei 4 °C und 13000 rpm (Centrifuge 5417C, Eppendorf) zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt (Abschnitt 2.3.7). Die gereinigten und markierten Proteine wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die so behandelten Proteine konnten für FRET-Messungen (Abschnitt 2.3.11), funktionelle Untersuchungen (MutH-Aktivierung; Abschnitt 2.3.17) oder strukturelle Analysen (Analytische Ultrazentrifugation, AUZ; Abschnitt 2.3.14) verwendet werden.

2.3.11 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden FRET-Messungen mit fluorophormodifizierten SC-MutS und SC-MutL Varianten durchgeführt. Als Donor und Akzeptor wurden dabei Alexa-Maleimid 488 und Alexa-Maleimid 594 verwendet (Abschnitt 2.1.3). Die verwendete Anregungswellenlänge lag bei 470 nm für den Donor und bei 575 nm für den Akzeptor. Die Emission wurde bei 517 nm für Alexa 488 und 617 nm für Alexa 594 gemessen. Die Messungen erfolgten im FluoroMax-4 Spektrafluorometer von HORIBA Jobin Yvon mit

einer Spaltbreite von 1.8 nm. Der Förster-Radius R_0 , gibt dabei den Abstand eines Donor-Akzeptorpaars an, bei dem der Energieübertragung 50 % entspricht.

Dabei wurde bei den DNA-Bindungsexperimenten 100 nM unmodifiziertes MutS, 50 nM mit Alexa 488 und Alexa 594 modifizierte 42 bp heteroduplex DNA im FRET-Puffer (Abschnitt 2.1.10.6) eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurden die DNA-Biegungsexperimente mit Alexa 594 modifizierten MutS und mit Alexa 488 modifizierter heteroduplex DNA durchgeführt. Es wurde immer zu erst die DNA gemessen, danach MutS dazugegeben und erneut das FRET-Signal im Fluoreszenzspektrophotometer gemessen. Zum Schluss wurde als Kontrolle der entstandene FRET durch einen Überschuss (2 μ M) an unmarkierter 42 bp heteroduplex DNA (Kompetitor-DNA) wieder aufgelöst. Für die Dissoziationsgeschwindigkeitsassays wurden die gleichen Konzentrationen, wie bei den Bindungs- und Biegungsassays verwendet. Durch die Zugabe der Kompetitor-DNA wurde das FRET-Signal aufgelöst und dadurch die Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt.

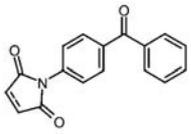
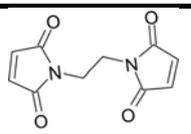
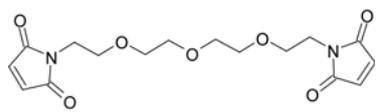
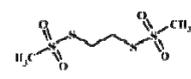
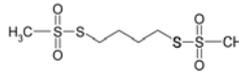
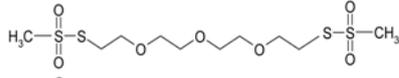
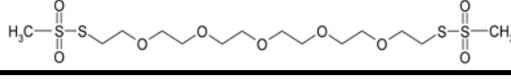
2.3.12 Thrombinspaltung

Der Verdau wurde mit Thrombin (GE Healthcare) durchgeführt. Dabei wurde 1 U der Protease verwendet, um 100 μ g Protein zu verdauen. Der Ansatz wurde für 4 Stunden auf Eis inkubiert und konnte danach mit PMSF (1 mM) gestoppt werden.

2.3.13 Crosslink-Experimente

Für die Crosslink-Experimente wurden verschiedene, chemische Crosslinker verwendet. Der Photocrosslinker Benzophenonmaleimid (BPM) und die Methanthiosulfonat-Crosslinker (MTS) sind in DMSO löslich und spaltbar mit reduzierenden Chemikalien wie DTT, β -Mercaptoethanol oder TCEP. Die Maleimid-Crosslinker (BM[PEO]₃ und BMOE) sind in DMSO und der längere BM[PEO]₃ auch in Wasser löslich und können nicht mit reduzierenden Chemikalien gespalten werden. Alle Crosslinker wurden nach dem Lösen in DMSO oder Wasser bei -20 °C und ungelöst bei 4 °C im Exsikkator gelagert. Die Tabelle 2-XXII zeigt die in der Arbeit genutzten Crosslinker mit der jeweiligen Struktur und den Eigenschaften.

Tabelle 2-XXII: Struktur der verwendeten Crosslinker mit maximaler Spannweite

<i>Name</i>	<i>Struktur</i>	<i>maximale Spannweite</i>	<i>Referenz</i>
<i>Photocrosslinker</i>			
Benzophenonmaleimid (BPM)		11.4 Å	
<i>Thiol-spezifische Crosslinker</i>			
BMOE		8 Å	Pierce
BM[PEO] ₃		17.8 Å	Pierce
MTS-2-MTS		5.2 Å	81
MTS-4-MTS		7.8 Å	81
MTS-11-MTS		16.9 Å	81
MTS-17-MTS		24.7 Å	81

Die MTS-Crosslinker sind genauso wie die Maleimid-Crosslinker homobifunktionell und verknüpfen zwei SH-Gruppen von Cysteinen durch Ausbildung von zwei kovalenten Disulfidbrücken (Abbildung 2-II C) miteinander. Bei den Maleimid-Crosslinkern wird die Doppelbindung im Ring für die Reaktion mit der SH-Gruppe verwendet, so dass eine C-S Bindung entsteht (Abbildung 2-II D).

Der Photocrosslinker (BPM) wurde zu erst an den Cysteinrest in MutL gebunden und die Reaktion mit DTT gestoppt. Danach wurde MutL zur MutS-DNA Vorinkubation hinzugegeben und mit UV-Licht aktiviert. Durch die Aktivierung des Crosslinkers konnte dieser mit Gruppen in der Umgebung reagieren und so die beiden Reste/Proteine verbinden (Abbildung 2-II A). Die Bedingungen für das Photocrosslinken waren dieselben, wie die für das chemische Crosslinken, nur das beim chemischen Crosslinken beide Proteine zusammen inkubiert und dann erst der Crosslinker dazugegeben wurde (Abbildung 2-II B).

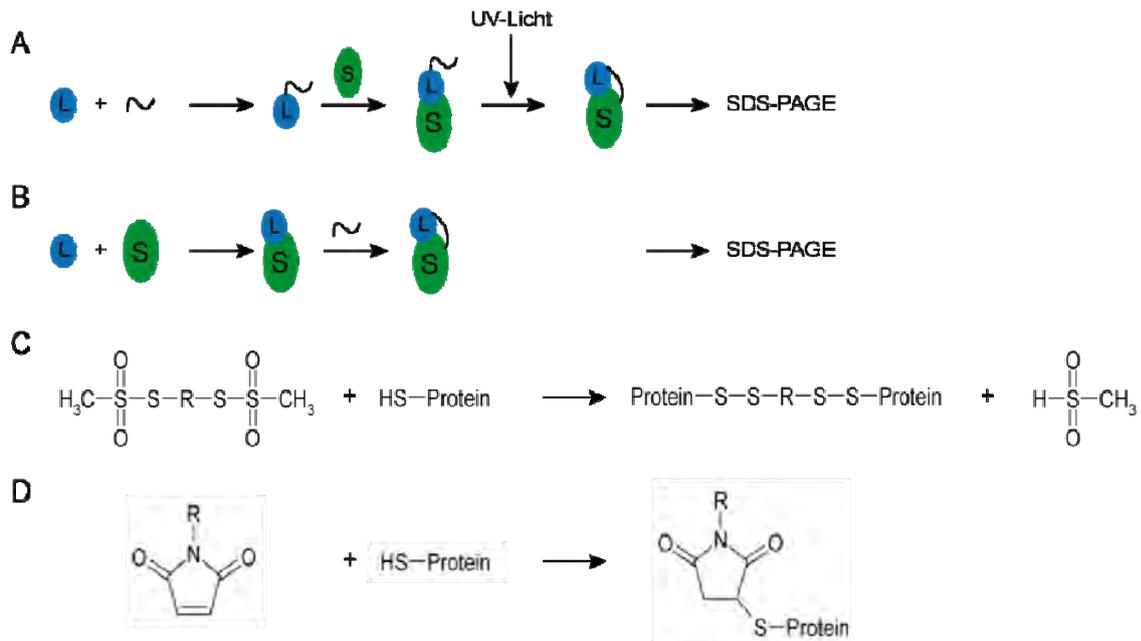


Abbildung 2-II: Schematische Darstellung verschiedener Crosslinkreaktionen

A) Schematische Darstellung der Photocrosslinkreaktion zwischen zwei Proteinen, in Blau MutL und in Grün MutS. B) Schematische Darstellung für eine thiol-spezifische Crosslinkreaktion, in Blau MutL und in Grün MutS. Analysiert wurden beide Crosslinkreaktionen über SDS-PAGE. C) zeigt die chemische Reaktion mit den verwendeten MTS-Crosslinkern und D) die Maleimid-Reaktion der Crosslinker BM[PEO]₃ und BMOE Die Abbildung wurde verändert nach⁸².

Die einzelnen Komponenten wurden für 25 min auf Eis vorinkubiert, dabei wurde von MutL ein 10fach und von MutS ein 1.4fach Mastermix angesetzt. Dafür wurden 10 µM MutL in 1 x Bindungspuffer, 150 mM KCl und in An- oder Abwesenheit von 5 mM Nukleotid (ATP, ADP, AMPPNP) inkubiert. Außerdem wurden 0.57 µM MutS in 1 x Bindungspuffer, 150 mM KCl und in An- oder Abwesenheit von 142.8 nM DNA (homo- oder heteroduplex DNA) inkubiert. Danach wurden die Ansätze gemischt. Falls nicht anders angegeben wurden die in Tabelle 2-XXIII aufgeführten Endkonzentrationen verwendet.

Diese Ansätze wurden nun 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann für 1 - 2 min auf 37 °C erwärmt. Danach wurden 2 µl einer 0.5 mM Crosslinkerlösung hinzugegeben und für weitere 1 - 2 min bei 37 °C inkubiert und dann mit 1 µl DTT bzw. NEM (1 M) gestoppt (Abbildung 2-III). Zum Schluss wurden 5 µl LAP ohne β-Mercaptoethanol (5fach) hinzugegeben und die Proben über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

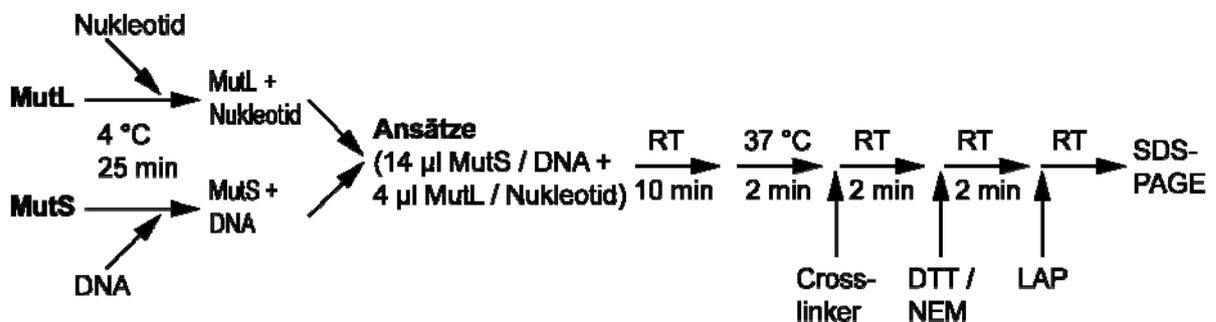
Tabelle 2-XXIII: Endkonzentrationen in den Crosslinkversuchen

Konzentration	Komponente
1 µM (1,4 µg)	MutL
400 nM (0,8 µg)	MutS
100 nM	DNA
1 mM	Nukleotid
50 µM	Crosslinker
50 mM	DTT
150 mM	KCl
1 x	Bindungspuffer Grün

Die gefärbten Gele wurden mit Hilfe einer BioDocAnalyse-Anlage (Biometra) digitalisiert und mit dem Programm TotalLab v2.01 quantitativ ausgewertet. Zur Berechnung der Crosslinkausbeute wurde die Gleichung 2.1 genutzt.

$$\frac{(L \times S \div (97 \text{ kDa} + 70 \text{ kDa}))}{[(S \times S \div 97 \text{ kDa} + S \div 97 \text{ kDa} + L \times S \div (97 \text{ kDa} + 70 \text{ kDa}))]} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

In der Gleichung wurde das Molekulargewichte von MutS (97 kDa) und von MutL (70 kDa) und die berechnete Intensität der MutS-MutL-Bande („L x S“), der MutS-MutS-Bande („S x S“) und der MutS-Bande („S“) verwendet.

**Abbildung 2-III:** Crosslinkprotokoll

Die Vorinkubation von MutL mit dem entsprechenden Nukleotid (ATP, ADP, AMPPNP) und MutS mit der jeweiligen homo- oder heteroduplex DNA (lineare 484 bp, zirkuläre 505 bp oder Oligonukleotide) wurden für 25 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze zusammengegeben und die entsprechenden Endkonzentrationen erhalten (Tabelle 2-XXIII). Danach wurden die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur und weitere 2 min bei 37 °C inkubiert und anschließend den Crosslinker hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C wurde mit DTT (Maleimid-Crosslinker) oder mit NEM (MTS-Crosslinker) gestoppt und über eine SDS-PAGE mit darauffolgender Coomassie-Färbung analysiert. Weitere Erklärungen können dem Text entnommen werden.

2.3.14 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) eingesetzt, um die Homogenität der mit Fluorophor (Alexa 488) markierten MutS und MutL Einzelcysteinvarianten zu kontrollieren und um die Interaktion zwischen MutS und MutL an der DNA zu untersuchen. Außerdem sollte geprüft werden, ob die Fluorophore die

Quartärstruktur der Proteine beeinflussen. Bei der AUZ wird die Probe während der Zentrifugation in Echtzeit über ein optisches Signal, in diesem Fall über Fluoreszenz, beobachtet.

Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Coulter Optima XL-I) mit nachträglich eingebauten Fluoreszenzdetektionssystem (AU-FDS, Aviv Biomedical, NJ, USA) an der Medizinischen Hochschule Hannover in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus Urbanke/PD Dr. Ute Curth durchgeführt. Verwendet wurde ein An50Ti Rotor und die Analysen wurden für 16–18 h bei 20 °C und Geschwindigkeiten zwischen 22000 bis 33000 rpm durchgeführt. Die Konzentrationsprofile wurden mittels AU-FDS bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm gemessen. Die Emission wurde über ein dichroitischen Langpassfilter (> 505 nm) detektiert. Die Programmierung der Zentrifuge und die Datenerfassung erfolgten über einen extra angeschlossenen Computer mit der AOS Software (Aviv Biomedical, NJ, USA). Spezielle Zellgehäuse (Nanolytics, Deutschland) wurden verwendet, welche die direkte Platzierung eines 3 mm Doppelsektor-Mittelstückes an die obere Scheibe ermöglichte. Die ZU-Zellen wurden mit 100 µl Probenlösung gefüllt. Die Experimente wurden in 125 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.01 mM EDTA, 20 mM Hepes pH 7.5 und in Anwesenheit von 0.05 % Tween20, zur Verhinderung von Proteinanlagerungen an Oberflächen, durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration von Alexa 488 markierten MutS^{R449C/D835R} und MutL^{H297C} lag zwischen 100 nM und 1 µM, von MutS^{D246C/D835R} Alexa 488 wurden 100 nM eingesetzt. Um den Einfluss von Nukleotiden auf das Sedimentationsverhalten der Proteine zu testen, wurden die Experimente in Anwesenheit von 1 mM ADP, ATP oder AMPPNP durchgeführt. Die DNA-Bindung der markierten MutS Varianten wurden mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen kontrolliert, wobei 100 nM Protein mit 1 mM ADP und 500 nM 42 bp heteroduplex Oligonukleotid (Abschnitt 2.1.7), 10 nM 484 bp lineare, heteroduplex DNA oder 10 nM zirkuläre, heteroduplex DNA eingesetzt wurden. Bei Abweichungen wurden die Konzentrationen angegeben. Die gemessenen Konzentrationsprofile wurden mit dem Programm SEDFIT ausgewertet. Die durch hydrodynamischen Analysen gemessene s-Werte wurden auf $s_{20}^{\circ C, W}$ Werte über das partielle spezifische Volumen, welches aus der Zusammensetzung der Aminosäurereste berechnet wird⁸³, korrigiert. Da das partielle spezifische Volumen von Komplexen aus verschiedenen Makromolekülen mit unbekannter Zusammensetzung nicht berechnet werden kann, wurden nicht korrigierte Sedimentationskoeffizienten (s_{exp}) angegeben.

Die Proben wurden nach den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit TCA gefällt und über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

2.3.15 Herstellung linearer DNA-Substrate

Die Herstellung von linearen *mismatch*-Substraten oder heteroduplex DNA lehnt sich an das Protokoll von Thomas *et. al.* an und wurde nur in wenigen Schritten verändert⁸⁴. Die eingesetzte DNA-Menge in der PCR (Tabelle 2-XXIV und Tabelle 2-XXV) wurde etwas erhöht und die verwendete Zyklenanzahl verringert, um ungewollte Fehlpaarungen zu vermeiden.

Tabelle 2-XXIV: PCR zur Herstellung linearer DNA

Konzentration	Komponente
300 – 400 ng	<i>template</i> (HindIII bzw. XhoI Plasmide)
100 - 150 U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
0.4 μ M	Primer 1 (nicht-phosphoryliert)
0.4 μ M	Primer 2 (phosphoryliert)
0.2 mM	dNTPs
1 x	<i>Pfu</i> -Puffer

Tabelle 2-XXV: PCR-Programm zur Herstellung linearer DNA

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
94	120 s	1 x
94	30 s	} 20 x
55	30 s	
68	50 s	
68	5 min	1 x
4	∞	1 x

Für die Versuche wurde lineare DNA mit einer Länge von 484 bp verwendet (Abbildung 2-IV), welche sich in zwei Fragmente von 209 bp und 275 bp spalten ließ.



Abbildung 2-IV: 484 bp G/T-*mismatch*-Substrat mit GATC-Erkennungssequenz

Für die Herstellung der linearen DNA (Abbildung 2-V) wurden die zwei Plasmide pET-15b-XhoI und pET-15b-HindIII verwendet, wobei ein Plasmid eine XhoI-Schnittstelle und das andere eine HindIII-Schnittstelle besaß, so dass sich beide Plasmide nur in einem Basenpaar unterschieden. Durch die Phosphorylierung von zwei Primern, erhielt man in

beiden Fällen ein Produkt, welches einen nicht-phosphorylierten und einen phosphorylierten Strang besaß. Die PCR-Produkte wurden über Promega Säulchen (Abschnitt 2.3.3) gereinigt. Der phosphorylierte Strang wurde nach der Reinigung durch λ -Exonuklease Verdau entfernt. Diese Exonuklease baut Nukleotide in 5' \rightarrow 3' Richtung von doppelsträngiger DNA ab. Dafür wurden 1000 ng doppelsträngiger DNA mit 5 U λ -Exonuklease für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion auf Eis gestoppt. Die Vollständigkeit des Verdau konnte mit einem 6 %igen Polyacrylamidgel kontrolliert werden, da einzelsträngige DNA ein anderes Laufverhalten aufweist als doppelsträngige DNA. Nach der Kontrolle wurden gleiche Mengen beider DNA-Stränge gemischt und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Durch langsames Abkühlen, z. B. im ausgeschalteten Heizblock, konnten die komplementären DNA-Einzelstränge zu doppelsträngiger *mismatch*-DNA hybridisiert werden. Die so hergestellte doppelsträngige heteroduplex DNA wurde zum Schluss erneut über Promega Säulchen (Abschnitt 2.3.3) gereinigt und bei -20 °C gelagert.

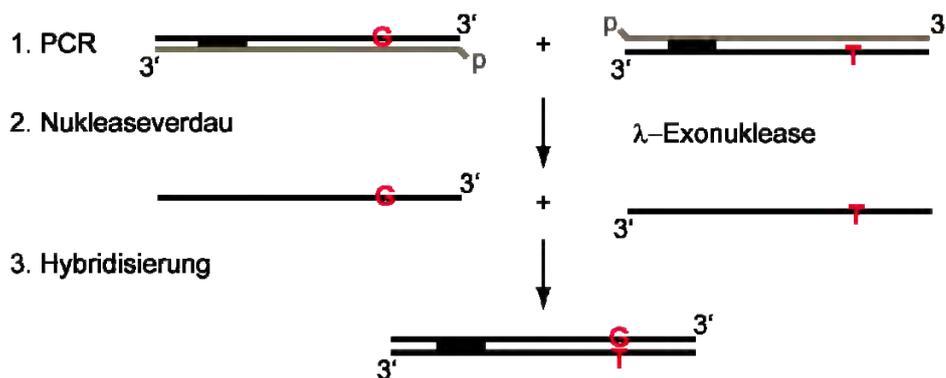


Abbildung 2-V: Lineare *mismatch*-Substratherstellung

1. Es wurden zwei PCR-Reaktionen mit den Plasmiden pET-15b-XhoI (G) und pET-15b-HindIII (T) und jeweils einen phosphorylierten und einem unphosphorylierten Primer durchgeführt. 2. Die Entfernung des phosphorylierten DNA-Stranges durch λ -Exonukleaseverdau. 3. Das Mischen von äquimolaren Mengen der beiden Einzelstränge und das Hybridisieren dieser zu doppelsträngiger *mismatch*-DNA.

Für die Herstellung von homoduplex DNA wurde das gleiche Protokoll verwendet. Allerdings diente hier das gleiche Plasmid als PCR *template*, sodass keine Basenfehlpaarungen auftreten konnten. Die homoduplex DNA diente als Kontrolle und sollte wegen des fehlenden *mismatches* keine MutS-abhängige MutH-Aktivierung aufweisen. Wenn es doch zu einer geringen MutH-Aktivierung kam, lag dies nicht an einer definierten Basenfehlpaarung sondern an Polymerasefehlern, die während der PCR auftraten⁸⁵.

Des Weiteren wurden noch kurze lineare homo- und heteroduplex Oligonukleotide (Abschnitt 2.1.7) mit einer Größe von 42 bp, 30 bp, 20 bp und 15 bp hergestellt. Für die Herstellung von G/T-*mismatch*-Oligonukleotiden wurden die Primer G-XhoI und THindIII

verwendet. Für die Herstellung von G/C homoduplex DNA wurden die Primer G-XhoI und Homo-C-XhoI verwendet (Abschnitt 2.1.6). Die Primer wurden in gleichen Mengen gemischt, für 3 min auf 95 °C erhitzt und dann durch langsames Abkühlen hybridisiert. Die hergestellten Oligonukleotide besaßen keine GATC-Erkennungssequenz und konnten daher nicht im Aktivitätsassay getestet werden.

2.3.16 Herstellung zirkulärer DNA-Substrate

Da MutS an DNA-Enden binden kann und nach der *mismatch*-Erkennung eine *sliding-clamp* ausbildet und entlang der DNA diffundiert, wurde ein Verfahren zur Herstellung (Abbildung 2-VI) von zirkulärer homo- und heteroduplex DNA entwickelt, um das Binden und Dissoziieren von MutS über DNA-Enden zu verhindern⁸⁶.

Dieses von Yu Xiao (Masterarbeit, 2008) und Caroline Jung⁸⁷ entwickelte Verfahren wurde in dieser Arbeit etwas modifiziert verwendet.

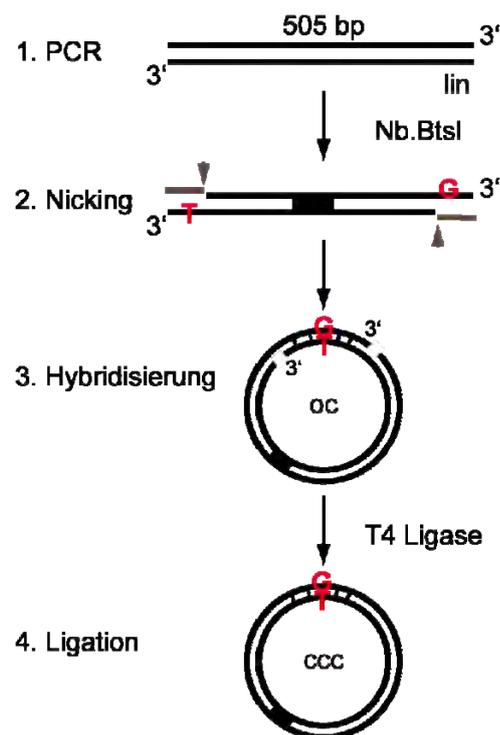


Abbildung 2-VI: Zirkuläre *mismatch*-Substratherstellung

1. Es wurde eine PCR-Reaktion mit pET-15b-HindIII Plasmid und zwei Primern, die einen nicht-komplementären Überhang haben durchgeführt. In diesem Überhang befanden sich eine *nicking-site* und das Guanin bzw. Thymidin für den *mismatch*. 2. Die Nickase Nb.BtsI brachte Einzelstrangbrüche an den *nicking-sites* ein. 3. Die Überhänge hybridisierten zur offenen zirkulären Form (oc). 4. Die Ligation der offenen zirkulären Form mit der T4 Ligase zur geschlossenen zirkulären Form (ccc). Die Nebenprodukte wurden danach mit Hilfe eines Exonuklease I und III Verdau bzw. durch Ausschneiden aus einem mit Ethidiumbromid vorgefärbten Agarosegel entfernt (Weitere Erklärungen können dem Text entnommen werden).

Im ersten Schritt zur Herstellung der DNA wurde eine PCR (Tabelle 2-XXVI und Tabelle 2-XXVII) auf das pET-15b-HindIII Plasmid durchgeführt. Die jeweiligen Primer hatten einen Nukleotidüberhang, die komplementär zu einander waren, aber nicht an das *template* binden könnten. Durch diesen Überhang war es möglich den G/T-*mismatch* einzubringen. Nach der PCR wurde das Produkt gereinigt (Abschnitt 2.3.3) und die Konzentration bestimmt (Abschnitt 2.3.6).

Tabelle 2-XXVI: PCR zur Herstellung zirkulärer DNA

<i>Konzentration</i>	<i>Komponente</i>
30 ng	<i>template</i> (HindIII bzw. XhoI Plasmide)
3 U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
0.4 μ M	Primer 1
0.4 μ M	Primer 2
0.4 mM	dNTPs
1 x	<i>Pfu</i> -Puffer

Tabelle 2-XXVII: PCR-Programm zur Herstellung zirkulärer DNA

<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit</i>	<i>Anzahl der Wiederholungen</i>
94	120 s	1 x
94	50 s	} 20 x
55	55 s	
68	60 s	
68	5 min	1 x
4	∞	1 x

Im nächsten Schritt wurde das gereinigte PCR-Produkt mit der *Nickase* Nb.BtsI gespalten (Tabelle 2-XXVIII). Die *nicking*-Sequenz wurde mit dem neun Nukleotide umfassenden Überhang des Primers eingebracht. Die Reaktion wurde für mindestens 4 h bei 37 °C inkubiert und danach noch für 20 min auf 65 °C erhitzt. Durch die anschließende Temperaturerhöhung war es möglich, das kurze, einzelsträngige DNA-Fragment abzutrennen und durch die anschließende Reinigung (Abschnitt 2.3.3) wurde ein erneutes Hybridisieren des Fragmentes verhindert.

Die komplementären 3' Überhänge lagerten sich zusammen und bildeten so die offenen Zirkel, die durch Ligation (Tabelle 2-XXIX) geschlossen wurden.

Tabelle 2-XXVIII: *Nicking* Ansatz

<i>Konzentration</i>	<i>Komponente</i>
4000 ng	PCR-Produkt
20 U	Nb.BtsI
1 μ g	BSA
1 x	NEB Puffer 4

Tabelle 2-XXIX: Ligationsansatz

<i>Konzentration</i>	<i>Komponente</i>
1000 ng	<i>Nicking</i> Produkt
4 Weiss U	T4 DNA-Ligase
0.5 mM	ATP
1 x	Ligase Puffer (Fermentas)

Nach erneuter Reinigung lag die zirkuläre DNA vor, allerdings entstehen bei der Bildung von intermolekularen DNA-Zirkeln immer Nebenprodukte. Diese wurden entweder mit Exonuklease I und Exonuklease III (Tabelle 2-XXX), für 2 h bei 37 °C und danach 20 min bei 65 °C, abgebaut oder nach der Analyse auf einem mit Ethidiumbromid vorgefärbten 2 % Agarosegel ausgeschnitten.

Tabelle 2-XXX: Exonuklease Verdau

<i>Konzentration</i>	<i>Komponente</i>
2500 ng	DNA
300 U	Exonuklease I
800 U	Exonuklease III
1 x	BSA
1 x	Puffer Rot (Fermentas)

2.3.17 *Mismatch*-abhängige MutH-Aktivierung

Dieser *in vitro* Assay ermöglicht es, gereinigte bzw. markierte MutS oder MutL Varianten auf Aktivität zu überprüfen. Außerdem lässt sich die Spaltbarkeit von neu hergestellter linearer oder zirkulärer DNA (Abbildung 2-VII) kontrollieren. Für den Aktivitätstest wurden, wenn nicht anders angegeben, MutH (2.5 µM), MutL (10 µM), ATP (5 mM) in 1fach Puffer Gelb und KCl (125 mM) sowie MutS (0.625 µM) und DNA (15 - 50 nM) ebenfalls in 1fach Puffer Gelb und in 125 mM KCl für 20 min auf Eis vorinkubiert. Danach wurde der MutL-MutH Mix für 3 min bei 37 °C erwärmt und mit dem MutS-DNA Mix im Verhältnis 1 : 5 gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach angemessenen Zeitpunkten (zwischen 1 - 30 min) wurden jeweils 10 µl Proben entnommen und mit 3 µl AAP (5fach) gestoppt und anschließend mit Proteinase K (Fermentas) für 10 min auf 37 °C inkubiert und die Proteine verdaut.

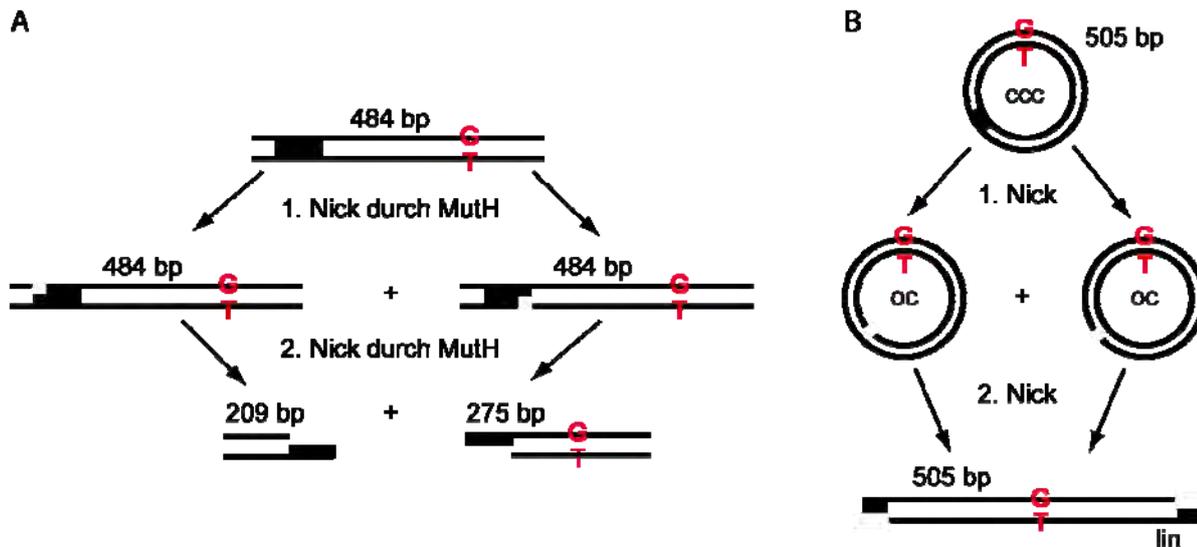


Abbildung 2-VII: DNA-Spaltung durch mismatch-abhängige MutH-Aktivierung

Dargestellt sind die beiden verschiedenen DNA-Substrate A) lineare 484 bp DNA und B) die kovalent geschlossene zirkuläre 505 bp DNA (ccc) mit GATC-Erkennungssequenz (schwarzes Rechteck) und mit dem G/T-mismatch in Rot. A) Analysiert man die MutH-abhängige Spaltung der linearen DNA auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel erhält man zwei Spaltfragmente mit einer Länge von 209 bp und 275 bp, sowie die nicht gespaltene, lineare DNA. B) Die zirkuläre DNA wurde über ein mit Ethidiumbromid vorgefärbten 2 %igen Agarosegel analysiert, wobei man den ersten *nicking* Schritt als offenen Zirkel (oc) erkennt und das zweifach gespaltene Fragment als 505 bp lineare DNA (lin) vorliegt. ccc: kovalent geschlossene, zirkuläre DNA; oc: offene zirkuläre DNA; lin: lineare DNA

Die Endonuklease MutH spaltet an der GATC-Erkennungssequenz, nachdem MutS die Basenfehlpaarung erkannt und MutL aktiviert hat. Die entstandenen Spaltprodukte für die lineare 484 bp lange DNA betragen 209 bp und 275 bp sowie die 484 bp nicht gespaltene DNA. Diese wurden über ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Bandenintensitäten über das Auswertungsprogramm TotalLab v2.01 bestimmt. Die entstandenen Spaltprodukte (oc und lin) der zirkulären 505 bp DNA wurden auf einem mit Ethidiumbromid vorgefärbten 2 % Agarosegel analysiert und die Bandenintensitäten ebenfalls über TotalLab v2.01 bestimmt. Die Endkonzentrationen für die im Aktivitätstest eingesetzten Komponenten sind in Tabelle 2-XXXI zusammengefasst.

Tabelle 2-XXXI: Endkonzentrationen im *in vitro* Assay

<i>Konzentration</i>	<i>Komponente</i>
2 μ M (1.4 μ g)	MutL
0.5 μ M (0.15 μ)	MutH
0.5 μ M (0.5 μ g)	MutS
10 – 25 nM	DNA
1 mM	ATP
125 mM	KCl
1 x	Puffer Gelb

3 Ergebnisse

Die Struktur des ternären Komplexes MutS-MutL-DNA, ein Schlüsselintermediat im *mismatch*-Reparatursystem, konnte bisher nicht gelöst werden. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser dynamische Komplex charakterisiert werden. Hierzu wurden zwei komplementäre Ansätze verwendet: Crosslinkexperimente und auf Fluoreszenz basierende biophysikalische Verfahren.

3.1 Photo- und thiol-spezifischer Crosslink zwischen MutS und MutL

Die Interaktion zwischen MutS und MutL sollte über thiol-spezifische Crosslinkexperimente untersucht werden, wobei es durch das Crosslinken möglich ist, den Bereich für die Interaktion einzuschränken. Dafür wurden bekannte Bedingungen gewählt, unter denen a) MutS und MutL interagieren¹ und b) spezifische Interaktionen zwischen MutL und MutH in vorausgegangenen Studien zu beobachten waren⁵⁵.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich ein Photocrosslink (Benzophenonmaleimid, BPM) zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} markiert mit Benzophenon ausbilden kann (Abbildung 3-I). Dieser Photocrosslink war nur in Anwesenheit von ATP und DNA zu beobachten, Bedingungen, die notwendig sind für die Ausbildung eines MutS-MutL-Komplexes⁸⁸. In den Versuchen wurde immer wenn nicht anders angegeben MutS vollständiger Länge eingesetzt. In allen Experimenten mit der MutL^{N131C} Variante wurde entweder das vollständige Protein oder nur die N-terminale Domäne (LN40) verwendet.

Der Photocrosslinker (BPM) wurde zuerst an den Cysteinrest (Cys)-131 im MutL^{N131C} gekoppelt und im Anschluss mit MutS^{WT} inkubiert. Durch UV-Lichtbestrahlung ($\lambda = 356 \text{ nm}$) wurde der Photocrosslinker aktiviert und mit naheliegenden, reaktiven Gruppen verbunden. In der Probe für Spur 1 (Abbildung 3-I) wurde kein Photocrosslinker dazugegeben, und es wurde nur MutS, DNA und MutL (Banden von oben nach unten) aufgetrennt. In der Spur 2 (mit Photocrosslinker) wurden zwei weitere Banden sichtbar, die MutS-MutL-Crosslinks. Der Photocrosslinker konnte zwei verschiedene, in der Nähe liegende Gruppen crosslinken, die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden konnten. Da es sich dabei nicht um einen MutL-MutL-Crosslink handelte, wurde in der Spur 5 deutlich, denn in Abwesenheit von MutS war keine Crosslinkbande sichtbar. Auch ohne MutL waren keine Crosslinkbanden zu beobachten.

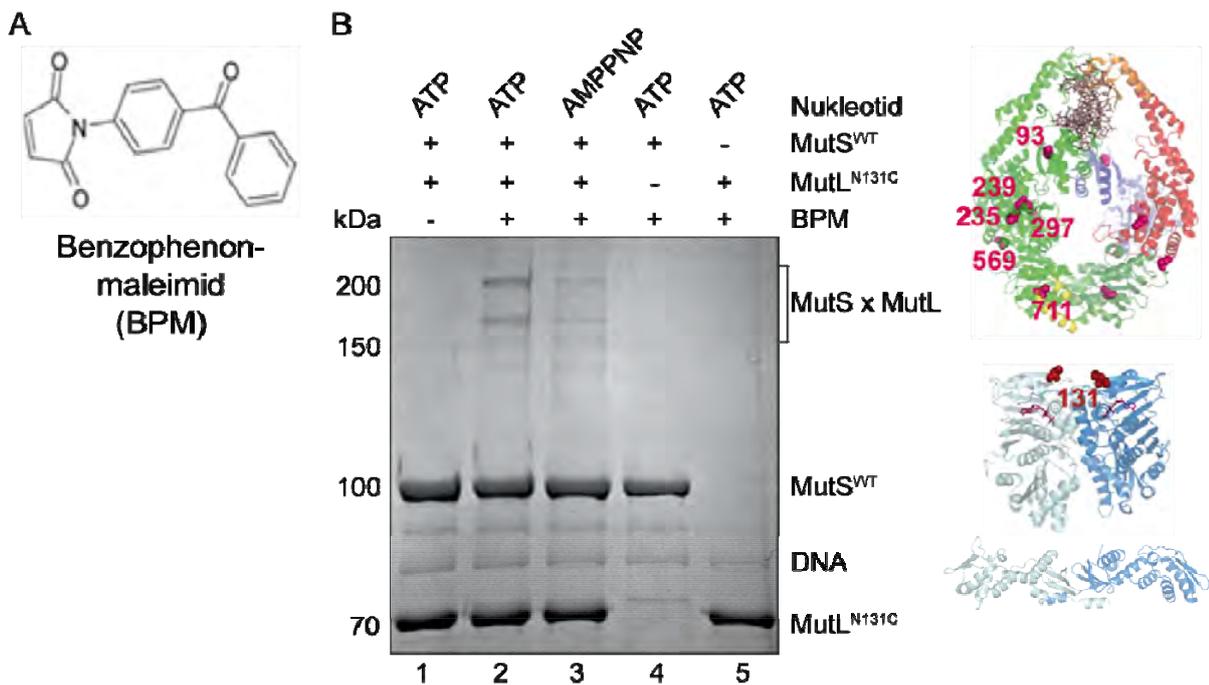


Abbildung 3-I: Photocrosslink zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C}

A) Struktur des verwendeten Photocrosslinkers Benzophenonmaleimid (BPM). B) In den Ansätzen wurden 400 nM MutS^{WT}, 1 μ M MutL^{N131C} mit 1 mM ATP, 150 mM KCl und 1 x Bindungspuffer Grün unter UV-Licht gecrosslinkt (Abschnitt 2.3.13). In Spur 1 wurden MutS^{WT} und MutL^{N131C} ohne Photocrosslinker, aber mit ATP und DNA inkubiert. Die Spur 2 zeigt die Crosslinkreaktion in Anwesenheit von ATP, DNA und Photocrosslinker. In der Spur 3 wurde ATP durch AMPPNP ersetzt und in den Spuren 4 und 5 wurde in Abwesenheit von MutL bzw. MutS gecrosslinkt. Auf der rechten Seite oben ist die Kristallstruktur von MutS (pdb 1e3m) mit den sechs, endogenen Cysteinresten in Pink und die Ketten A und B in Grün bzw. in den einzelnen Domänen (Farbcode nach Lamers, 2000)¹⁹ dargestellt. Darunter ist die Kristallstruktur von MutL (pdb 1b63 (NTD) und 1x9z (CTD)) mit den beiden Ketten in Blau und Hellblau und dem zu einem Cystein ausgetauschten Asparagin an der Stelle 131 in Rot dargestellt. Außerdem sind in den beiden Monomeren die gebundenen AMPPNP in Pink gezeigt. Analysiert wurden die Proben über 6 % SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der Cys-131 in MutL^{N131C} in der Lage ist, zu einem der sechs endogenen Cysteinreste im MutS^{WT} einen chemischen Crosslink auszubilden. Dafür wurde vorwiegend mit den thiol-spezifischen Maleimid-Crosslinkern, BM[PEO]₃ und BMOE (Tabelle 2-XXII), gearbeitet. In der Tat war es möglich, unter den bereits für den Photocrosslink gewählten Bedingungen (ATP und DNA) auch einen thiol-spezifischen Crosslink zu erhalten (Abbildung 3-II). In Spur 1 wurde der vollständigen Crosslinkansatz in Anwesenheit von BM[PEO]₃ aufgetrennt. Hier sind drei Banden zu erkennen, die Bande mit der höchsten elektrophoretischen Mobilität entspricht dem MutL Monomer mit einem Molekulargewicht von circa 70 kDa. Die Bande, die direkt oberhalb der MutL Bande zu erkennen ist, ist die DNA, die mit kolloidalem Coomassie angefärbt werden kann. Die Bande mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität ist das MutS Monomer bei etwa 100 kDa. Wurde nun zu dem Ansatz der Crosslinker (BM[PEO]₃) dazugegeben (Spur 2), traten drei weitere Banden mit deutlich geringerer elektrophoretischer Mobilität auf. Diese Banden

stellten die gecrosslinkten Proteine mit einem Molekulargewicht von rund 150 kDa für den MutL-MutL-Crosslink und einem Molekulargewicht von 200 kDa für den MutS-MutS-Crosslink dar. Der MutS-MutL-Crosslink zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} lag zwischen den beiden Banden bei etwa 170 kDa mit einer Crosslinkausbeute von rund 28 %. Bei späteren Experimenten wurde aber deutlich, dass die elektrophoretische Mobilität abhängig von der Lage der Cysteinreste in MutS und MutL war (Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.3). Der MutS-MutL-Crosslink trat nur in Anwesenheit von ATP und DNA auf. In der Spur 3, ohne DNA, und in der Spur 4, mit ADP anstelle von ATP, konnte in beiden Fällen ein MutL-MutL-Crosslink beobachtet werden, aber weder der MutS-MutS-Crosslink noch der MutS-MutL-Crosslink wurden gebildet.

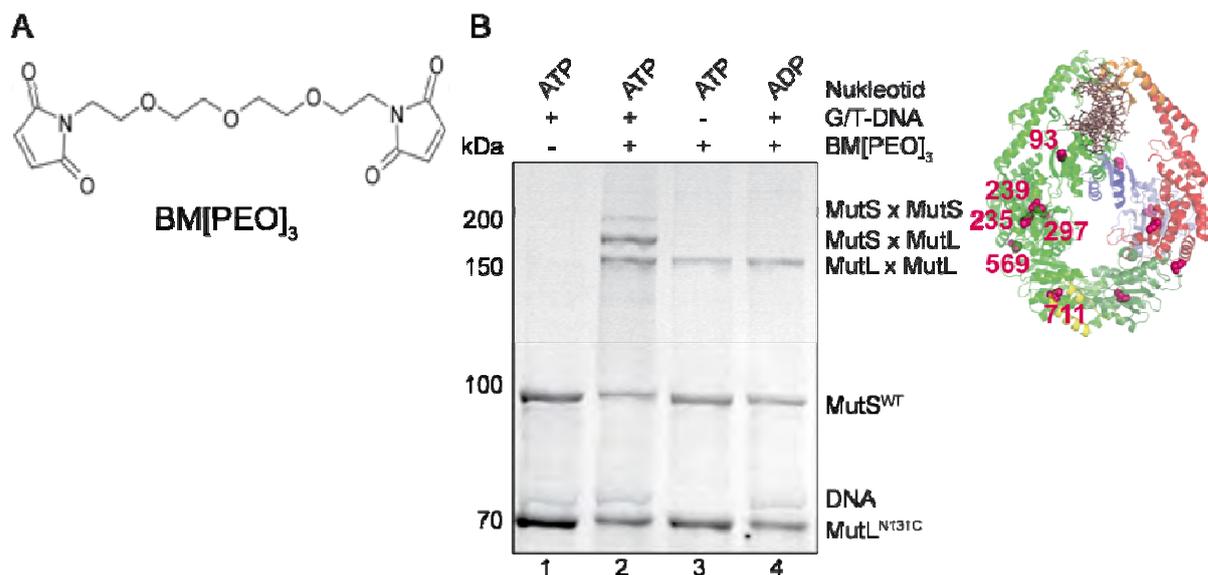


Abbildung 3-II: ATP- und DNA-abhängiger thiol-spezifischer MutS-MutL-Crosslink

A) Darstellung der Struktur des Maleimid-Crosslinkers BM[PEO]₃. B) In den Ansätzen wurden 400 nM MutS^{WT}, 1 μM MutL^{N131C} mit 1 mM Nukleotid, 125 mM KCl und 1 x Bindungspuffer Grün gecrosslinkt. In der Spur 1 wurden MutS^{WT} und MutL^{N131C} in Abwesenheit von Crosslinker, aber in Anwesenheit von ATP und DNA inkubiert. Die Spur 2 zeigt die Reaktion mit Crosslinker in Anwesenheit von ATP und DNA. Die Spuren 3 und 4 zeigen die Kontrollen, in Abwesenheit von DNA (Spur 3) und in Gegenwart von ADP an Stelle von ATP (Spur 4). Die MutS Kristallstruktur (pdb 1e3m) mit den sechs endogenen Cysteinresten ist oben rechts dargestellt. Analysiert über ein 6 % SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

Für die Optimierung der Crosslinkreaktion für eine maximale Crosslinkausbeute wurden die Konzentrationen von MutS, MutL, DNA und Crosslinker sowie die Crosslinkzeit und die Crosslinktemperatur variiert (siehe Diplomarbeit, 2006). Dabei zeigte sich, dass die maximale Crosslinkausbeute zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} mit 400 nM MutS, 1 μM MutL, 100 nM 484 bp DNA und 50 μM Crosslinker bei einer Crosslinktemperatur von 37 °C für 2 min erzielt wurde. Unter diesen Bedingungen zeigt der MutS-MutL-Crosslink eine ATP- bzw. AMPPNP- (ein nicht hydrolysierbares ATP Analogon) und DNA-Abhängigkeit und hat eine

maximale Crosslinkausbeute von 30 - 40 %. Man erhielt die gleiche Crosslinkausbeute mit den 10 Å kürzeren BMOE Crosslinker und mit den MTS (Methanthiosulfonat)-Crosslinkern (Abbildung 3-III). Überraschenderweise war es möglich, einen MutS-MutL-Crosslink mit dem Nukleotid AMPPNP zu erhalten, obwohl MutS in Gegenwart von AMPPNP nicht an die DNA binden kann^{72; 89}. Dies war jedoch möglich, da MutS zuvor ohne AMPPNP mit der DNA inkubiert wurde. Das AMPPNP wurde erst mit MutL in die Crosslinkreaktion gebracht, zu diesem Zeitpunkt hatte sich der MutS-DNA-Komplex bereits gebildet (Abschnitt 2.3.13).

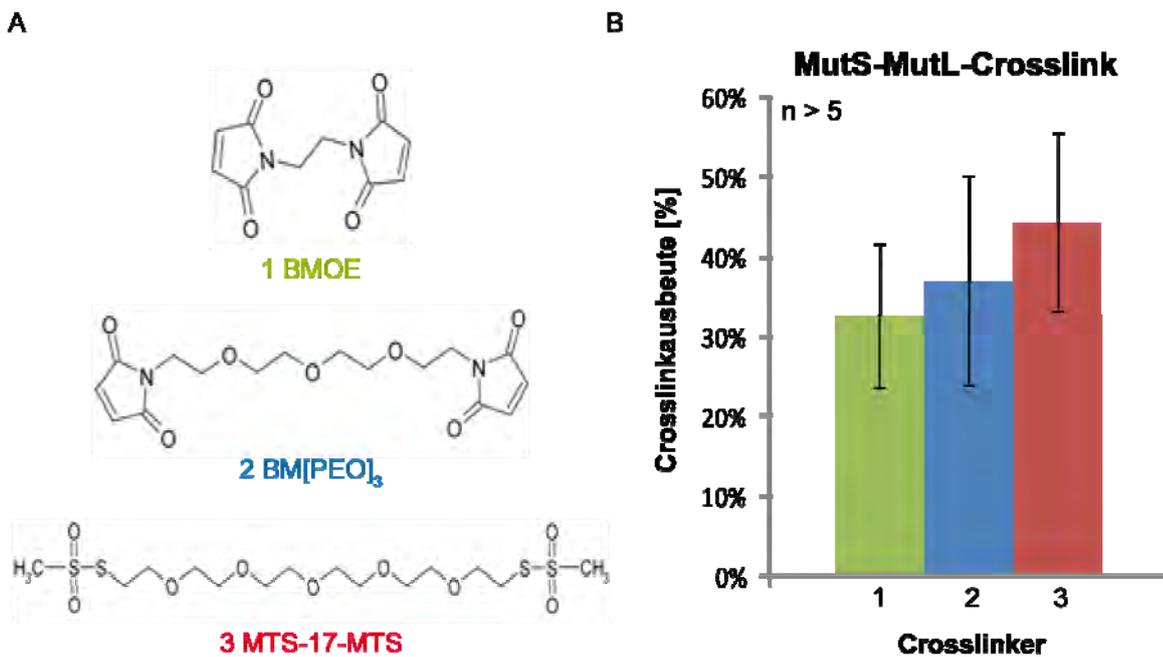


Abbildung 3-III: Crosslinkausbeute ist unabhängig von der Crosslinkerlänge und Crosslinkchemie

A) Die Darstellung der Strukturen der drei verschiedenen Crosslinker. Die Maleimid-Crosslinker BMOE mit 8 Å und BM[PEO]₃ mit 18 Å und der Methanthiosulfonat-Crosslinker MTS-17-MTS mit 24 Å. B) Darstellung der Crosslinkausbeute (± Standardabweichung) zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} in Anwesenheit von 1 mM ATP und 100 nM 484 bp langer heteroduplex DNA mit der gleichen Crosslinkchemie (Maleimid), aber unterschiedlichen Crosslinkerlängen (1 und 2) sowie unterschiedlicher thiol-spezifischer Chemie, aber ähnlichen Längen ~20 Å (2 und 3). Die Crosslinkausbeute wurde, wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben, bestimmt. Es wurden mindestens 5 unabhängige Versuche ausgewertet.

Im Rahmen der Optimierung wurden auch Oligonukleotide (Tabelle 2-X) mit einer Länge zwischen 15 bp und 30 bp verwendet, jedoch nahm die Crosslinkausbeute mit der verringerten DNA-Länge deutlich ab (siehe Anhang Abbildung 7-I).

Des Weiteren konnte mit geringeren Proteinkonzentrationen eine *mismatch*-Abhängigkeit des MutS-MutL-Crosslinks beobachtet werden (Abbildung 3-IV). In der Spur 1 ist die höchste Crosslinkausbeute von 27 % mit *mismatch*-DNA zu erkennen, allerdings zeigte sich auch mit homoduplex DNA ein MutS-MutL-Crosslink, wenn auch mit geringerer Ausbeute von 15 % (Spur 2).

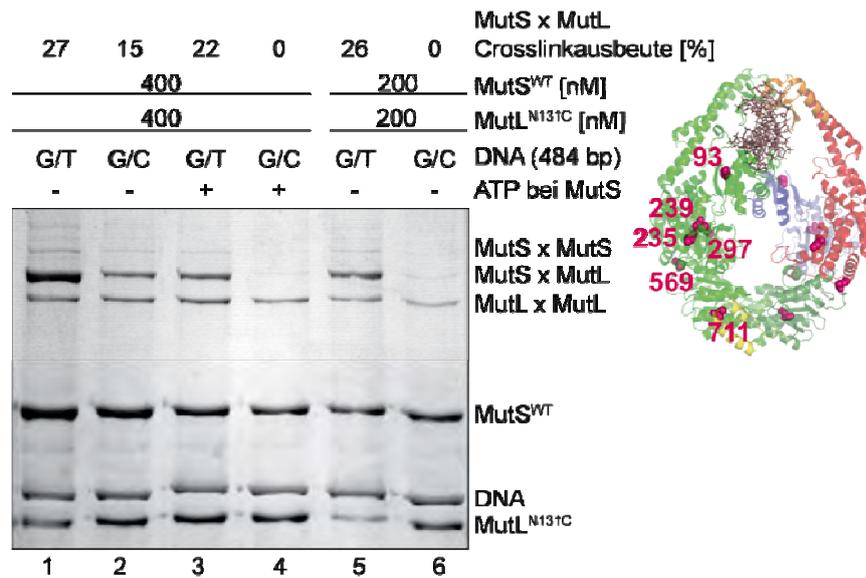


Abbildung 3-IV: Mismatch-Abhängigkeit des MutS-MutL-Crosslinks

Die Spuren 1 – 4 zeigen die Ansätze mit 400 nM MutS^{WT} und 400 nM MutL^{N131C}, wobei in den Spuren 1 und 2 kein zusätzliches ATP zur MutS und DNA Vorinkubation gegeben wurde. In den Spuren 3 und 4 wurde zusätzlich 1 mM ATP zur bereits vorhandenen Nukleotidkonzentration in der MutL Vorinkubation auch zu MutS^{WT} gegeben. In den Spuren 5 und 6 wurden jeweils 200 nM MutS^{WT} und 200 nM MutL^{N131C} eingesetzt in Abwesenheit von zusätzlichem ATP. Analysiert wurden die Proben auf einem 6%igen SDS-Gel mit Coomassie-Färbung.

Wurde MutS in Anwesenheit von ATP mit der DNA inkubiert und dann gecrosslinkt, konnte die Bindung von MutS an die homoduplex DNA verhindert werden (Spuren 3 und 4). Dasselbe Ergebnis konnte erreicht werden, wenn die Proteinkonzentrationen von MutS und MutL von 400 nM auf 200 nM verringert wurden (Spuren 5 und 6). Die DNA-Konzentration blieb mit 50 nM konstant. Durch geringere Proteinkonzentrationen von MutL (400 nM) oder durch die Inkubation von MutS mit der DNA in Anwesenheit von Nukleotid sowie mit 505 bp zirkulärer DNA kann die Spezifität des MutS-MutL-Crosslinks gesteigert werden.

Um hohe Crosslinkausbeuten zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} zu erhalten, wurden 484 bp lange, lineare DNA und ATP oder AMPPNP benötigt.

3.2 Bestimmung der Crosslinkposition in MutS^{WT}

MutS^{WT} enthält sechs, endogene Cysteinreste (siehe Abbildung 3-V). Es stellte sich daher die Frage, welche(r) der endogenen Cysteinreste (Abbildung 3-V) an der Crosslinkreaktion mit MutL^{N131C} beteiligt ist.

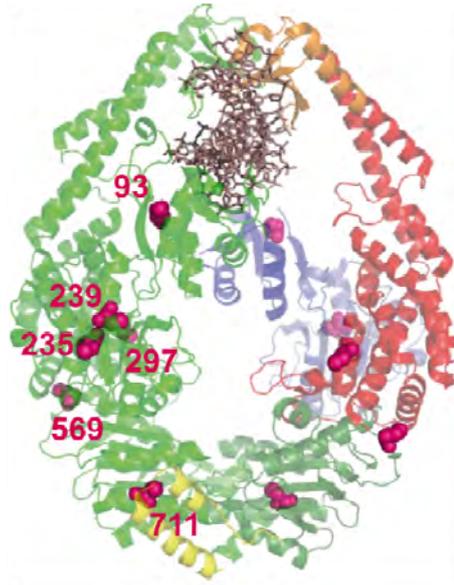


Abbildung 3-V: Darstellung der endogenen Cysteinreste in MutS

Die Kette A des Homodimers wurde in Grün, die Kette B in den einzelnen Domänen (Farbcode nach Lamers, 2000)¹⁹ und die sechs endogenen Cysteinreste als Kalotten in Pink dargestellt. Die DNA ist im Stäbchenmodell in Violett gezeigt. Erstellt in PyMol (pdb 1e3m).

Zur Klärung dieser Frage wurden MutS Varianten mit unterschiedlicher Anzahl an endogenen Cysteinresten gecrosslinkt (Tabelle 3-I)³⁹. Es zeigte sich, dass alle Varianten, die einen Cysteinrest an der Position 93 enthielten, einen MutS-MutL-Crosslink zu MutL^{N131C} ausbilden konnten (Tabelle 3-I). Die SC-MutS Varianten zeigten im *in vivo* Assay keinen Mutatorphänotyp (Tabelle 3-I) und bei der *mismatch*- und MutS-abhängigen MutH-Aktivierung (*in vitro* Assay) keinen Unterschied im Vergleich zur cysteinfreien MutS Variante (Tabelle 3-I).

Tabelle 3-I: In vivo und in vitro Aktivität der MutS Varianten mit nativen Cysteinresten

Verwendete MutS Varianten ^{a)}	Crosslink zu ^{b)} SC-MutL ^{N131C}	In vivo Aktivität		In vitro ^{e)}	Referenz
		Median ^{c)}	Bereich ^{d)}		
pET-15b Plasmid (<i>mutS</i> ⁻)	n.b.	200	100-420	-	90
MutS ^{WT} (6 Cysteine)	xxx	1	0-15	+	90
MutS ^{93C/235C/239C/297C/711C}	xxx	3	0-11	+	39
MutS ^{93C/239C/569C/711C}	xxx	4	1-13	+	39
MutS ^{93C/239C/297C}	xxx	n. b.	n. b.	+	39
MutS ^{93C/239C/711C}	xxx	3	1-20	+	39
MutS ^{93C}	xxx	3	0-6	+	diese Arbeit
MutS ^{239C}	x	4	1-8	+	diese Arbeit
MutS ^{297C}	-	2	1-4	+	39
MutS ^{569C}	-	1	0-3	+	39
MutS ^{711C}	-	5	1-18	+	39

a) Die *E. coli* TX2929 (*mutS*⁻) Zellen wurden mit dem pET-15b Plasmid (negativ Kontrolle), dem MutS^{WT} Plasmid (positiv Kontrolle) oder dem Plasmid der neuen, veränderten MutS Varianten transformiert (Abschnitt 2.3.10). WT: Wildtyp

b) Die Crosslinkausbeute wurde über das Programm TotalLab v2.01 (Abschnitt 2.3.11) bestimmt.

n. b.: nicht bestimmt; x: 10 - 20 % Crosslink; xxx: ≥ 30 % Crosslink; -: kein Crosslink

c) Bestimmter Medianwert der rifampicinresistenten Klone, diese Resistenz entsteht durch spontane Mutationen im *rpoB* Gen. Zellen ohne funktionierendes *mutS* Gen weisen eine höhere Mutationsrate auf. Es wurden mindestens fünf unabhängige Kulturen untersucht.

d) Minimale und maximale Anzahl der gewachsenen rifampicinresistenten Klone.

e) Getestet über die *mismatch*- und MutS-abhängige MutH-Aktivierung (Abschnitt 2.3.17).

In Abbildung 3-VI ist vergleichend die DNA- und Nukleotidabhängigkeit von MutS^{WT} (Spuren 1 - 5) und MutS^{93C} (Spuren 6 - 9) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass immer nur in Anwesenheit von ATP bzw. AMPPNP und DNA ein MutS-MutL-Crosslink auftrat (Spuren 1, 3, 6 und 8). Wurde kein zusätzliches Nukleotid hinzugegeben, ist nur der MutL-MutL-Crosslink zu erkennen (Spur 4). In Gegenwart von ADP (Spuren 2 und 7) ist nur ein geringer Anteil an MutS-MutL-Crosslink bei beiden MutS Varianten zu sehen, der bei MutS^{93C} etwas höher ist als bei MutS^{WT}. Auch ohne DNA lässt sich ein schwacher MutS-MutL-Crosslink bei MutS^{93C} (Spur 9) erkennen, beim Wildtyp ist nur der MutL-MutL-Crosslink zu sehen (Spur 5). Diese geringe Crosslinkausbeute (~ 10 %) ist wahrscheinlich unspezifisch und nur aufgrund der hohen Reaktivität der Maleimid-Crosslinker möglich. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass MutS und MutL auch einen, wenn auch weniger stabilen, Komplex in Abwesenheit von DNA ausbilden (siehe Diskussion)^{2; 91}. Des Weiteren ist in allen Spuren zu beobachten, dass die MutL-MutL-Crosslinkausbeute deutlich steigt, wenn kein MutS-MutL-Crosslink auftritt. Anscheinend stehen die beiden Crosslinkreaktionen (MutS-MutL und MutL-MutL) in Konkurrenz zueinander, wobei der MutS-MutL-Crosslink bevorzugt wird, wenn die Bedingungen gegeben sind, die die MutS-MutL-Komplexbildung begünstigen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Crosslinkreaktion zwischen MutS und MutL die physiologisch relevante Komplexbildung „einfängt“.

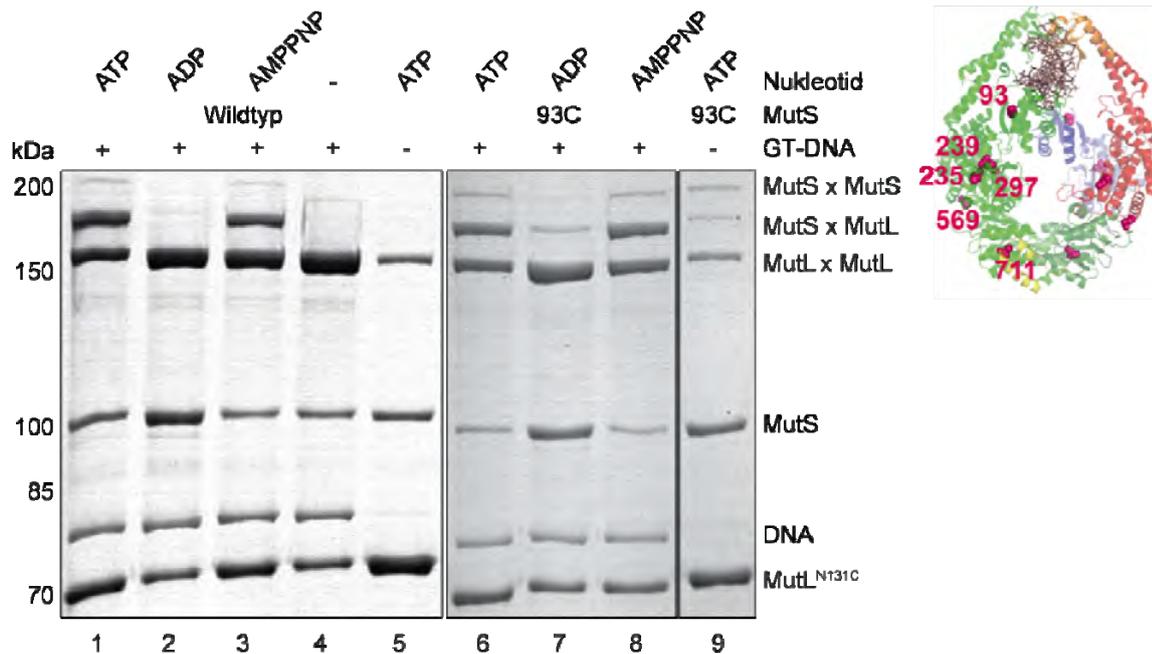


Abbildung 3-VI: Nukleotid- und DNA-Abhängigkeit des MutS-MutL-Crosslinks

Es wurde 400 nM MutS^{WT} (Spuren 1 - 5) bzw. MutS^{93C} (Spuren 6 - 9) mit 1 μ M MutL^{N131C} unter verschiedenen Bedingungen gecrosslinkt. In den Spuren 1 und 6 wurden die Ansätze mit ATP aufgetragen. Die Spuren 2 und 7 zeigen die Crosslinkausbeute der beiden MutS Varianten in Anwesenheit von ADP. Die Spuren 3 und 8 zeigen die Crosslinkreaktion mit dem ATP Analogen AMPPNP. In Spur 4 wurde MutS^{WT} in Abwesenheit des Nukleotids getestet und in den Spuren 5 und 9 wurde die DNA weggelassen. Analysiert über 6 % SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

Mit der Untersuchung der Variante MutS^{93C} konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Cys-93 in der *mismatch*-Bindungsdomäne der reaktive Rest in MutS^{WT} ist, der im MutS-MutL-DNA Komplex zum Cys-131 im MutL^{N131C} Protein einen thiol-spezifischen Crosslink ausbildet. Außerdem zeigen beide MutS-MutL-Crosslinkprodukte die gleiche elektrophoretische Mobilität in einem 6 %igen SDS-Gel, was daraufhin weist, dass es sich in beiden Varianten um denselben reaktiven Cysteinrest handelt (Abbildung 3-VI). Die elektrophoretische Mobilität in einer denaturierenden Gelelektrophorese ist nämlich von der Position der Crosslinks in den Polypeptidketten (MutS und/oder MutL, siehe auch Abbildung 3-IX) abhängig; je weiter diese Position in der Kette liegt, desto langsamer ist die beobachtete elektrophoretische Mobilität.

Da das Cys-93 nur wenig lösungsmittel exponiert ist, wurden weitere Varianten getestet, die einen lösungsmittel exponierten Cysteinrest in der *mismatch*-Bindungsdomäne enthalten: Positionen 8, 78 oder 103. Alle Varianten waren in der Lage, einen MutS-MutL-Crosslink zu formen, wobei die Crosslinkausbeute nicht immer gleich hoch war (zwischen 22 % (Cys-78) und 45 % Cys-93), aber immer DNA- und ATP- bzw. AMPPNP-abhängig.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass Cys-93 die reaktive Thiolgruppe im MutS^{WT} enthält, dass der MutS-MutL-Crosslinks zur *mismatch*-Bindungsdomäne von MutS ATP, aber nicht ATP-Hydrolyse (AMPPNP) abhängig ist, und dass DNA einer bestimmten Mindestlänge von > 100 bp benötigt wird.

3.3 MutL^{N131C} crosslinkt zu Cys-246 in der *connector*-Domäne von MutS

Um die Interaktionsstelle der beiden Proteine noch stärker einzugrenzen, wurden weitere Crosslinkexperimente mit einer Reihe von Einzylcysteinvarianten (SC) (Abbildung 3-VII) von MutS zu MutL^{N131C} gecrosslinkt.

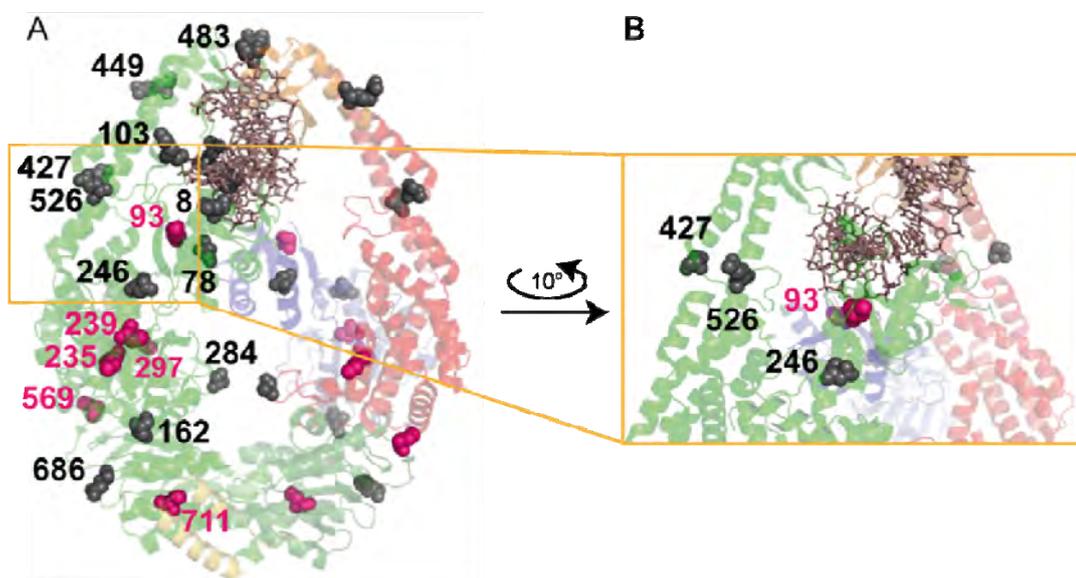


Abbildung 3-VII: Zu Cysteinresten veränderte Aminosäurereste in SC-MutS

Darstellung der Kristallstruktur des MutS Dimers (pdb 1e3m). Die Kette A ist in Grün und der Kette B in den einzelnen Domänen (Farbcode nach Lamers, 2000)¹⁹ dargestellt. Die grauen Kalotten stellen die über zielgerichtete Mutagenese veränderten Aminosäurereste dar. In Pink sind die endogenen Cysteinreste gezeigt. In A) ist das vollständige Protein dargestellt und in B) wurde der Übergang zwischen *connector*-Domäne und *clamp*-Domäne (gelber Rahmen in A)) vergrößert und für eine bessere Darstellung der Cysteinreste um 10° gedreht.

Zusätzlich zu bereits vorhandenen MutS-Varianten wurden noch drei weitere kloniert (Tabelle 2-XXI), um in allen sieben Domänen von MutS einen Cysteinrest an einer für die Crosslink- und Modifikationsexperimente strategisch günstigen Position zu haben: Cys-246 befindet sich in der *connector*-Domäne. Die beiden anderen Cysteinreste, Cys-427 und Cys-526, liegen in der *core/levers*-Domäne direkt am Übergang zur *connector*-Domäne. Diese Varianten wurden erzeugt, da für diesen Bereich keine Einzylcysteinvarianten vorlagen.

Die verwendeten MutS Einzelsysteinevarianten waren im *in vivo* (Abschnitt 2.3.8) und *in vitro* Aktivitätstest (Tabelle 3-II) vergleichbar zu MutS^{WT} und waren daher für die nachfolgenden Experimente geeignet.

Tabelle 3-II: *In vivo* und *in vitro* Aktivität der verwendeten MutS Varianten

<i>MutS Variante</i> ^{a)}	<i>In vivo</i> Aktivität		<i>In vitro</i> Aktivität	Referenz
	Median ^{b)}	Bereich ^{c)}		
Vektor (<i>mutS</i> ⁻)	200	100-420	-	90
MutS ^{WT}	1	0-15	+	90
MutS ^{CF}	2	0-5	+	39
MutS ^{D8C}	3	n. b.	+	92
MutS ^{N78C}	1	0-3	+	92
MutS ^{93C}	3	0-6	+	diese Arbeit
MutS ^{93C/239C}	4	2-9	+	diese Arbeit
MutS ^{93C/239C/D835R}	8	2-18	+	diese Arbeit
MutS ^{93C/239C/297C}	n. b.	n. b.	+	92
MutS ^{93C/239C/711C}	n. b.	n. b.	+	92
MutS ^{K103C}	1	n. b.	+	92
MutS ^{D162C}	1	0-17	+	82
MutS ^{239C}	4	1-8	+	diese Arbeit
MutS ^{D246C}	3	3-13	+	diese Arbeit
MutS ^{D246C/D835R}	5	3-18	+	diese Arbeit
MutS ^{A284C}	0	0-6	+	92
MutS ^{297C}	2	1-4	+	92
MutS ^{R449C}	1	0-20	+	82
MutS ^{R449C/D835R}	15	4-18	+	72
MutS ^{S427C}	2	0-8	+	diese Arbeit
MutS ^{H483C}	1	0-1	+	92
MutS ^{Q526C}	3	0-3	+	diese Arbeit
MutS ^{569C}	1	0-3	+	92
MutS ^{E686C}	1	0-9	+	92
MutS ^{711C}	5	1-18	+	92

a) Die *E. coli* TX2929 (*mutS*⁻) Zellen wurden mit dem pET-15b Plasmid (negativ Kontrolle), dem MutS^{WT} Plasmid (positiv Kontrolle) oder den neuen, veränderten MutS Varianten transformiert (Abschnitt 2.3.8). WT: Wildtyp; CF: cysteinfrei

b) Medianwert der rifampicinresistenten Klone, diese Resistenz entsteht durch spontane Mutationen im *rpoB* Gen. Zellen ohne funktionelles *mutS* Gen weisen eine höhere Mutationsrate auf. Es wurden jeweils mindestens fünf unabhängige Kulturen untersucht.

c) Minimale und maximale Anzahl der gewachsenen rifampicinresistenten Klone.

Durch das systematische Crosslinken verschiedener MutS Varianten zum Cys-131 in MutL^{N131C} konnte der mögliche Bereich für die Interaktionsstelle von MutL auf MutS deutlich eingeschränkt werden. Viele der SC-MutS Varianten, wie MutS^{D162C}, MutS^{239C}, MutS^{297C}, MutS^{569C} oder MutS^{711C}, konnten nicht oder nur wenig mit der MutL^{N131C} Variante gecrosslinkt werden (Abbildung 3-VIII).

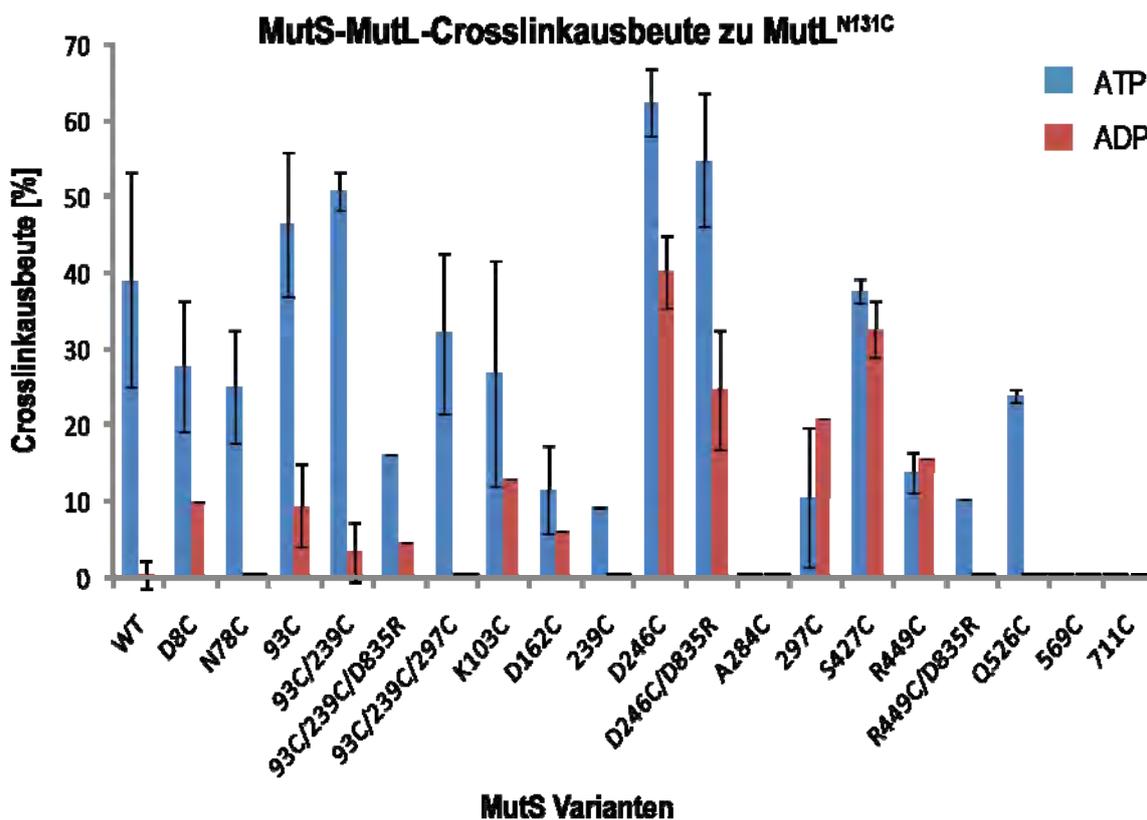


Abbildung 3-VIII: Ausbeute der Crosslinkreaktion zwischen SC-MutS zum Cys-131 von MutL^{N131C}

In der Abbildung sind die Crosslinkausbeuten der verschiedenen SC-MutS Varianten zu MutL^{N131C} in Anwesenheit von ATP (Blau) oder ADP (Rot) dargestellt. Die Bandenintensitäten der einzelnen Proteine und der gecrosslinkten Proteine wurden mittels des Programms TotalLab v2.01 bestimmt, und über die ermittelten Intensitäten wurden, wie im Abschnitt 2.3.13, die Crosslinkausbeute ausgerechnet und in Prozent angegeben.

Cys-246 wies mit MutL^{N131C} die höchste Crosslinkausbeute aller getesteten SC-MutS Varianten mit rund 50 % auf. Auch die anderen beiden SC-MutS Varianten mit den Cysteinresten an den Positionen 427 und 526 zeigten einen MutS-MutL-Crosslink. Diese gecrosslinkten MutS-MutL-Komplexe waren nukleotidabhängig (ATP oder AMPPNP oder ADP) und DNA-abhängig. Auch bei diesen Experimenten fiel ein Unterschied in der Crosslinkausbeute mit den einzelnen Nukleotiden auf (Abbildung 3-IX).

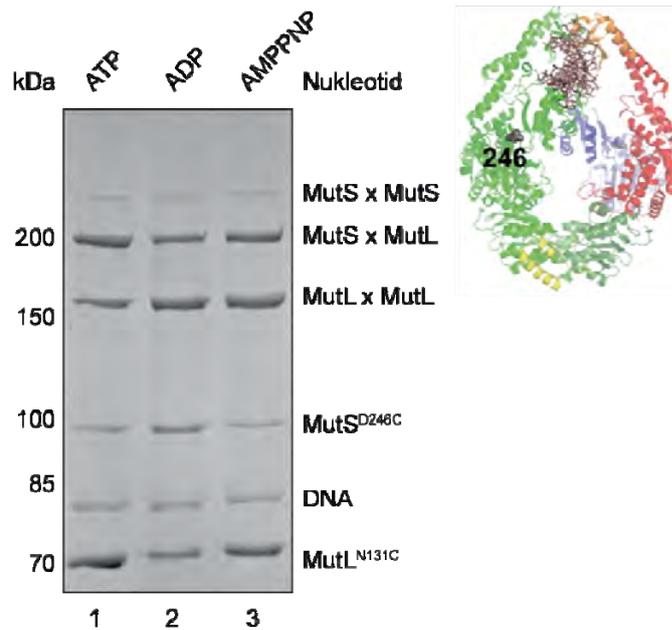


Abbildung 3-IX: Crosslink zwischen MutS^{D246C} und MutL^{N131C}

Es wurde die MutS-MutL-Crosslinkausbeute mit ATP (Spur 1), ADP (Spur 2) und AMPPNP (Spur 3) getestet. Dabei wurden 400 nM MutS, 1 μ M MutL^{N131C}, 1 mM Nukleotid, 100 nM lineare 484 bp DNA, 150 mM KCl und 1 x Bindungspuffer Grün verwendet. Analysiert wurden die Proben auf einem 6 %igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

Vergleicht man die Crosslinkgeschwindigkeit mit Hilfe einer Crosslinkkinetik (Abbildung 3-X) zwischen einem Cysteinrest in der *mismatch*-Bindungsdomäne (MutS^{93C}) und dem Rest in der *connector*-Domäne (MutS^{D246C}), wird deutlich, dass in Anwesenheit von ATP schon nach 10 - 20 s Crosslinkzeit (Spuren 1 – 6) die maximale Crosslinkausbeute bei Cys-246 erreicht wurde (Abbildung 3-X A). Im Gegensatz dazu benötigte die Kinetik mit dem Cysteinrest in der *mismatch*-Bindungsdomäne (Abbildung 3-X B) 90 s, um die maximale Ausbeute zu erreichen. In Anwesenheit von ADP (Abbildung 3-X B, Spuren 7 - 11) wurde der MutS-MutL-Komplex mit dem Cys-246 ähnlich schnell gebildet, die Ausbeute war allerdings geringer als mit ATP. Der Cysteinrest in der *mismatch*-Bindungsdomäne bildete, wie bereits zuvor gezeigt (Abbildung 3-II), keinen MutS-MutL-Crosslink in Anwesenheit von ADP aus (Abbildung 3-X A).

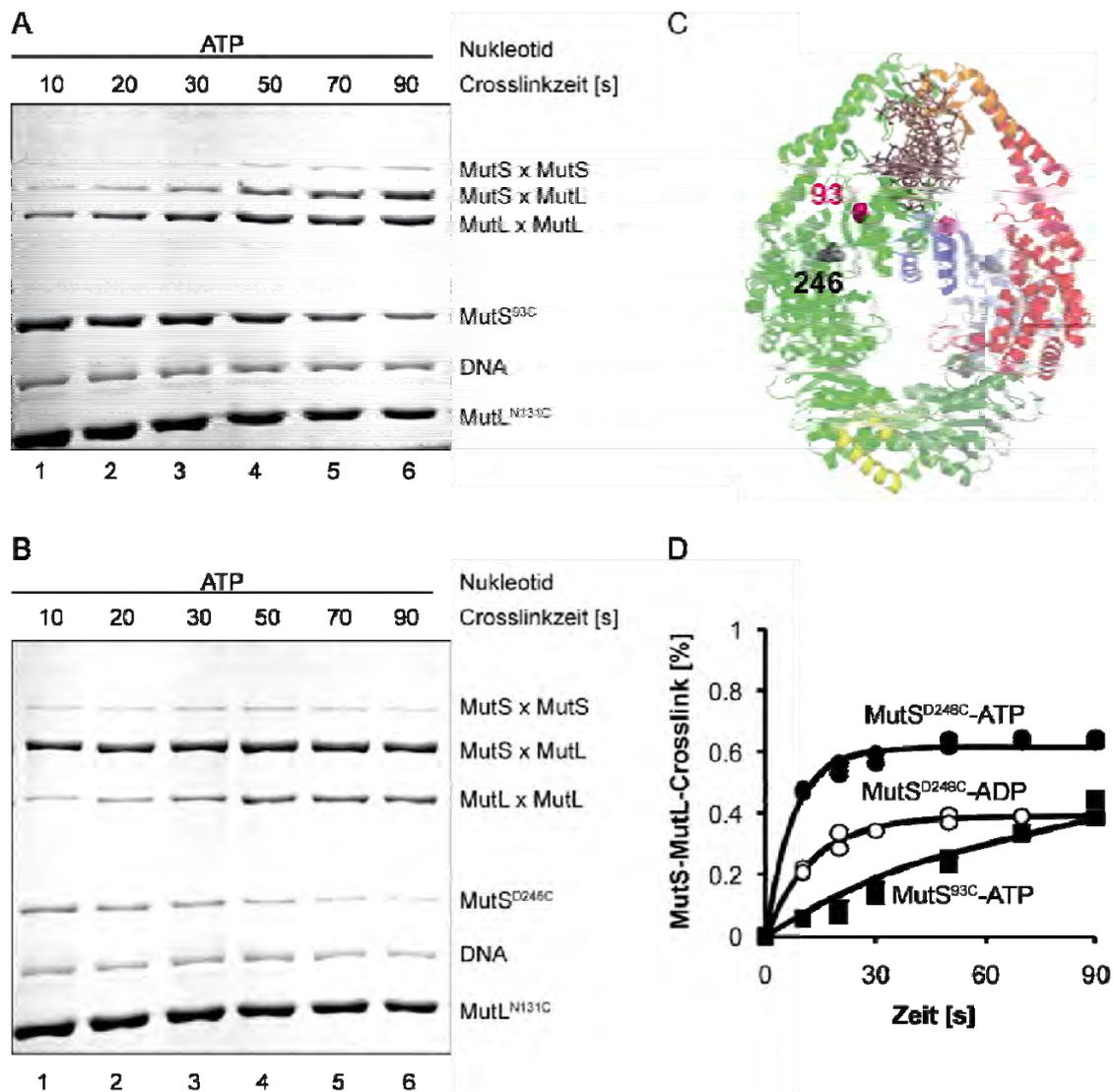


Abbildung 3-X: Zeitlicher Verlauf der Crosslinkreaktion von MutS^{93C} und MutS^{D246C} mit MutL^{N131C}

A) Die Spuren 1 – 6 zeigen die MutS-MutL-Crosslinkausbeute zwischen 400 nM MutS^{93C} und 1 μ M MutL^{N131C} mit unterschiedlich langer Inkubationszeit (10 - 90 s) des Crosslinkers BM[PEO]₃ und in Anwesenheit von 1 mM ATP. Unter B) ist die Crosslinkkinetik mit 400 nM MutS^{D246C} und 1 μ M MutL^{N131C} dargestellt. In den Spuren 1 – 6 wurde in Anwesenheit von ATP (1 mM) unterschiedlich lange gecrosslinkt. C) Darstellung der Kristallstruktur von MutS mit den beiden gecrosslinkten Cys-93 und Cys-246. D) Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Crosslinkreaktion der beiden MutS Varianten in Anwesenheit von ATP und für die Position 246 auch in Anwesenheit von ADP (SDS-Gel nicht gezeigt). Berechnet wurde die Crosslinkausbeute, wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben. Analysiert wurden die Proben auf einem 6%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

Außerdem wurden auch einige dieser Einzelcysteinvarianten sowie der Wildtyp von MutS zu weiteren SC-MutL Varianten gecrosslinkt, was es ermöglichte, zusätzliche Daten für die Identifikation der Interaktionsstelle zu erhalten (siehe Abbildung 7-VI, Daten unvollständig). Dabei wurde die MutL^{K135C} Variante mit der MutS^{D162C} Variante gecrosslinkt, welche nur einen geringen MutS-MutL-Crosslink zu Cys-131 in der MutL^{N131C} Variante, aber einen hohen Crosslink zu Cys-135 in MutL^{K135C} ausbildete. Der Cysteinrest dieser MutL Variante liegt im Protein etwas weiter außen als das Cys-131 in der MutL^{N131C} Variante (Abbildung

3-XI). Eine hohe Crosslinkausbeute (20 - 30 %) wurde nur mit dem 25 Å langen MTS-17-MTS Crosslinker (Tabelle 2-XXII) erzielt. Der MutS-MutL-Crosslink zwischen Cys-162 in MutS und Cys-135 in MutL war ebenfalls DNA-abhängig, aber nicht mehr ATP- oder AMPPNP-abhängig. Auch ADP ermöglichte die Interaktion zwischen MutS und MutL (Abbildung 7-II), was in weiteren SC-MutS Varianten, deren Cysteinreste nicht in der *mismatch*-Bindungsdomäne liegen, beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.3).

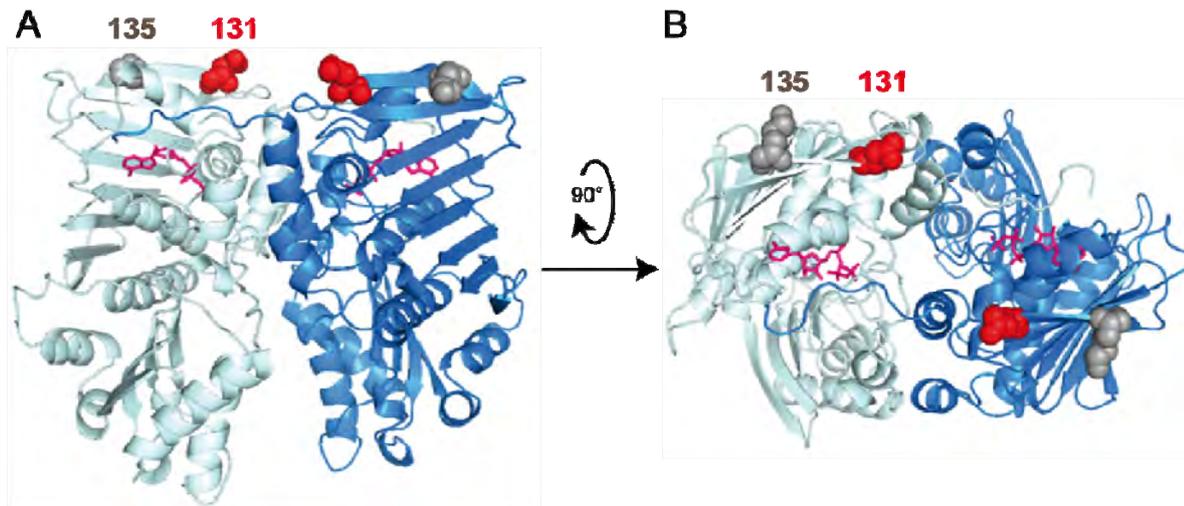


Abbildung 3-XI: Kristallstruktur von LN40

In A) und B) wurde die Kette A in Hellblau, die Kette B in Dunkelblau und das AMPPNP in der ATPase Domäne in Pink dargestellt. Die Aminosäure an der Position 131 ist in Rot dargestellt und in Grau ist der Rest an der Position 135 gezeigt. Die beiden Cys-131 und Cys-135 haben innerhalb eines Monomers einen Abstand von 12 - 14 Å. A) zeigt die Frontansicht von LN40, diese ist in B) um 90 °C gedreht und zeigt die Aufsicht von LN40 (pdb 1b63).

Mit den hier beschriebenen Einzelcysteinvarianten von MutS war es möglich, die Interaktionsstelle zwischen MutS und MutL deutlicher einzugrenzen. Im nächsten Schritt sollten dann Bedingungen für die Interaktion mit der höchsten Spezifität etabliert werden, die dann auch für mögliche Kristallisations- bzw. Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente (*small angle X-ray scattering, SAXS*) verwendet werden können (in Kooperation mit T. Sixma in Amsterdam, Niederlande).

3.4 MutS Dimer ist ausreichend für die Interaktion mit MutL

Da MutS^{WT} in der Lage ist, ein Tetramer zu formen, was spätere Modifikations- und Inhibitionsexperimente (Abschnitt 3.8) sowie die Kristallisation eventuell erschweren kann, wurde MutS^{D246C} als Dimervariante umklontiert. Dazu wurde der Asparaginsäurerest an Position 835 durch ein Arginin ersetzt und dadurch die Tetramerisierung von MutS verhindert³⁹. Die Dimervariante MutS^{D246C/D835R} zeigte eine gleich hohe Crosslinkausbeute

von rund 50 % und die Nukleotid- und DNA-Abhängigkeit, wie die als Tetramer vorliegende MutS^{D246C} Variante (Abbildung 3-XII). Außerdem war zu beobachten, dass die Crosslinkausbeute bei geringerer MutL-Konzentration und gleich bleibender MutS Konzentration von 400 nM nahezu gleich blieb (~ 55 %), aber der MutL-MutL-Crosslink deutlich reduziert wurde.

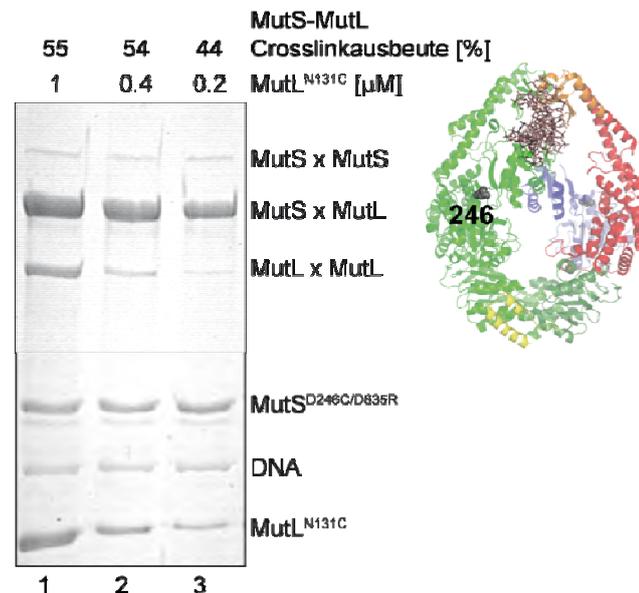


Abbildung 3-XII: Konzentrationsabhängigkeit des MutL-MutL-Crosslinks

In den drei Ansätzen wurden immer 400 nM MutS^{D246C/D835R}, 1 mM ATP, 100 nM lineare 484 bp DNA und 150 mM KCl eingesetzt. Die MutL^{N131C} Konzentration wurde von 1 μM bis 200 nM verringert. Die Crosslinkausbeute wurde, wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben, berechnet. Analysiert wurden die Proben über eine 6 %ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

In Spur 1 wurde 2,5 x mehr MutL als MutS eingesetzt. In der Spur 2 wurden die beiden Proteine in einem 1:1 Verhältnis eingesetzt und in der Spur 3 nur halb so viel MutL wie MutS. Dabei wurde deutlich, dass der MutS-MutL-Crosslink bei einem 1:1 Verhältnis nahezu die gleiche Ausbeute zeigte, aber der MutL-MutL-Crosslink auf < 10 % reduziert wurde (Spur 2). Setzte man nur die Hälfte an MutL ein, nahm der MutS-MutL-Crosslink von 55 % auf 44 % ab, aber der MutL-MutL-Crosslink konnte auf rund < 5 % minimiert werden (Spur 3). Bei einer höheren MutL Konzentration (Spur 1) war es dennoch nicht möglich, den Anteil an MutS-MutL-Crosslink zu erhöhen. Auch bei der verringerten MutL Konzentration trat noch immer freies, also nicht gecrosslinktes MutS und MutL in den Ansätzen auf. Dieses Ergebnis lässt sich vielleicht damit erklären, dass immer nur eine Untereinheit des MutS Dimers mit den beiden N-terminalen Fragmenten von MutL interagiert und der Komplex damit eine 1:1 Stöchiometrie aufweist, wodurch es unmöglich ist, im Durchschnitt mehr als 50 % Crosslinkausbeute zu erhalten.

Im nächsten Schritt wurde die Crosslinkerlänge von 17.8 Å (BM[PEO]₃) auf 8 Å (BMOE) variiert und statt langer, linearer G/T-DNA wurde kurze, lineare bzw. lange, zirkuläre G/T-DNA eingesetzt (Abbildung 3-XIII).

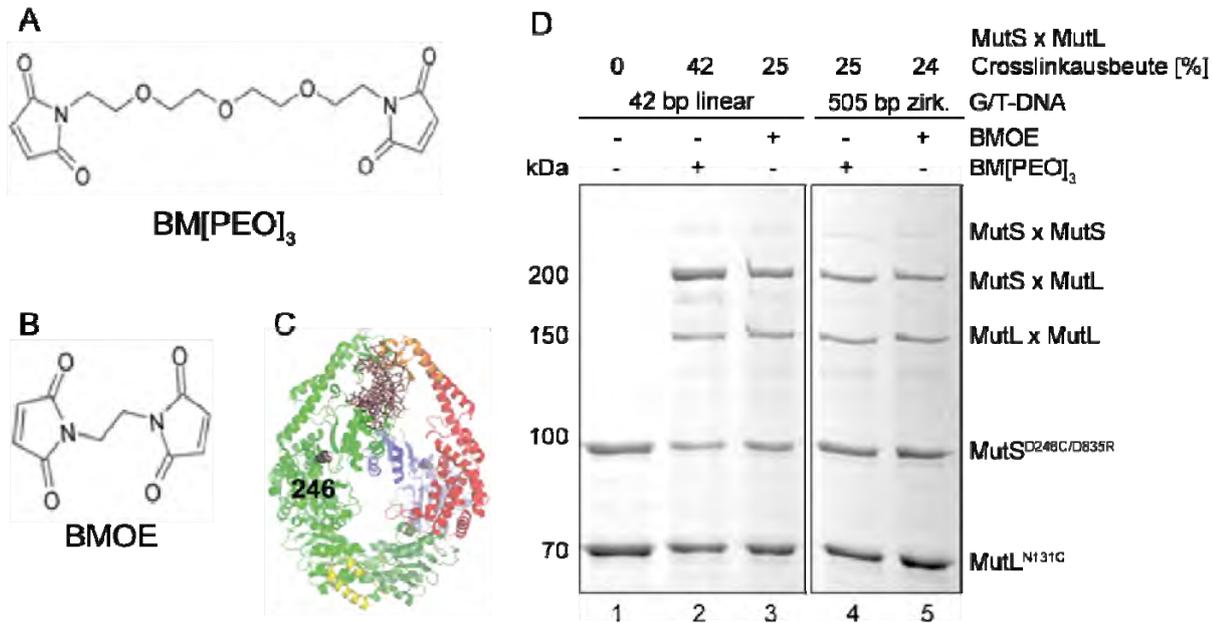


Abbildung 3-XIII: MutS-MutL-Crosslink mit zirkulärer mismatch-DNA

Darstellung der Strukturen der beiden verwendeten Crosslinker A) BM[PEO]₃ und B) BMOE. C) Kristallstruktur von MutS (pdb 1e3m) mit dem reaktiven Cysteinrest an der Position 246. D) In den fünf Ansätzen wurden immer 400 nM MutS^{D246C/D835R}, 1 µM MutL^{N131C}, 1 mM ATP, und 150 mM KCl eingesetzt. In den Spuren 1 - 3 wurden jeweils 500 nM lineare 42 bp DNA eingesetzt und in den Spuren 4 - 5 wurde 10 nM 505 bp, zirkuläre DNA verwendet. Die Crosslinkausbeute wurde, wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben, berechnet. Analysiert wurden die Proben über eine 6 %ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

Dabei fiel auf, dass unter spezifischeren Bedingungen, nämlich mit kurzer DNA und kurzem Crosslinker (Spur 2) oder aber mit zirkulärer DNA (Spuren 4 und 5), weniger MutS-MutL-Crosslink auftrat. Mit zirkulärer DNA war kein Unterschied zwischen den beiden Crosslinkern zu beobachten. Anscheinend ist der gebildete Komplex mit zirkulärer DNA spezifisch und kann daher mit beiden Crosslinkern stabilisiert werden. Demgegenüber war der kurze Crosslinker bei der 42 bp DNA nicht lang genug, um alle gebildeten, zum Teil weniger spezifischen Komplexe einzufangen. Dies passt auch zu den Ergebnissen mit MutS^{WT}, bei denen mit langer DNA auch keine Crosslinkerlängenabhängigkeit beobachtet wurde (Abbildung 3-III). In Anwesenheit von zirkulärer DNA und auch bei 42 bp heteroduplex DNA mit BMOE betrug die Crosslinkausbeute 25 %. Unter weniger spezifischen Bedingungen, mit kurzer, linearer DNA und langem Crosslinker, lag die Ausbeute bei 42 %. Diese Crosslinks waren aber immer noch DNA- und nukleotidabhängig.

Die Dimervariante von MutS ist in Anwesenheit von DNA und Nukleotid in der Lage, einen Komplex mit MutL auszubilden. Eine Verringerung der MutL Konzentrationen von 1 μ M auf 400 nM senkte die MutS-MutL-Crosslinkausbeute nicht, aber die Ausbildung des MutL-MutL-Crosslinks konnte deutlich eingeschränkt werden.

Die Verwendung von zirkulärer DNA steigerte die Spezifität genauso wie die Einsetzung von weniger MutS und MutL oder die Anwesenheit von Nukleotid bei der MutS-DNA Inkubation, wodurch eine *mismatch*-Abhängigkeit des gebildeten MutS-MutL Komplexes gezeigt werden konnte.

3.5 LN40 ist für die Interaktion mit MutS ausreichend

Ein weiterer Aspekt war es nun, zu kontrollieren, ob das vollständige MutL für die Interaktion mit MutS notwendig ist oder aber die NTD ausreicht. Außerdem sollte bestimmt werden, ob die NTD als Monomer oder Dimer mit MutS^{D246C/D835R} interagiert um einen MutS-MutL-Crosslink zu bilden. Durch eine Thrombinspaltung von MutL erhält man zwei Fragmente, die NTD (1-375, 41.7 kDa) und die CTD (376-615, 20 kDa). Dieses Enzym spaltet an der endogenen Thrombinspaltstelle (Arg-375 und Tyr-376) innerhalb des flexiblen Linkers zwischen N-terminalem (LN40) und C-terminalem (LC20) Fragment von MutL. Da LC20 für die Dimerisierung von MutL verantwortlich ist, bilden sich in Abwesenheit von Nukleotid zwei N-terminale Monomere und eine homodimere C-terminale Domäne aus. Die C-terminale Domäne weist kein Cystein auf, deshalb kann diese in den nachfolgenden Versuchen auch nicht mit MutS oder LN40 von MutL gecrosslinkt werden. Nach der Thrombinspaltung wurde ATP, ADP oder AMPPNP hinzugegeben und die N-terminale Hälfte über Nacht inkubiert. Es ist bekannt, dass LN40 mit AMPPNP dimerisiert und in Anwesenheit von ATP bzw. ADP als Monomer vorliegt⁴⁷.

Die Abbildung 3-XIV A zeigt die Auswertung der Crosslinkexperimente zwischen MutS^{D246C/D835R} und unverdauten (Spuren 1 – 3) bzw. mit Thrombin verdauten (Spuren 4 und 5) MutL^{N131C} auf einem 6 %igen SDS-Gel. In der Spur 1 wurde der Ansatz mit ATP aber ohne Crosslinker aufgetragen. In Anwesenheit von ATP (Spur 2) wurde eine Crosslinkausbeute von 60 % erreicht. Diese war mit AMPPNP (Spur 3) gleich hoch, allerdings fiel hier auch der MutL-MutL-Crosslink stärker aus (siehe Diskussion).

In den Spuren 4 und 5 wurden die Ansätze vor dem Crosslinken mit Thrombin verdaut und danach entweder in Anwesenheit von ATP (Spur 4) oder AMPPNP (Spur 5) gecrosslinkt. Dabei war die Crosslinkausbeute in Anwesenheit von ATP deutlich geringer als mit

AMPPNP. Die beiden Crosslinkreaktionen wurden in einem Doppelansatz durchgeführt und nach 6 %iger bzw. 12 %iger SDS-PAGE (Abbildung 3-XIV B) analysiert.

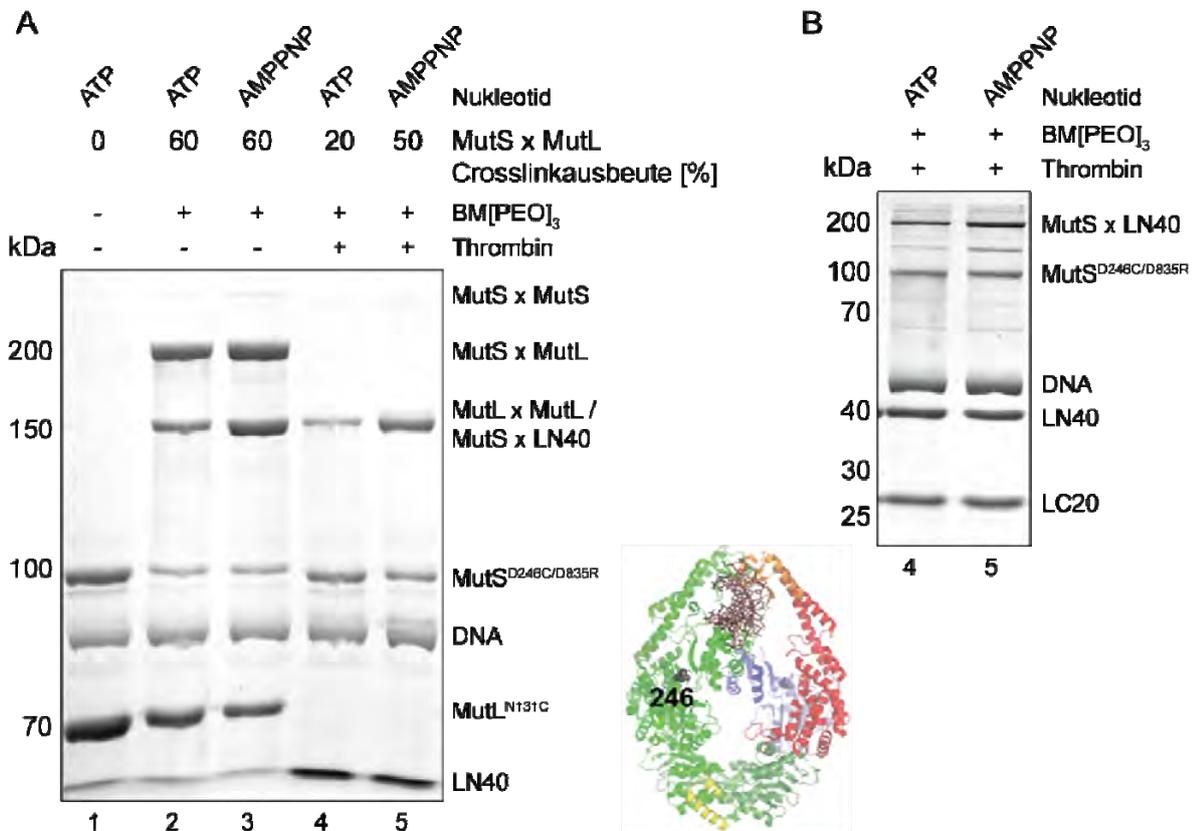


Abbildung 3-XIV: Thrombinspaltung von MutL^{N131C} und anschließendes Crosslinken mit MutS^{D246C}

A) Das Crosslinkergebnis zwischen MutS^{D246C/D835R} und MutL^{N131C} als Gesamtprotein und als N-terminales Fragment (LN40), wobei in der Spur 1 der Ansatz in Abwesenheit von BM[PEO]₃ aufgetragen wurde, in den Spuren 2 und 3 wurde ungespaltenes MutL^{N131C} in Anwesenheit von ATP und AMPPNP gecrosslinkt. In den Spuren 4 und 5 wurde MutL^{N131C} mit Thrombin in das N-terminale (LN40) und das C-terminale Fragment (LC20) gespalten. Dies wurde in der Spur 4 in Anwesenheit von ATP und in der Spur 5 mit AMPPNP durchgeführt. Die Ansätze 4 und 5 wurden in einem Doppelansatz hergestellt und nach dem Crosslinken (A) auf ein 6 %iges SDS-Gel und (B) als Kontrolle der Thrombinspaltung auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Beide Gele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt. Die Kristallstruktur von MutS (pdb 1e3m) wurde in dieser Abbildung zwischen die beiden Gele gestellt.

Das 12 %ige Gel diente der Kontrolle der Thrombinspaltung. Man erkennt das N-terminale Fragment LN40 (40 kDa) und die C-terminale Domäne LC20 (20 kDa), aber kein vollständiges MutL^{N131C} bei 70 kDa. Die C-terminale Domäne läuft im Gel etwas oberhalb der 25 kDa Markerbande, obwohl das berechnete Molekulargewicht 20 kDa beträgt. Bei den kristallisierten Strukturen von LN40 und LC20 fehlt die Linker Region vollständig, nach der Thrombinspaltung befinden sich die Aminosäuren des Linkers jedoch noch an den N-terminalen und C-terminalen Fragmenten. Da die Spaltstelle näher an dem N-terminalen Fragment liegt, hängt der Linker zum größten Teil an der C-terminalen Domäne und sorgt somit für ein höheres Molekulargewicht. Des Weiteren sind auch die Crosslinkbanden,

welche eine geringe elektrophoretische Mobilität aufweisen, zu erkennen. Deren Zuordnung ist allerdings schwierig, daher wurden die Proben auch auf ein 6 %iges SDS-Gel aufgetragen. Hier konnte der MutS-MutL-Crosslink, welcher in Anwesenheit von ATP schwächer war als mit AMPPNP, von den anderen Banden getrennt werden.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde nur LN40 mit dem Cysteinrest an der Position 131 kloniert (Annet Reumer, Amsterdam) und damit die Versuche wiederholt. Dadurch konnte man ausschließen, dass LC20 in den Crosslinkexperimenten einen Einfluss auf die Konformation von LN40 hat. Auch mit der LN40^{N131C} Variante sahen die Crosslinkergebnisse mit verschiedenen Nukleotiden gleich aus. Die höchste MutS-MutL-Crosslinkausbeute wurde in Anwesenheit von AMPPNP erzielt, danach folgte ATP und am geringsten war die Ausbeute mit ADP (Abbildung 3-XV). Auch der MutL-MutL-Crosslink war am ausgeprägtesten in Anwesenheit von AMPPNP, in Anwesenheit von ADP und ATP kaum oder gar nicht zu erkennen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass LN40 in Anwesenheit von AMPPNP ein Dimer bildet und dadurch intern gecrosslinkt werden kann⁴⁷. Mit ATP und ADP zerfällt das Dimer in zwei Monomere, welche ohne LC20 nicht fixiert werden und daher nicht oder nur schlecht intern gecrosslinkt werden können.

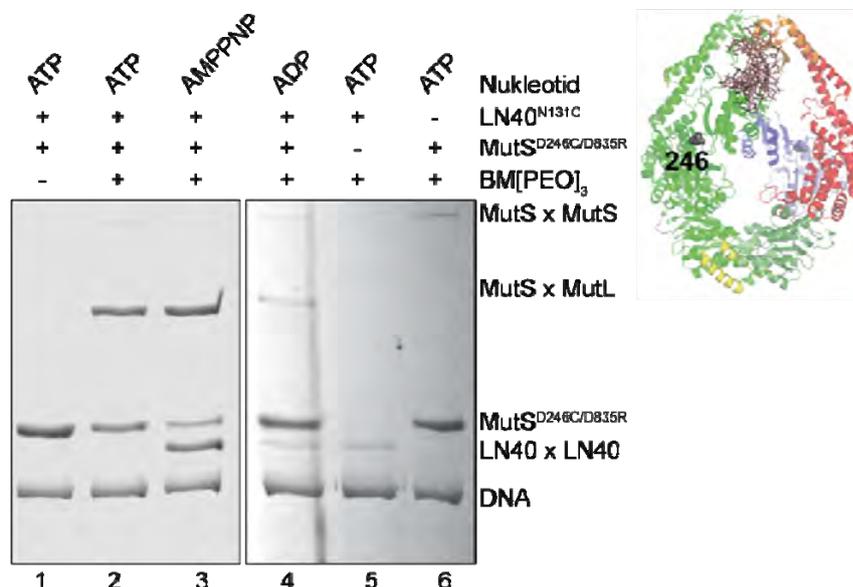


Abbildung 3-XV: Crosslink zwischen MutS^{D246C/D835R} und LN40^{N131C}

In der Spur 1 wurden 400 nM MutS^{D246C/D835R}, 1 µM LN40^{N131C}, 1 mM ATP und 100 nM lineare, 484 bp DNA in Abwesenheit von Crosslinker aufgetragen. In der Spur 5 fehlte MutS und in der Spur 6 fehlte MutL. Die Spuren 2 bis 4 unterscheiden sich nur in den verwendeten Nukleotiden ATP, AMPPNP und ADP. Die Proben wurden auf einem 6 %igen SDS-Gel analysiert und anschließend mit Coomassie gefärbt.

Es scheint also, dass das MutL Monomer ausreichend ist für die Komplexbildung, aber ein dimeres N-terminales Fragment einen stabileren Komplex ausbildet und damit die

Crosslinkausbeute erhöht. Diese Vermutung konnte mit der LN40^{N131C} Variante bestätigt werden. Eine Erklärung für die im Vergleich zum vollständigen MutL^{N131C} geringere MutS-MutL-Crosslinkausbeute mit ATP ist vielleicht, die Hydrolyse von ATP zu ADP, wodurch das Dimer in zwei Monomere zerfällt und die beiden Monomere durch die fehlende C-terminale Domäne durch das Crosslinken nicht mehr eingefangen werden können. Mit AMPPNP hingegen kommt es zu keiner Hydrolyse, das Dimer liegt stabil vor und kann gecrosslinkt werden.

Mit den Crosslinkdaten konnte gezeigt werden, dass während der Bildung des transienten Komplexes zwischen MutS und MutL die ATPase Domäne von MutL in der Nähe der *mismatch*-Bindungsdomäne und der *connector*-Domäne von MutS liegt. Die Interaktion von MutL mit der *mismatch*-Bindungsdomäne ist DNA- und ATP-abhängig, aber ATP-Hydrolyse unabhängig. Auch die Interaktion zwischen MutL und der *connector*-Domäne ist nur in Anwesenheit von DNA zu beobachten, allerdings findet diese Komplexbildung auch mit ADP statt. Werden die Bedingungen so gewählt, dass nicht die Crosslinkausbeute sondern die Spezifität des Crosslinks im Vordergrund steht, dann tritt die Komplexbildung nur in Anwesenheit von *mismatch*-DNA und Nukleotid auf. Dabei ist die Dimervariante von MutS sowie das monomere LN40 ausreichend für die Interaktion, allerdings bildet das dimerisierte LN40 einen wahrscheinlich stabileren Komplex aus, der sich durch das Crosslinken besser „einfangen“ lässt.

3.6 Fluorophormodifikation von Cysteinresten in MutS und MutL

Durch die Crosslinkergebnisse mit den Einzylcysteinvarianten von MutS mit MutL^{N131C} konnten die *connector*-Domäne und die *mismatch*-Bindungsdomäne in MutS als Bereiche identifiziert werden, die in der Nähe der ATPase Domäne von MutL liegen. Um diesen Befund mit komplementären Methoden zu bestätigen und zusätzlich funktionelle Daten zu erhalten, wurden die MutS^{D246C/D835R} und MutS^{R449C/D835R} Varianten sowie die MutL^{N131C} und MutL^{H297C} Varianten mit den Fluorophoren Alexa 488 oder Alexa 594 modifiziert. Da sich die verschiedenen Cysteinreste im Komplex mit dem Crosslinker modifizieren lassen, sollten die Reste auch für die Modifikation mit den Fluorophoren zugänglich sein. Die Einzylcysteinvarianten von MutS und MutL wiesen nach Entfernen des freien Fluorophors über Größenausschlusschromatographie einen Markierungsgrad, bestimmt über Fluoreszenzspektroskopie, von > 95 % auf. Die Analyse der modifizierten Proteine über SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzphotographie und Coomassie-Färbung bestätigten die kovalente Markierung der Cysteinreste in MutS und MutL.

Die beiden mit Alexa 488 modifizierten MutS Varianten (Abbildung 3-XVI) und die MutL^{H297C} Variante (Tabelle 3-III) wurden über analytische Ultrazentrifugation (Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe, welche eine Aussage über Größe, Form und Masse von Makromolekülen und Komplexen erlaubt) auf Aggregation, vorliegende Konformation (Dimer, Tetramer) und freien Alexa 488 Fluorophor kontrolliert. Außerdem war es möglich, die DNA-Bindung von MutS in Anwesenheit von ADP und ATP zu testen, und es wurde versucht, die Komplexbildung zwischen MutS und MutL zu visualisieren. In der Tabelle 3-III sind die korrigierten Sedimentationskonstanten ($s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$) für MutS und MutL in Anwesenheit von Nukleotid (ATP, ADP oder AMPPNP) und die experimentell bestimmten Sedimentationskonstanten (s_{exp}) für MutS in Anwesenheit von Nukleotid (ATP oder ADP) und DNA angegeben. Für Komplexe aus Makromolekülen mit unbekannter Zusammensetzung ist es nicht möglich, die korrigierten s-Werte ($s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$) zu berechnen, daher wurden hier die experimentellen Werte angegeben, die Auflösung betrug dabei 0.1 S.

Tabelle 3-III: Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen von Alexa 488 markierten MutS und MutL Varianten

<i>MutS Variante</i>	<i>MutS^{R449C/D835R}</i>	<i>MutS^{D246C/D835R}</i>	<i>MutL^{H297C}</i>
ADP			
$s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$ (Perrin-Faktor) ^{a)}	8.3 S (1.42)	8.2 S (1.43)	n. b.
ATP			
$s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$ (Perrin-Faktor)	8.4 S (1.40)	8.4 S (1.40)	5.8 S (1.62)
AMPPNP			
$s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$ (Perrin-Faktor)	8.4 S (1.40)	-	6.1 S (1.53)
ADP + 42 bp GT			
s_{exp} ^{b)}			
+ ADP	8.0 S	7.9 S	-
+ ADP + DNA	8.9 S	8.9 S	-
ATP + 42 bp GT			
s_{exp} ^{b)}			
+ ATP	8.1 S	8.1 S	-
+ ATP + DNA	8.2 S	8.5 S	-

a) Die experimentellen Daten wurden mit dem Programm SEDFIT ausgewertet. Die gemessenen s_{exp} -Werte wurden mittels des partiellen, spezifischen Volumens auf $s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$ Werte korrigiert. Der Perrin-Faktor gibt das Verhältnis des gemessenen Reibungskoeffizienten zum Reibungskoeffizienten einer Kugel gleicher Masse an. Damit kann eine Aussage über die Abweichung des Teilchens von der Kugelform getroffen werden. Allerdings ist die Hydratisierung nicht berücksichtigt, so dass ein perfektes kugelförmiges Protein einen Perrin-Faktor zwischen 1.1 und 1.2 hat.

b) Da es nicht möglich ist, das partielle, spezifische Volumen für Komplexe aus unterschiedlichen Makromolekülen mit unbekannter Zusammensetzung zu bestimmen, wurden die nicht korrigierten s-Werte (s_{exp}) angegeben. Die Auflösung betrug dabei 0.1 S.

n. b.: nicht bestimmbar

In Abbildung 3-XVI ist die s-Wert Verteilung aus den jeweiligen Ultrazentrifugationsläufen von MutS^{R449C/D835R} (A) und MutS^{D246C/D835R} (B) in Anwesenheit von ATP oder ADP (schwarze Linien) und in An- und Abwesenheit von 500 nM linearer 42 bp *mismatch*-DNA (grüne Linien) dargestellt, wobei jeweils 90 % von MutS sedimentierten. In Anwesenheit von

ADP wurde eine Sedimentationskonstante $s_{20^{\circ}\text{C},\text{W}}$ von 8.2 S für die mit Alexa 488 modifizierte MutS^{D246C/D835R} Variante und 8.3 S für MutS^{R449C/D835R} Variante bestimmt, was der Konformation eines MutS-Dimers entspricht. In Anwesenheit von ATP steigt der s-Wert ($s_{20^{\circ}\text{C},\text{W}}$) für beide MutS Varianten ein wenig auf 8.4 S an, was darauf hinweist, dass MutS mit ATP etwas kompakter vorliegt. Die Anwesenheit von ADP und kurzer, heteroduplex DNA führt zu einem Anstieg der nicht korrigierten Sedimentationskonstante s_{exp} von 7.9 S auf 8.9 S, was die Komplexbildung zwischen MutS und DNA zeigt. In Gegenwart von ATP bleibt der s-Wert der Mutante MutS^{R449C/D835R} von 8.1 S auf 8.2 S konstant, wohingegen sich der s-Wert der MutS^{D246C/D835R} Variante von 8.1 S auf 8.5 S ändert. Diese Mutante scheint also auch in Anwesenheit von ATP an die DNA zu binden, wenn auch schwächer als in Gegenwart von ADP (8.0 S auf 8.9 S).

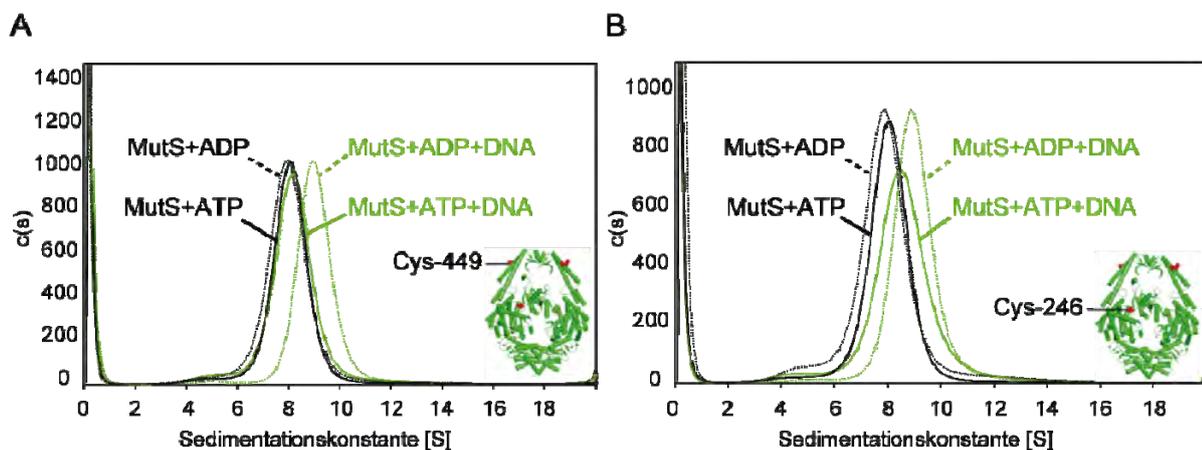


Abbildung 3-XVI: Analytische Ultrazentrifugation mit Alexa 488 modifizierten SC-MutS Varianten

A) S-Wert Verteilung für die mit Alexa 488 modifizierte MutS^{R449C/D835R} Variante. B) S-Wert Verteilung für die mit Alexa 488 modifizierte MutS^{D246C/D835R} Variante. Insgesamt wurden für jede Variante vier Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt, 100 nM MutS in Anwesenheit von 1 mM ADP (schwarz, gestrichelte Linie) oder ATP (schwarze Linie) und 100 nM MutS in Anwesenheit von 500 nM 42 bp heteroduplex DNA und 1 mM ADP (grün, gestrichelte Linie) oder ATP (grüne Linie). Des Weiteren ist die Kristallstruktur von MutS (pdb 1e3m) in Grün mit den beiden modifizierten Cysteinresten in Rot dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe von Ute Curth und dem Programm SEDFIT, welches ein Modell für die $c(s)$ -Verteilung anbietet, ausgewertet.

Die beiden mit Alexa 488 modifizierten SC-MutS Varianten binden dementsprechend in Anwesenheit von ADP an die kurze DNA. Der Fluorophor behindert die DNA-Bindung der beiden modifizierten Proteine nicht. Eine schwächere DNA-Bindung der markierten MutS^{D246C/D835R} Variante war auch in Anwesenheit von ATP zu beobachten, was vermuten lässt, dass sich eine darauffolgende Konformation nicht korrekt ausbilden kann (siehe Diskussion).

In gleicher Weise wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit modifiziertem MutL^{H297C} in Anwesenheit von unterschiedlichen Nukleotiden (ATP, ADP oder AMPPNP) durchgeführt. In Gegenwart von AMPPNP sedimentierten 90 % von MutL mit einer Sedimentationskonstante $s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$ von 6.1 S, was auf ein MutL Dimer hinweist. In Anwesenheit von ATP sedimentiert MutL mit einer Sedimentationskonstante $s_{20\text{ }^{\circ}\text{C},\text{W}}$ von 5.8 S etwas langsamer und scheint damit weniger kompakt als der Komplex in Anwesenheit von AMPPNP zu sein. Im Gegensatz dazu ist die s-Wert Verteilung in Anwesenheit von ADP viel breiter als mit den anderen beiden Nukleotiden und weist mehrere Signale auf, was es unmöglich macht, eine Sedimentationskonstante zu bestimmen. Die über SDS-PAGE analysierten Proben zeigten nach der Zentrifugation einen Abbau des modifizierten MutL in Anwesenheit von ADP, was daraufhin weist, dass MutL unter diesen Bedingungen weniger stabil ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das markierte MutL^{H297C} nicht aggregiert und in Anwesenheit von ATP und AMPPNP ein stabiles Dimer bilden kann. Diese Dimerbildung wurde mit Größenausschlußchromatographie⁵² und für eukaryotische MutL Homologe auch mit Rasterkraftmikroskopie⁹³ beobachtet.

Die mit Alexa 488 modifizierte MutS^{R449C/D835R} Variante wurden auf die Komplexbildung mit MutL getestet (Abbildung 3-XVII). Dafür wurde MutS^{R449C/D835R} in Gegenwart von zirkulärer DNA mit AMPPNP (rote Linie) oder ADP (blaue Linie) inkubiert (Abbildung 3-XVII A). Dabei waren in Anwesenheit von DNA und ADP zwei Maxima mit unterschiedlichem s-Wert zu erkennen. Der kleinere s-Wert bei etwa 7 - 8 S spiegelt das freie MutS wider und der größere s-Wert bei 11 – 12 S das an die DNA gebundene MutS. In Anwesenheit von AMPPNP war keine DNA-Bindung zu beobachten.

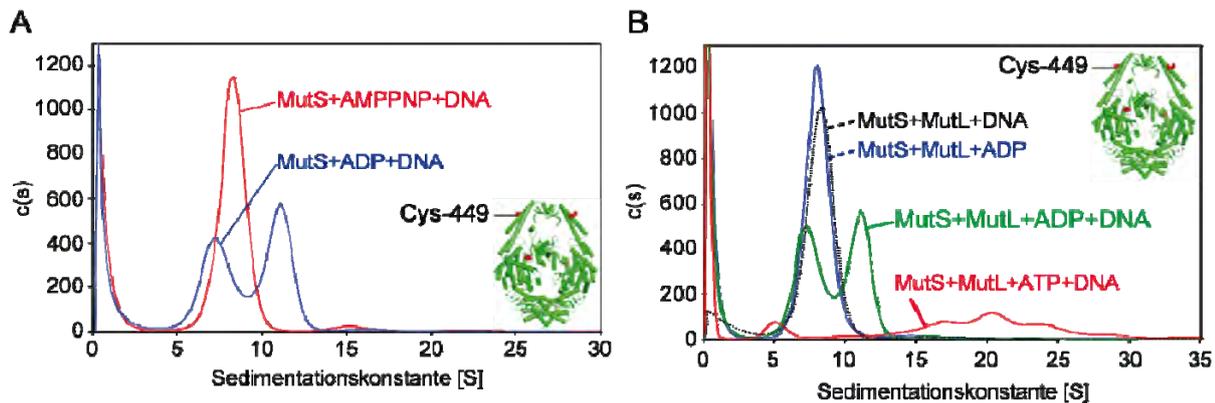


Abbildung 3-XVII: Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse des MutS-MutL-Komplexes

A) Darstellung der s -Wert Verteilung für 50 nM MutS^{R449C/D835R} mit Alexa 488 markiert und 10 nM 505 bp zirkulärer, heteroduplex DNA in Anwesenheit von 1 mM ADP (blaue Linie) oder AMPPNP (rote Linie). B) Darstellung der s -Wert Verteilung für die Komplexbildung zwischen 100 nM MutL^{CF}, 50 nM MutS^{R449C/D835R} mit Alexa 488 markiert und 10 nM 505 bp zirkulärer, heteroduplex DNA in Anwesenheit von 1 mM ADP (grüne Linie) oder ATP (rote Linie) sowie die beiden Kontrollen mit MutS, MutL und DNA (gestrichelte, schwarze Linie) und MutS, MutL und ADP (blaue Linie). Außerdem ist die Lage des modifizierten Cys-449 in der MutS Kristallstruktur (Grün, pdb 1e3m) dargestellt. Daten wurden mit Hilfe von Ute Curth und dem Programm SEDFIT, welches ein Modell für die $c(s)$ -Verteilung anbietet, ausgewertet.

In Abbildung 3-XVII B ist zu sehen, dass MutS in Anwesenheit von MutL und ADP (blaue Linie) sowie in Anwesenheit von MutL und 505 bp heteroduplex DNA (schwarze Linie) keine Komplexe bilden und genauso schnell sedimentieren wie MutS mit AMPPNP und DNA (Abbildung 3-XVIII A, rote Linie). Es ist bekannt, dass MutS unter diesen Bedingungen nicht an die DNA bindet⁷². In der Probe mit MutS, MutL, ADP und DNA wurde nur der MutS-DNA-Komplex beobachtet (Abbildung 3-XVII B, grüne Linie). Ersetzt man aber das ADP durch ATP, so erhält man kaum ungebundenes MutS dafür aber sehr heterogene Komplexe, die eine breite s -Wert Verteilung aufweisen. Auf Grund dieser Heterogenität war es nicht möglich, s -Werte zu bestimmen und Näheres über die Struktur des Komplexes auszusagen. Um detaillierte Aussagen für die Komplexbildung mittels AUZ zu treffen, sind weitere Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe notwendig.

3.7 Funktionelle Analyse von markierten MutS und MutL Varianten mittels FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)

Die mit dem Donor (Alexa 488-Maleimid) oder Akzeptor (Alexa 594-Maleimid) modifizierten MutS^{D246C/D835R} und MutS^{R449C/D835R} Varianten und die mit dem Donor (Alexa 488-Maleimid) modifizierte MutL^{H297C} Variante wurden des Weiteren in FRET-Experimenten eingesetzt. Dabei wurde die DNA mit zwei Fluorophoren (Donor und Akzeptor) modifiziert und MutS unmodifiziert eingesetzt, um die DNA-Biegung durch MutS zu beobachten. Modifiziert man die DNA mit nur einem Fluorophor (Donor) und MutS mit

dem zweiten (Akzeptor), so konnte die spezifische MutS-Bindung an der Fehlpaarung sowie die Dissoziationsgeschwindigkeit von MutS von der DNA untersucht werden. Bei den DNA-Bindungs- und Biegungsexperimenten wurde zuerst das FRET-Signal der 42 bp heteroduplex DNA gemessen, danach wurde MutS und zum Schluss die Kompetitor-DNA (42 bp unmarkierte heteroduplex DNA) dazugegeben, um den FRET wieder aufzulösen.

Bei den Dissoziationsgeschwindigkeitsexperimenten wurde modifiziertes MutS (Akzeptor) zuerst an die markierte DNA (Donor) gebunden, was über einen Anstieg des FRET-Signals beobachtet werden konnte, und im zweiten Schritt wurde eine Kompetitor-DNA im größeren Überschuss zur markierten DNA hinzugegeben und die Fluoreszenzabnahme gemessen.

Außerdem konnte die Komplexbildung zwischen mit Alexa 594 modifiziertem MutS^{D246C/D835R} oder MutS^{R449C/D835R} und mit Alexa 488 modifiziertem MutL^{H297C} an heteroduplex DNA beobachtet werden.

Die DNA-Bindungsassays mittels FRET bestätigten die Ergebnisse aus den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen. Die beiden mit Alexa 594 modifizierten MutS Varianten zeigten keine funktionelle Einschränkung in der DNA-Bindung (Abbildung 7-III) und DNA-Biegung (Abbildung 7-IV).

In den Dissoziationsgeschwindigkeitsexperimenten zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen der modifizierten MutS^{D246C/D835R} und der modifizierten MutS^{R449C/D835R} Variante (in Zusammenarbeit mit Andreas Marx und Dr. Michele Cristovao). Die Daten konnten nicht an ein einfaches Bindungs- und Dissoziationsmodell angepasst werden (Daten nicht gezeigt). Es scheint, dass MutS^{D246C/D835R} nach der Bindung nicht oder nur eingeschränkt in der Lage ist, die *sliding-clamp* auszubilden.

Neben diesen Bindungs-, Biegungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitsexperimenten, die auch der Kontrolle der modifizierten SC-MutS Varianten dienen, wurde ebenfalls versucht, einen FRET zwischen einem markierten MutS und einem markierten MutL zu erhalten. Berücksichtigt man den aus den Crosslinkergebnissen erhaltenen maximalen Abstand von 17 Å zwischen MutS^{D246C} und MutL^{N131C} und den aus der Kristallstruktur (pdb 1b63) bestimmten Abstand zwischen der Position 131 in Kette A und der Position 297 in Kette A und B im MutL Dimer mit 40 Å bzw. 30 Å, so erhält man eine Distanz zwischen Cys-246 und Cys-297 von 50 Å - 60 Å. Diese Distanz ermöglicht einen effizienten FRET, vor allem mit den Fluorophoren Alexa 488 und Alexa 594, welche einen Förster-Radius R_0 von 57 Å haben. Für die FRET-Experimente zwischen MutS und MutL wurde die MutS^{D246C/D835R} und die MutS^{R449C/D835R} Variante mit Alexa 594 und MutL^{H297C} mit Alexa 488 modifiziert (Abbildung 3-XVIII). Bei den FRET-Experimenten wurde zuerst das Emissionsspektrum des Donors an

der MutL^{H297C} Variante aufgenommen, dabei war bei 515 nm keine/kaum Fluoreszenz zu erkennen (grüne Linie). Gab man im nächsten Schritt das mit Alexa 594 modifizierte MutS dazu, war bei beiden MutS Varianten nur ein geringer Fluoreszenzanstieg (mit einem A/D Verhältnis von 0.08) bei einer Wellenlänge von 515 nm zu erkennen (rote Linie). In Abwesenheit von DNA war keine Interaktion zwischen MutS und MutL zu erkennen.

In Anwesenheit von DNA jedoch stieg die Akzeptorfluoreszenz bei beiden Varianten deutlich an (orange Linie), wobei das FRET-Signal für die MutS^{D246C/D835R} Variante mit einem A/D Verhältnis von 0.36 deutlich größer war (Abbildung 3-XVIII A) als für MutS^{R449C/D835R} mit 0.17 (Abbildung 3-XVIII B). Zum Schluss wurde die Kaliumchloridkonzentration von 125 mM auf 300 mM erhöht und der FRET zwischen MutS und MutL an der heteroduplex DNA fiel auf das Ausgangssignal von 0.07, entsprechend dem Signal der Proben, die nur MutS und MutL enthielten, zurück (schwarz gestrichelte Linie).

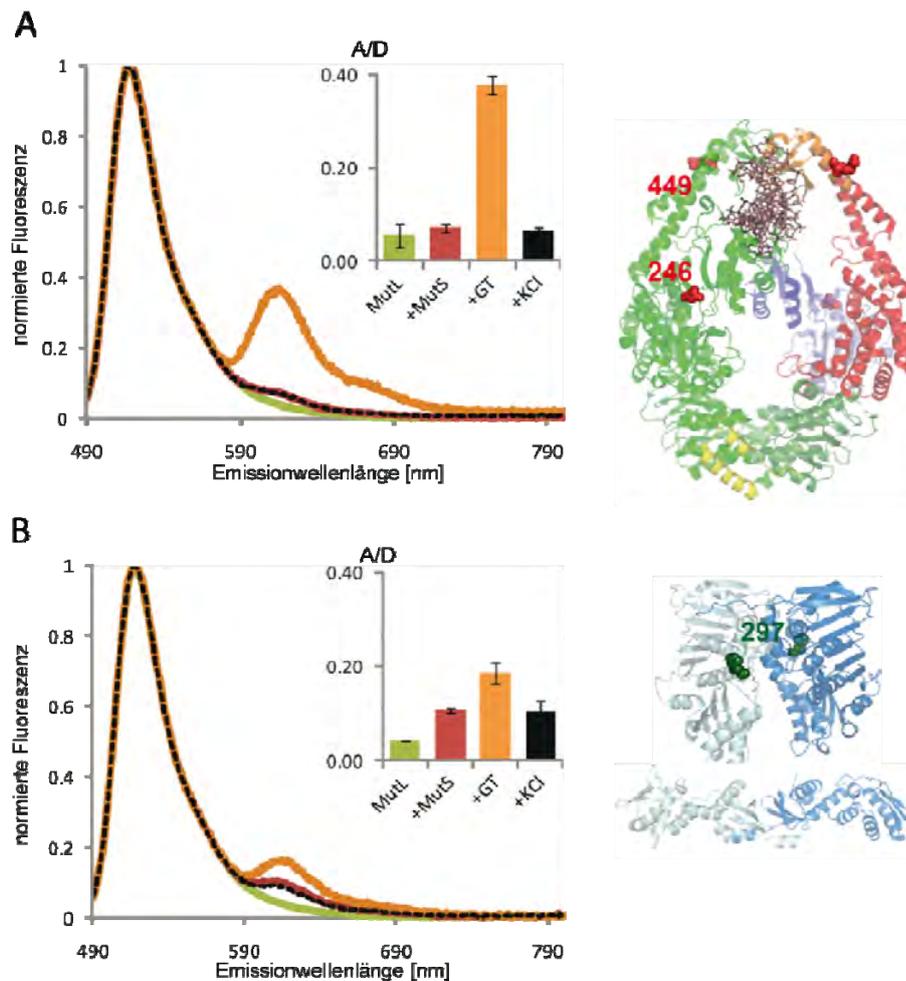


Abbildung 3-XVIII: Ternäre Komplexbildung zwischen MutS und MutL beobachtet durch FRET

Das Fluoreszenzemissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ und normiert auf $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$) von 200 nM MutL^{H297C}, mit Alexa 488 modifiziert, wurde in Anwesenheit von 1 mM ATP im FRET-Puffer (25 mM Hepes/KOH, $0,05 \%$ Tween20, 125 mM KCl und 5 mM MgCl₂) aufgenommen (grüne Linie). Als nächstes wurden entweder 200 nM mit Alexa 594 A) modifiziertes MutS^{D246C/D835R} oder B) modifiziertes MutS^{R449C/D835R} hinzugegeben (rote Linie). Im Anschluss wurde 100 nM 484 bp lange, heteroduplex DNA dazugegeben (orange Linie) und zum Schluss erfolgte die Zugabe von KCl auf eine Endkonzentration von 300 mM (schwarz gestrichelte Linie). Das Balkendiagramm zeigt das Verhältnis zwischen der Akzeptorfluoreszenzemission bei 615 nm und der Donorfluoreszenzemission bei 515 nm (A/D). Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen aufgetragen.

In den beiden Balkendiagrammen wurden das Verhältnis zwischen Akzeptor und Donor für die einzelnen Messungen aufgetragen. Auch hier wird deutlich, dass es in Anwesenheit von DNA zu einem FRET von mit Donor markiertem MutL zum mit Akzeptor markierten MutS kommt. Dieser FRET kann durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder aufgelöst werden, denn dann kann MutS nicht mehr an die DNA binden und somit auch keinen Komplex mit MutL bilden.

Gleichzeitig wurden noch Fluoreszenz-Anisotropiemessungen (Daten nicht gezeigt) für die beiden Fluorophore durchgeführt, dabei konnte keine Änderung der Anisotropie für die beiden verwendeten SC-MutS Varianten gemessen werden (Cys-246: $r_{\text{D}} = 0,14$, $r_{\text{A}} = 0,30$ und

Cys-449: $r_A = 0.20$). Daraus lässt sich schließen, dass die Beweglichkeit der Fluorophore durch die Komplexbildung nicht beeinflusst wurde.

Mit den FRET-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Fluorophore an den beiden MutS Varianten keinen Einfluss auf die DNA-Bindung und DNA-Biegung haben. Allerdings weist die markierte MutS^{D246C/D835R} Variante eine veränderte Dissoziationsgeschwindigkeit auf, die eventuell auf den am Cysteinrest gebundenen Fluorophor zurückzuführen ist, der eine funktionell wichtige Konformationsumwandlung behindert. Des Weiteren wurde die Komplexbildung zwischen MutS und MutL über FRET beobachtet, wobei die FRET-Signale der beiden Varianten unterschiedlich hoch waren. Entweder enthält der Komplex unterschiedliche Mengen an MutS und MutL, oder der Abstand zwischen Akzeptor und Donor im Komplex ist unterschiedlich.

3.8 Fluorophormarkiertes Cys-246 in der *connector*-Domäne in MutS behindert die MutH-Aktivierung

Die modifizierten Einzelcysteinvarianten von MutS und MutL wurden in dem MutS-abhängigen MutH-Aktivierungsassay getestet. Dabei erkennt MutS die Fehlpaarung und rekrutiert und aktiviert MutL, welches im nächsten Schritt die Endonuklease MutH aktiviert. Diese spaltet nach DNA-Bindung an der unmethylierten GATC-Erkennungssequenz. Dadurch kommt es bei der zirkulären 505 bp DNA zuerst zu einem Einzelstrangbruch (*nick*) und nach erneutem Binden und Spalten der DNA zu einem Doppelstrangbruch. Dieser sorgt dafür, dass die zirkuläre DNA (ccc) linearisiert (lin) wird (Abbildung 3-XIX B).

Die MutL^{H297C} Variante, welche keinen Crosslink zu MutS^{WT} oder zu Cys-246 ausbildete, aber einen FRET zu Cys-246 zeigte, wies keine eingeschränkte oder gestörte MutH-Aktivierung nach der Markierung mit Alexa 594 auf (Abbildung 3-XIX C).

Neben den modifizierten MutL Varianten wurden auch die modifizierten MutS Varianten auf ihre MutH-Aktivierung getestet. Dabei wurden die beiden Cys-246 und Cys-449 modifiziert. Diese beiden Einzelcysteinvarianten zeigten einen FRET mit unterschiedlicher Ausbeute, es wurde aber nur ein signifikanter Crosslink zur Position 246 beobachtet.

Die Abbildung 3-XX zeigt in A die Kristallstruktur von MutS mit den beiden zu modifizierenden Resten. In B ist der Inhibitionsassay für die unmodifizierte (Spuren 2 – 5) und mit Alexa 594 modifizierten (Spuren 6 – 9) MutS^{D246C/D835R} Varianten dargestellt. In C ist die quantitative Auswertung aller durchgeführten Inhibitionsassays nach 10 minütiger DNA-Spaltung durch unmodifiziertes und modifiziertes MutS^{D246C/D835R} und MutS^{R449C/D835R} dargestellt.

Im Inhibitionsassay zwischen der unmodifizierten und der modifizierten MutS^{D246C/D835R} Variante war ein mindestens 10facher Unterschied zu erkennen (Abbildung 3-XX B). Bei einer Konzentration von 300 nM wurde bei der unmodifizierten MutS Variante die gesamte zirkuläre DNA nach 10 min durch Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche in offen zirkuläre bzw. in linearisierte DNA umgewandelt. Bei der modifizierten Variante hingegen lag auch noch nach 10 min die zirkuläre DNA vor. Bei geringerer MutS Konzentration wurde der Unterschied noch etwas deutlicher. Bei der unmodifizierten MutS Variante waren nach 10 min über 90 % der zirkulären DNA gespalten, bei der modifizierten MutS Variante hingegen lagen nur etwa 15 - 20 % der zirkulären DNA als offene Zirkel vor. Dieser Unterschied wird durch die quantitative Auswertung von bis zu vier unabhängigen Experimenten noch deutlicher; die modifizierte MutS^{D246C/D835R} Variante aktiviert MutH mindestens 10fach schlechter als die unmodifizierte Variante (Abbildung 3-XX C, Vergleich zwischen den braun umrandeten und den braun ausgefüllten Balken).

Im Gegensatz dazu zeigte die unmodifizierte und modifizierte MutS^{R449C/D835R} Variante keinen Unterschied in der MutH-Aktivierung (Abbildung 3-XX C, blaue Balken). Nach 10 min konnte bei Konzentrationen von 100 – 500 nM die zirkuläre DNA vollständig in offene Zirkel (oc) und linearisierte DNA (lin) umgewandelt werden. Wurde weniger MutS eingesetzt (25 – 75 nM), konnten nach 10 min zwischen 80 % und 95 % umgesetzt werden.

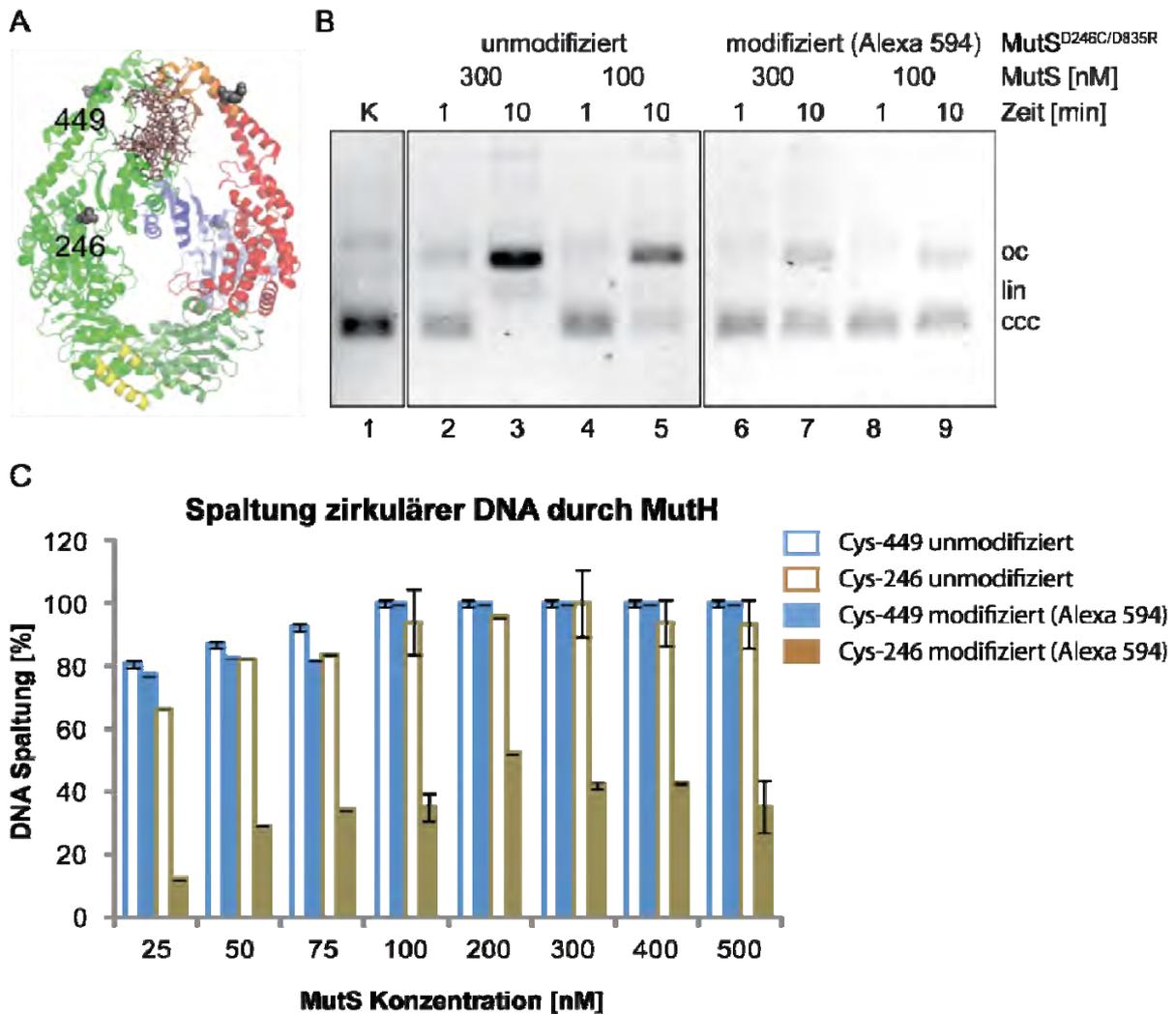


Abbildung 3-XX: Aktivitätstest der modifizierten MutS^{R449C/D835R} und MutS^{D246C/D835R}

A) Darstellung der Positionen der beiden Cysteinreste, Cys-246 und Cys-449 in MutS (pdb 1e3m). Für die nachfolgenden Versuche wurden Einzelcysteinvarianten verwendet. B) Vergleichende Darstellung der MutH-Aktivierung durch die Spaltung der zirkulären DNA durch den unmodifizierten (Spur 2–5) und modifizierten (Spur 6–9) Cys-246 in MutS^{D246C/D835R}. In der Spur 1 (K) wurde das Substrat ohne die Reparaturenzyme aufgetragen. In den Spuren 2–5 wurde das unmodifizierte MutS aufgetragen und in den Spuren 6–9 die mit Alexa 594 modifizierte MutS^{D246C/D835R} Variante. Für jede MutS Konzentration (300 nM und 100 nM) wurde die Reaktion nach 1 min und 10 min gestoppt. Die Spuren 2 und 3 sowie 6 und 7 zeigen die Spaltung bei 300 nM MutS und die Spuren 4 und 5 sowie 8 und 9 die MutH-Aktivierung mit 100 nM MutS. In dem Assay wurden 500 nM MutL^{CF}, 500 nM MutH^{CF}, 15 nM zirkuläre DNA, 1 mM ATP und 150 mM KCl eingesetzt. Die Proben wurden auf einem 2 %igen, mit Ethidiumbromid vorbehandelten und anschließend mit Ethidiumbromid nachgefärbten Agarosegel analysiert. C) Quantitative Auswertung aller ähnlich durchgeführten DNA-Spaltassays, wie in B) beschrieben, von MutS^{D246C/D835R} und MutS^{R449C/D835R} mit/ohne Alexa 594 Markierung. Im Diagramm sind die Balken für die unmodifizierten Cysteinreste nur umrandet und für die modifizierten Reste ausgefüllt in Braun für die Position 246 und in Blau für die Position 449 dargestellt. ccc: kovalent geschlossene Zirkel; oc: offen zirkuläre DNA; lin: linearisiert

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es zwischen dem unmodifizierten und dem modifizierten Cys-449 keinen Unterschied bei der MutH-Aktivierung gab.

Im Gegensatz dazu war bei der modifizierten MutS^{D246C/D835R} Variante nur eine geringe MutH-Aktivierung zu erkennen. Diese eingeschränkte MutH-Aktivierung lässt sich vielleicht

auf eine Störung einer Konformationsumwandlung in MutS zurückführen, die für die nachfolgende MutH-Aktivierung notwendig ist.

3.9 Konformationsumwandlung im MutS

Die Konformationsumwandlung von MutS in die *sliding-clamp* ist ein wichtiger Schritt im *mismatch*-Reparatursystem. Diese Änderung ermöglicht die Kommunikation zwischen der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung durch MutH und leitet damit die nachfolgenden Schritte zur Entfernung und Neusynthese des fehlerhaften Stranges ein.

Bei den Experimenten zur Bestimmung des reaktiven, endogenen Cysteinrestes in MutS^{WT} wurden zwei Cysteinvarianten mit noch drei verbliebenen, endogenen Cysteinresten verwendet (Abschnitt 3.2). Diese beiden MutS Varianten (MutS^{93C/239C/297C} und MutS^{93C/239C/711C}) wiesen bei den Crosslinkreaktionen immer eine MutS-Doppelbande auf. Diese Doppelbande wurde über Massenspektrometrie analysiert und es zeigte sich, dass es sich bei beiden Banden nur um MutS handelte (P. Friedhoff, persönliche Mitteilung). In weiteren Versuchen wurde die Spezifität der beobachteten MutS-Doppelbande getestet (Abbildung 3-XXI). Dazu wurden MutS und MutL in Anwesenheit von DNA und ATP inkubiert und gecrosslinkt, es bildete sich der MutS-MutL-Crosslink mit dem gleichen elektrophoretischen Laufmuster aus wie bei der MutS^{93C} Variante. Außerdem war die MutS-Doppelbande zu erkennen (Spur 3). Ersetzte man ATP durch ADP (Spur 4) oder crosslinkte MutS^{93C/239C/297C} und MutL^{N131C} in Abwesenheit von DNA (Spur 5), war wie erwartet kein MutS-MutL-Crosslink zu beobachten, aber auch keine MutS-Doppelbande. Behielt man jedoch die spezifischen Crosslinkbedingungen, DNA und ATP, bei und crosslinkte in Abwesenheit von MutL, so war eine MutS-Doppelbande zu beobachten (Spur 6).

Eine mögliche Erklärung für die DNA- und ATP-abhängige MutS-Doppelbande ist das Auftreten eines internen Crosslinks zwischen Cys-93 und Cys-239, was zu einem veränderten elektrophoretischen Laufverhalten von MutS im SDS-Gel führt. Dafür müsste es aber zu einer Konformationsumwandlung in Form einer Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne innerhalb des MutS kommen, da der Abstand laut Kristallstruktur (pdb 1e3m) mit circa 28 Å zu groß ist, um durch den 17.8 Å langen BM[PEO]₃ Crosslinker verknüpft zu werden. Anscheinend ist DNA und ATP notwendig, um die Konformationsumwandlung in die *sliding-clamp* hervorzurufen.

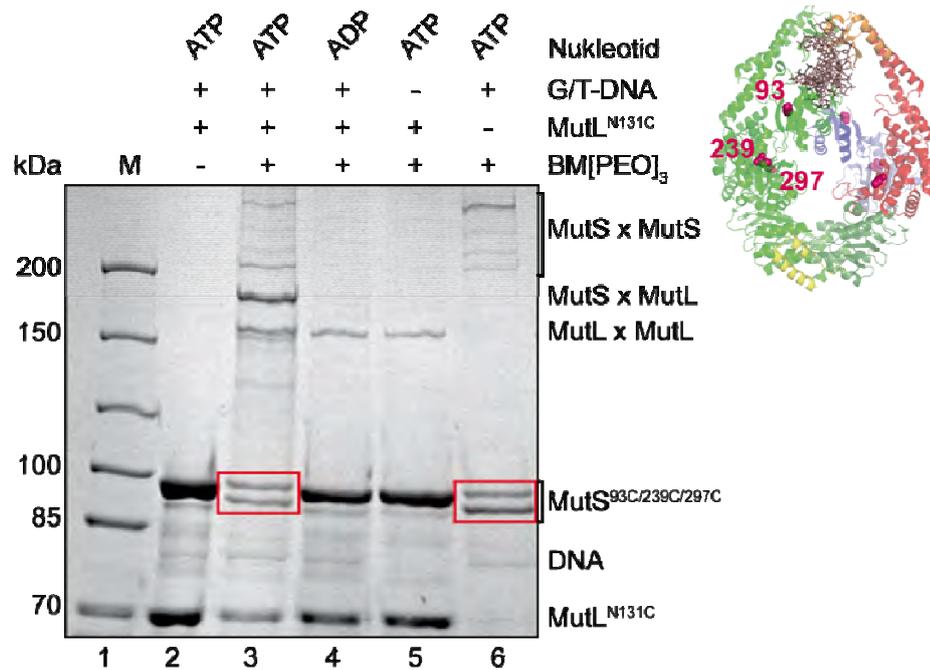


Abbildung 3-XXI: ATP- und DNA-Abhängigkeit des internen Crosslinks in MutS

Die Dreifachcysteinvariante MutS^{93C/239C/297C} wurde in 125 mM KCl, 1 x Puffer Grün, in Anwesenheit (Spuren 2 - 4 und 6) und Abwesenheit (Spur 5) von 100 nM 484 bp G/T-DNA, in Gegenwart von 1 mM ATP (Spuren 2 - 3 und 5 - 6) oder ADP (Spur 4) sowie mit MutL^{N131C} (nur die Spur 6 ohne) und dem Crosslinker BM[PEO]₃ (außer Spur 2) aufgetragen. Analysiert wurden die Proben auf einem 6 %igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

Um die Hypothese der Konformationsumwandlung genauer zu untersuchen, wurde eine MutS Variante mit den beiden Cys-93 und Cys-239 kloniert und die Versuche damit wiederholt (Abbildung 3-XXII). Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass Cys-297 an der Bildung des internen Crosslinks beteiligt ist. Als Kontrolle wurde die MutS^{93C} Variante in Anwesenheit von ATP und 42 bp heteroduplex DNA gecrosslinkt (Spur 9). Geht man davon aus, dass es sich bei der MutS-Doppelbande um einen internen Crosslink handelt, sollte diese Variante nicht in der Lage sein, diesen auszubilden, denn es ist nur ein Cysteinrest vorhanden. In der Tat war keine MutS-Doppelbande zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte die MutS-Doppelbande mit der MutS^{93C/239C} Variante in Anwesenheit von kurzer, 42 bp heteroduplex DNA und ATP (Spuren 1 - 4) sowie in Abwesenheit von MutL beobachtet werden (Spur 5). Dabei fiel auf, dass bei einer höheren DNA-Konzentration die Ausbeute der zweiten MutS Bande deutlich anstieg und bei 500 nM DNA die maximale Ausbeute 50 % entsprach. Das gleiche Ergebnis konnte ebenfalls mit der MutS^{93C/239C/297C} Variante beobachtet werden. Die Ausbeute von maximal 50 % ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich nur eine *mismatch*-Bindungsdomäne von der DNA wegbewegt und damit intern gecrosslinkt werden kann.

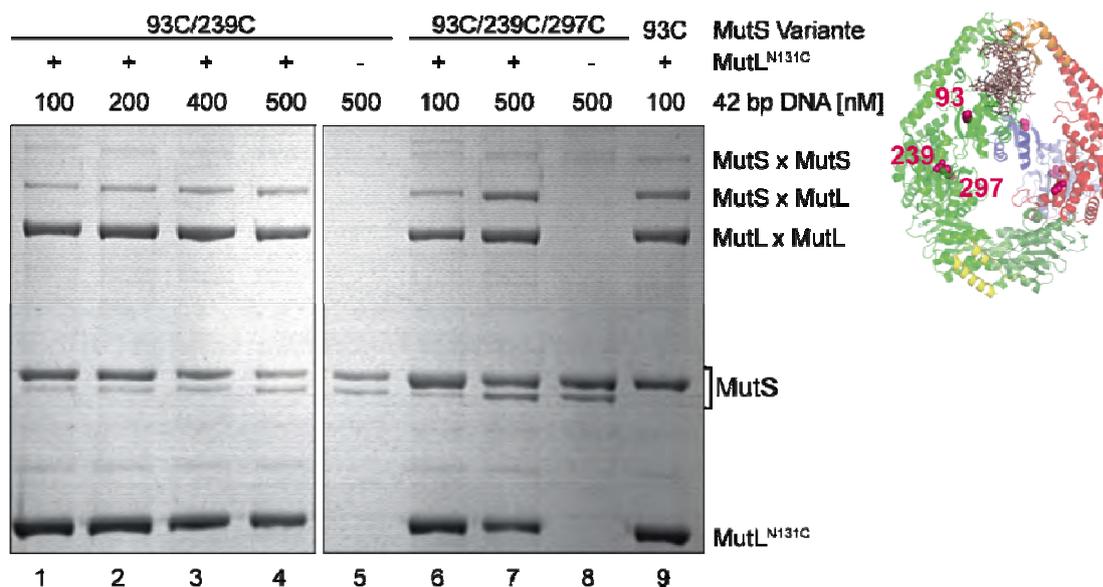


Abbildung 3-XXII: Der interne Crosslink in MutS tritt auch mit kurzer DNA auf

In den Spuren 1-5 wurde die Doppelcysteinvariante MutS^{93C/239C} mit unterschiedlicher 42 bp G/T-DNA-Konzentration von 100 – 500 nM in den Spuren 1-4 und in der Spur 5 ohne MutL^{N131C}, aber mit 500 nM DNA aufgetragen. In den Spuren 6–8 wurde die Dreifachcysteinvariante MutS^{93C/239C/297C} und in der letzten Spur 9 wurde MutS^{93C} als Kontrolle verwendet. Die Ansätze in den Spuren 6 und 7 unterschieden sich nur in der DNA-Konzentration (100 bzw. 500 nM). Die Spur 8 enthält kein MutL^{N131C}, aber 500 nM DNA. Alle Ansätze enthielten 1 mM ATP, 150 mM KCl und DNA. Analysiert wurden die Ansätze 1 – 9 auf einem 6 %igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

Die zuvor beschriebene Konformationsumwandlung in MutS, d. h. eine Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne weg von der DNA, wurde bereits in einem Modell von Lamers vorgeschlagen³¹. Mit diesem Modell wäre es möglich, die auftretende MutS-Doppelbande zu erklären, denn dadurch verkürzt sich der Abstand zwischen den beiden Cysteinresten erheblich, die dann mit BM[PEO]₃ gecrosslinkt werden könnten (Abbildung 3-XXIII). In der Abbildung ist die Kristallstruktur (pdb 1e3m) von MutS mit ADP und DNA und der Abstand zwischen den beiden Aminosäureresten (in Rot) dargestellt. Der Abstand zwischen den beiden Resten beträgt für die Kette A 28 Å und für die Kette B 25 Å. Unterhalb der Kristallstruktur wurde das Modell der beweglichen *mismatch*-Bindungsdomäne in MutS (in Grün) mit Cys-93 und Cys-239 in Rot dargestellt. Stellt man sich jetzt die Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne, wie im Modell dargestellt, in der Kristallstruktur vor, nähern sich die beiden Reste erheblich an, so dass sie untereinander crosslinkbar wären.

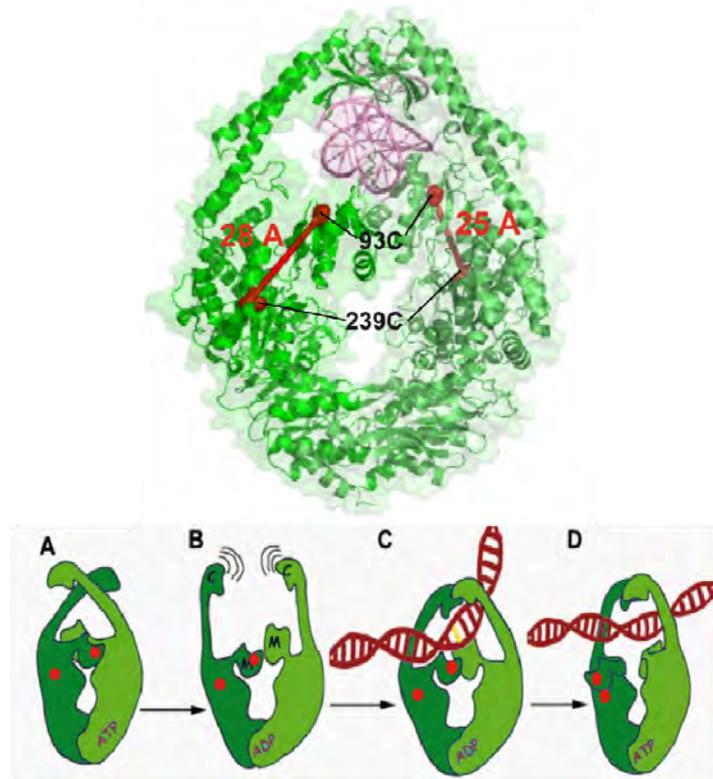


Abbildung 3-XXIII: Modell zur Konformationsumwandlung der *mismatch*-Bindungsdomäne in MutS

In der Kristallstruktur von MutS wurden die beiden Cysteinreste Cys-93 und Cys-239 in Rot dargestellt und der jeweilige Abstand zwischen den beiden Cysteinresten mit 28 Å und 25 Å mit PyMol bestimmt. Darunter ist die bereits vorgeschlagene Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne mit Hilfe des Modells von Lamers mit den beiden Cysteinresten, Cys-93 und Cys-239 als rote Punkte gezeigt (Lamers, 2004)³¹.

In dieser Arbeit konnte durch biochemische Analysen gezeigt werden, dass der transiente, ternäre Komplex zwischen MutS und MutL in Anwesenheit von Nukleotid (ATP, ADP, oder AMPPNP) und DNA einer bestimmten Länge gebildet wird. Außerdem wurde gezeigt, dass die NTD von MutL im Komplex in der Nähe der *mismatch*-Bindungsdomäne und der *connector*-Domäne von MutS liegt, und dass ein Monomer von LN40 ausreichend ist, um mit MutS zu interagieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Konformationsänderung von MutS in die *sliding-clamp* nur durch eine ATP-abhängige Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne in Richtung der *connector*-Domäne ausgebildet werden kann, und dass diese Konformation MutL-unabhängig ist.

4 Diskussion

Die Bildung des ternären Komplexes zwischen MutS, MutL und DNA ist ein wichtiger Schritt im Prozess des *mismatch*-Reparatursystems (MMR). Allerdings ist bis jetzt die Struktur des ternären Komplexes unbekannt, und es liegen nur wenige Informationen zu den Interaktionsstellen vor (siehe unten).

In der vorliegenden Arbeit sollte der ternäre Komplex zwischen MutS, MutL und DNA funktionell und strukturell charakterisiert werden. Dafür sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen der transiente Komplex durch chemisches Crosslinken eingefangen werden kann. Des Weiteren sollte ein Fluoreszenzassay etabliert werden, um die dynamische Komplexbildung verfolgt zu können.

Für das in dieser Arbeit verwendete thiol-spezifische Crosslinken des MutS-MutL-Komplexes war es zunächst notwendig, Bedingungen zu etablieren, unter denen die Komplexbildung und das Crosslinken spezifisch sind und die eine systematische Analyse der Bildung des ternären Komplexes erlauben. Aufbauend auf Vorarbeiten (Ines Winkler, Diplomarbeit, 2006), wurden die Reaktionsbedingungen vor allem auf zwei Aspekte hin optimiert: Crosslinkspezifität bzw. Crosslinkausbeute. Die Bedingungen wurden dabei für die Crosslinkreaktion zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass nur unter Bedingungen, unter denen die in der Literatur beschriebene ternäre Komplexbildung stattfindet, d.h. in Anwesenheit von langer heteroduplex DNA und ATP, die Crosslinkreaktion zwischen MutS und MutL erfolgt (Abbildung 3-II)¹. Dieses Ergebnis war nicht zwangsläufig zu erwarten, da bei der Verwendung von chemischen Crosslinkern immer damit gerechnet werden muss, dass auch „unspezifische“ Crosslinkprodukte entstehen können. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein (Bildung von Aggregaten, hohe Konzentrationen und damit unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen usw.). Unter anderem durch die analytischen Ultrazentrifugationsexperimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MutS und MutL nicht aggregiert vorliegen (Abbildung 3-XVI - Abbildung 3-XVIII). In dieser und vergleichbaren Arbeiten aus der Literatur^{53; 55} sind daher die Kontrollen ein wichtiges Instrument für die Entscheidung über die Spezifität der Crosslinkreaktionen (Abbildung 3-II: Crosslink in An- und Abwesenheit von ATP/ADP).

Die Crosslinkexperimente lassen sich in drei Hauptergebnissen zusammenfassen: (1) Es konnten Aminosäurereste in MutS und MutL bestimmt werden, die im ternären Komplex in räumlicher Nähe sind. (2) Es konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Fragment (LN40)

von MutL für die Interaktion mit MutS ausreichend ist, und (3) dass die *mismatch*- und ATP-induzierte Konformationsumwandlung zur Ausbildung einer *sliding-clamp* eine Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne weg von der DNA in Richtung der *connector*-Domäne beinhaltet. Mit diesen Ergebnissen konnte folgendes Modell für die Interaktion zwischen MutS und MutL erstellt werden (Abbildung 4-I).

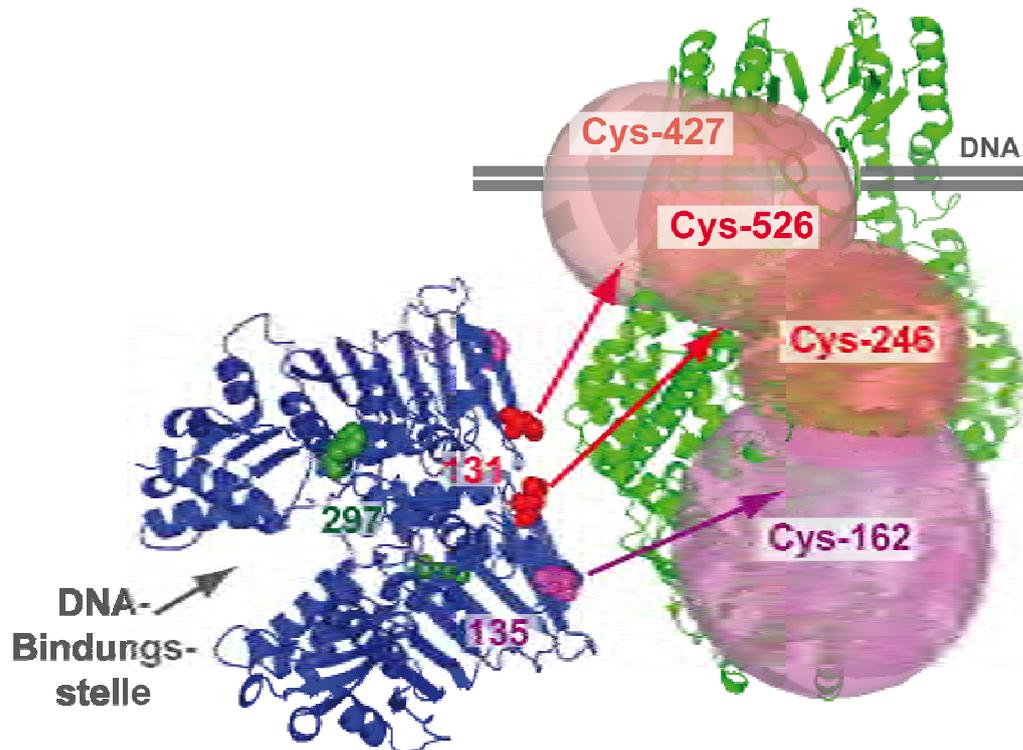


Abbildung 4-I: Modell des Komplexes zwischen MutS und MutL

Das an die DNA (grau) gebundene MutS (pdb 1e3m) ist in Grün, LN40 (pdb 1b63) ist in Blau, die crosslinkrelevanten Cysteinreste sind in Rot (131) bzw. in Violett (135) und der in den FRET-Experimenten modifizierte Cysteinrest, Cys-297 ist in Grün dargestellt. Um die Cysteinreste in MutS sind transparente Kugeln gezeigt, deren Radius der Länge des Crosslinkers entspricht, mit dem ein Crosslinkprodukt gebildet wurde.

Das Modell, basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Crosslinkdaten, ist ebenfalls vollständig kompatibel zu den FRET-Ergebnissen (siehe unten). Es zeigt das dimere MutS (Seitenansicht) in Grün. Die transparenten Kugeln, die um die vier Cysteinreste, Cys-162 (Violett), Cys-246 (Rot), Cys-427 (Rosa) und Cys-526 (Hellrot) liegen, repräsentieren die Reichweite der verwendeten Crosslinker (BM[PEO]₃ für Cys-246, Cys-427 und Cys-526 sowie MTS-17-MTS für Cys-162). Das dimere LN40 mit den drei Cysteinresten, Cys-131 (Rot), Cys-135 (Violett) und Cys-297 (Grün) ist in Blau dargestellt.

Die Crosslinkergebnisse zeigten, dass das N-terminalen Fragment von MutL mit MutS^{WT} interagiert, da Cysteinreste, die sich in den zwei Schleifen am N-Terminus des Proteins befinden, ein Crosslinkprodukt mit MutS bilden (Cys-131 oder Cys-135; siehe Abbildung

3-XI). Liegen die Cysteinreste näher zur DNA-Bindungsstelle (z. B. Cys-169 oder Cys-297), war ein MutS-MutL-Crosslinkprodukt kaum nachweisbar (siehe Anhang, Abbildung 7-VI).

Cys-131 muss im Komplex in der Nähe der Cysteinreste Cys-93, Cys-78 und Cys-103 der *mismatch*-Bindungsdomäne liegen, da - allerdings nur in Gegenwart von ATP und DNA - ein Crosslink zu MutS gebildet wurde, unter Bedingungen, unter denen für MutS eine Konformationsumwandlung der *mismatch*-Bindungsdomäne postuliert worden ist (Abbildung 3-VI und siehe unten). Zum anderen wurde ein Crosslink in Anwesenheit von Nukleotid (ATP, ADP oder AMPPNP) und DNA (Abbildung 3-IX) zu Cys-246 in der *connector*-Domäne und zu den beiden Resten Cys-427 und Cys-526 in der *core/levers*-Domäne gebildet. Die beiden Cysteinreste Cys-427 und Cys-526 liegen strukturell in der Nähe der *connector*-Domäne. Die Crosslinkausbeute war dabei zwischen der MutS^{D246C} Variante und der MutL^{N131C} Variante mit 50 ± 10 % die höchste. Die anderen beiden Cysteinreste wiesen eine Crosslinkausbeute von 30 ± 5 % auf. Die hohe Crosslinkausbeute ist ein Indiz dafür, dass Cys-246 im Bereich der Interaktionsstelle zwischen MutS und MutL liegt. Interessanterweise war es möglich, diesen Cysteinrest in der *connector*-Domäne auch in Anwesenheit von ADP anstelle von ATP zu crosslinken. Die Crosslinkausbeuten sind mit ADP jedoch geringer als mit ATP (Abbildung 3-IX) und sinken, wenn die DNA- oder die Proteinkonzentration verringert wurden (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen konnte keine ternäre Komplexbildung mit Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) auf DNA beobachtet werden⁹⁴. Dagegen finden sich in der Literatur Hinweise, z. B. in FAR-Western Experimenten, dass sich ein MutS-MutL-Komplex auch in Abwesenheit von DNA und Nukleotid bilden kann^{79; 91}.

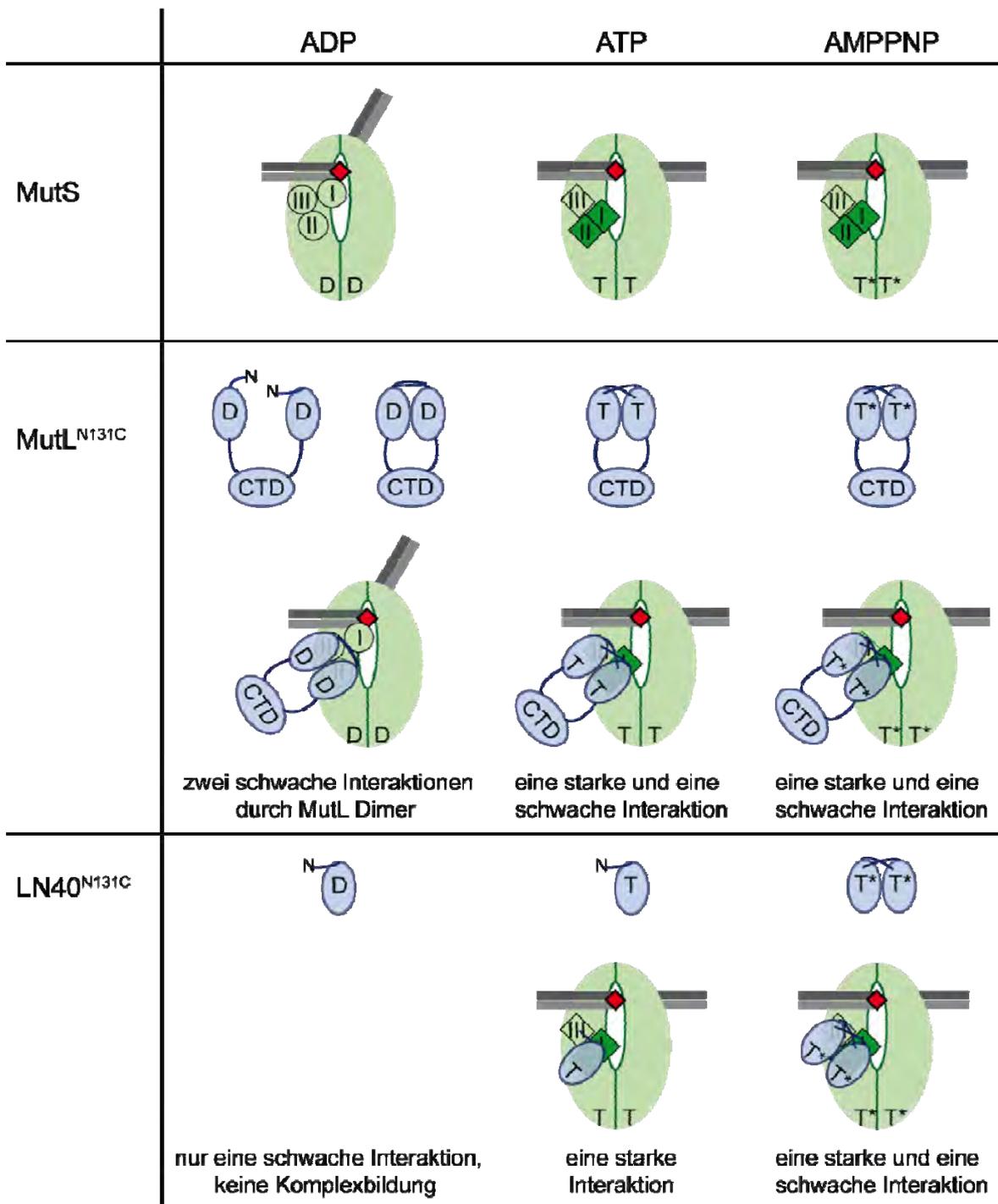
Cys-162 in der *connector*-Domäne von MutS zeigt zu Cys-131 in MutL mit ~ 10 % nur eine geringe MutS-MutL-Crosslinkausbeute; allerdings ist die Crosslinkausbeute höher (~ 30 %) zu Cys-135 in MutL. Dieser Crosslink tritt ebenfalls, wie der von Cys-131 in MutL zu Cys-246 in der *connector*-Domäne von MutS, in Anwesenheit von Nukleotid (ATP, ADP oder AMPPNP) und DNA auf, weist aber eine ausgeprägte Längenabhängigkeit auf (Abbildung 7-II), wobei der längste MTS-Crosslinker (MTS-17-MTS, 25 Å) die höchste Crosslinkausbeute zeigt. Cys-162 liegt also im Komplex nah genug an Cys-135, um über einen langen Crosslinker verbunden zu werden, aber nicht nah genug, um auch mit Cys-131 zu reagieren.

Diese Ergebnisse passen sehr gut zu den erst kürzlich veröffentlichten Daten der Gruppe von Kolodner, die ebenfalls für die Interaktionsstelle einen Bereich innerhalb der *connector*-Domäne (Position 205 – 211) vorschlagen. Allerdings wird in dieser Publikation

eine Interaktion zwischen MutL und der *mismatch*-Bindungsdomäne von MutS nicht diskutiert². Dass MutL mit der *connector*-Domäne von MutS interagiert, konnte auch durch Fusion der *connector*-Domäne an das Maltose-Bindeprotein und Pulldown-Experimente gezeigt werden. Interessanterweise zeigt sich in diesen Experimenten eine stärkere Interaktion von MutS mit MutL in Anwesenheit von ADP im Vergleich zu ATP². Es ist jedoch nicht bekannt, wie hoch die Affinität dieser Komplexe ist.

In den in dieser Arbeit vorgestellten FRET- sowie den analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten (AUZ) konnte keine Komplexbildung in Anwesenheit von ADP beobachtet werden. Anscheinend ist der Komplex zu dynamisch und unter den experimentellen Bedingungen nicht populiert, um auf diese Weise beobachtet zu werden. Das thiol-spezifische Crosslinken ist aber in der Lage, diesen Komplex einzufangen.

Weitere Crosslinkergebnisse (Abbildung 3-XIV und Abbildung 3-XV) zeigen, dass LN40 für die Interaktion mit MutS ausreicht, obwohl es alleine nicht in der Lage ist, DNA zu binden oder MutH zu aktivieren⁵². Allerdings ist die Crosslinkausbeute mit ATP geringer als mit AMPPNP, und es wurde kein Crosslink mit ADP beobachtet. LN40 liegt in Anwesenheit von AMPPNP als Homodimer vor, aber in Gegenwart von ATP und ADP als Monomer⁵². Die höhere Crosslinkausbeute in Anwesenheit von AMPPNP zeigt, dass ein Homodimer von LN40 eher in der Lage ist, einen Komplex mit MutS^{D246C} zu bilden. In Anwesenheit von ATP kommt es zwar nicht zur Dimerisierung, denn es wurde kein LN40 x LN40 Crosslink beobachtet (Abbildung 3-XV), trotzdem wurde ein MutS-MutL-Crosslink gebildet. In Anwesenheit von ADP war dies nicht möglich. Um diese Ergebnisse zu interpretieren, hilft folgendes Schema, dass eine modulare Interaktion zwischen MutS und MutL postuliert (Abbildung 4-II):



Legende:

- schwache Interaktion in Anwesenheit von ADP
- starke Interaktion in Anwesenheit von ATP
- D ADP
- T* AMPPNP
- schwache Interaktion in Anwesenheit von ATP
- I Domänen I-III von MutS
- T ATP
- G/T-DNA

Abbildung 4-II: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen MutS und MutL

MutL ist in Blau und MutS in Grün dargestellt. Gebundenes ADP ist durch „D“, gebundenes ATP durch „T“ und gebundenes AMPPNP durch T* gekennzeichnet. Weitere Erklärungen können dem Text und der Legende entnommen werden.

Dem Schema liegen folgende Daten/Annahmen zu Grunde: Das N-terminale Fragment von MutL liegt in Lösung in Anwesenheit von ADP fast ausschließlich als Monomer vor (Abwesenheit von MutL-MutL Crosslink siehe Abbildung 3-XV), kann aber bei hoher Konzentration (im Kristall) Dimere ausbilden (pdb 1b62)⁵⁰. Diese Dimere sind aber im Detail vom Dimer in Anwesenheit des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog AMPPNP (pdb 1b63) verschieden. *Full-length* MutL liegt in Anwesenheit von ADP hauptsächlich in der offenen Form vor (NTD-Domänen nicht in Kontakt), kann aber auch (bis zu 30 %) geschlossene Formen bilden^{50; 52; 93}. In Anwesenheit von ATP kann sowohl das N-terminale Fragment dimerisieren als auch *full-length* MutL in die geschlossene Form übergehen. Allerdings führt die ATP-Hydrolyse dazu, dass das N-terminale Fragment hauptsächlich als Monomer vorliegt (Analyse über Gelfiltration, Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von AMPPNP kommt es zur stabilen Dimerisierung des N-terminalen Fragments von MutL bzw. der geschlossenen Form von *full-length* MutL⁵⁰. Für MutS wurden folgende Annahmen gemacht: Es existieren zwei Bindungsstellen für beide N-terminalen Fragmente von MutL in einer Untereinheit von MutS (siehe Abbildung 4-I). Die Affinität zu MutL ist in Anwesenheit von ADP jedoch schwach. Zumindest eine der Interaktionsstellen liegt in der Domäne II (*connector*-Domäne)². Eine weitere Interaktionsstelle liegt außerhalb dieser Domäne (wahrscheinlich Domäne III). Diese Annahmen basieren auf einer Deletionsanalyse von Wu und Marinus aus dem Jahre 1999, die gezeigt hat, dass die MutS-MutL-Interaktion (gezeigt durch Co-Affinitätsreinigung) auch mit MutS Varianten möglich ist, denen die Domäne I und II fehlen (MutS Δ 1-260)⁷⁹. Erstaunlicherweise wurde diese Arbeit nicht von Kolodner und Mitarbeiter in ihrer Publikation zitiert.

In Anwesenheit von ADP steht nur ein Teil der Interaktionsstelle von MutS zur Verfügung (*connector*-Domäne), und MutL liegt als offenes Dimer vor (NTD geöffnet). Eine NTD von MutL kann mit MutS interagieren. Da *full-length* MutL vermittelt durch die CTD ein Dimer ist, kann die zweite NTD, in der Nähe der Cysteinreste Cys-427 und Cys-526 ebenfalls zur Interaktion beitragen. Dieser Komplex zwischen MutS und MutL kann sich zwar ausbilden, aber mit geringerer Affinität (geringerer MutS-MutL-Crosslink bei niedriger Konzentration (500 nM), keine Komplexbildung AUZ/FRET Abbildung 3-XVII). Für die isolierte NTD (LN40) ist dies jedoch nicht der Fall, da das Protein weder in Anwesenheit von ADP noch von ATP als Dimer vorliegt (keine MutL-MutL Crosslinkbildung; Abbildung 3-XV). Daher ist dieser Komplex nicht stabil.

In Anwesenheit von ATP erfolgt in MutS eine Konformationsumwandlung, die zur Bildung der sog. *sliding-clamp* führt, welche durch den internen Crosslink zwischen Cys-93 in der

mismatch-Bindungsdomäne und Cys-239 in der *connector*-Domäne gezeigt wurde (Abbildung 3-XXI). Diese Konformationsumwandlung, welche durch das nach außen Klappen der *mismatch*-Bindungsdomäne(n) in MutS entsteht, wurde bereits mehrfach in der Literatur vorgeschlagen und modelliert^{31; 45}. Allerdings konnte die Konformationsumwandlung in die *sliding-clamp* bisher nicht experimentell gezeigt werden¹. Die veränderte Position der *mismatch*-Bindungsdomäne in Richtung der *connector*-Domäne ermöglicht nun eine zusätzliche oder verstärkte Interaktion mit MutL. So wurden Cysteinreste, die in der *mismatch*-Bindungsdomäne liegen, nur in Anwesenheit von DNA und ATP an MutL gecrosslinkt (Abbildung 3-X). Dies kann daran liegen, dass die Cysteinreste in der *mismatch*-Bindungsdomäne nur in die Reichweite des Crosslinkers gelangen, wenn sich die *mismatch*-Bindungsdomäne in Richtung der *connector*-Domäne bewegt und dadurch den Komplex zusätzlich noch stabilisiert. Diese Interaktion erfolgt auch mit der monomeren NTD (LN40), so dass es zur Komplexbildung und damit zur Crosslinkreaktion kommen kann. Da in Anwesenheit von ATP keine Crosslinks zwischen der NTD (LN40) von MutL beobachtet worden sind (Abbildung 3-XV), kann man davon ausgehen, dass das Protein als Monomer vorliegt. Allerdings lässt sich nicht sicher ausschließen, dass es nicht doch zu einer Dimerisierung nach der Bindung an MutS kommt. In Anwesenheit von AMPPNP gilt zunächst Gleiches wie für ATP. Allerdings kann die isolierte NTD (LN40) von MutL mit AMPPNP stabilere Dimere ausbilden⁵⁰, so dass auch LN40^{N131C} mit sich selbst einen Crosslink ausbildet (Abbildung 3-XV). Dieses Dimer interagiert mit MutS besser als die monomere Form von MutL, denn die Crosslinkausbeute zwischen MutS und MutL steigt.

Das Modell in Abbildung 4-I sowie die schematische Darstellung (Abbildung 4-II) der MutS-MutL-Interaktion in Abhängigkeit von ADP bzw. ATP erklärt, dass Cys-131 in MutL sowohl mit Cys-246 und Cys-93 als auch mit den weiter entfernten Cys-427 und Cys-526 im Komplex gecrosslinkt werden kann, und zudem auch noch die Crosslinkreaktion zwischen Cys-162 in MutS mit Cys-135 in MutL möglich ist.

Ein wesentliches Merkmal in diesem Modell ist, dass beide Untereinheiten von MutL mit ihrer NTD mit einer Untereinheit von MutS interagieren müssen.

Zwar überlappen die kugelförmigen Räume um Cys-246 und Cys-526 sowie um Cys-526 und Cys-427, die die mögliche Position von Cys-131 in MutL im Komplex mit MutS angeben. Dies ist allerdings nicht der Fall für Cys-246 und Cys-427. Es ist daher nicht möglich, dass ein und dasselbe Cys-131 in MutL die Crosslinks zu Cys-246 und Cys-427 ausbildet. Viel

¹ Anmerkung: Es ist nicht eindeutig geklärt, ob sich beide *mismatch*-Bindungsdomänen oder nur eine von beiden in diesem ATP-induzierten Schritt bewegen.

wahrscheinlicher ist, dass die Cys-131 aus beiden Untereinheiten des dimeren MutL mit den entsprechenden Cysteinresten in MutS über die Crosslinker verknüpft werden.

Ferner beträgt die maximale Crosslinkausbeute durchschnittlich nicht mehr als 50 %, was sehr gut zu dem vorgeschlagenem Modell passt, in dem nur eine Untereinheit von MutS mit beiden Untereinheiten von MutL im ternären Komplex beteiligt ist. Die Vermutung, dass nur eine Untereinheit von MutS mit MutL interagiert, ist ebenfalls mit den Daten von Kolodner und Mitarbeitern kompatibel, auch wenn in deren Arbeit nicht *E. coli* MutS sondern das humane MutSa, welches als Heterodimer vorliegt, verwendet wurde. Verschiedene Punktmutationen in der *connector*-Domäne von MSH2, aber nicht MSH6, führten zu einem Mutatorphänotyp (*in vivo* Komplementationsassay, Abschnitt 2.3.8)². Ferner ist die Interaktion des Fusionsproteins (MBP-MSH2) aus Maltosebindeprotein (MBP) und MSH2 (Aminosäurereste 121-294), mit MutLa *in vitro* viel stärker als die mit MBP-MSH6 (Aminosäurereste 420-613)². Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die MSH2 Untereinheit mit MutLa interagiert. Überträgt man diese Daten auf die *E. coli* Proteine, bedeutet dies, dass eine Untereinheit die Fehlpaarung erkennt und die andere mit MutL interagiert. Es liegt nahe zu spekulieren, dass die Untereinheit B mit MutL interagiert, wobei die Untereinheit A die Fehlpaarung erkennt. Um diese Spekulation experimentell zu bestätigen, wäre es notwendig, ein heterodimeres *E. coli* MutS zu erzeugen (Abbildung 4-III), z. B. könnte eine Untereinheit aus dem cysteinfreien MutS stammen (Untereinheit A in Grün) während die andere Untereinheit zwei Mutationen tragen müsste: Einen Cysteinrest an der Position 246 und einen Austausch von Phe-36 gegen Alanin (Untereinheit B in Blau). Ein MutS-MutL-Crosslink sollte sich dann bilden, wenn die Untereinheit mit den Mutationen als Untereinheit B fungiert und diese Untereinheit auch die Interaktion mit MutL eingeht. Dies würde aber die Möglichkeit nicht ausschließen, dass MutL auch mit der Untereinheit A interagieren kann.

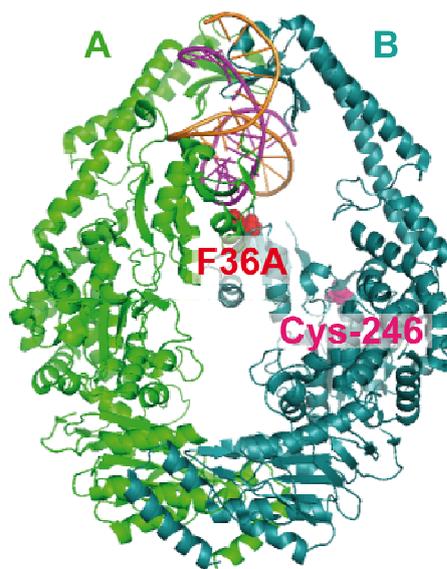


Abbildung 4-III: Darstellung eines MutS Heterodimers

Die Untereinheit A (MutS^{CF}) ist in Grün und die Untereinheit B (Cys-246/Ala-36 MutS Mutante) in Blau dargestellt. Die Aminosäurereste 246 und 36 sind respektive in Pink und Rot und die DNA in Violett und Orange gezeigt. Erstellt in PyMol (pdb 1e3m).

Die ATP-induzierte Bildung der sog. MutS *sliding-clamp* ist eines der wesentlichen Merkmale der *mismatch*-Erkennung von MutS¹. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein direkter experimenteller Nachweis für eine *mismatch*- und ATP-induzierte Konformationsumwandlung in MutS, die eine Bewegung der *mismatch*-Bindungsdomäne von der DNA zur *connector*-Domäne beinhaltet, erbracht werden. Interessanterweise lag die Crosslinkausbeute für den internen Crosslink zwischen Cys-93 (*mismatch*-Bindungsdomäne) und Cys-239 (*connector*-Domäne) bei 50 %, ähnlich wie die Crosslinkausbeute von MutS mit MutL bei 50 % lag. Daher stellt sich auch hier, wie bereits oben für die MutS-MutL-Interaktion diskutiert, die Frage, in welcher der beiden MutS Untereinheiten dieser Crosslink auftritt (unter der Annahme, dass die Ausbeute von 50 % in der Tat einen Maximalwert darstellt). In diesem Zusammenhang sind die Modifikationsexperimente von Cys-246 interessant, das aufgrund der höchsten Crosslinkausbeute am dichtesten am Cys-131 und damit in unmittelbarer Nähe zu MutL liegen muss. Nach Modifikation mit dem Fluorophor Alexa 594 konnte eine DNA- und ATP-abhängige Interaktion mit MutL (markiert an Cys-297 mit Alexa 488) mittels FRET eindeutig gezeigt werden (Abbildung 3-XVIII). Aufgrund dieser Daten kann man fast sicher ausschließen, dass die Modifikation von Cys-246 die Interaktion zwischen MutS und MutL sowie die dafür notwendige ATP-induzierte Konformationsumwandlung in MutS beeinträchtigt. Damit ist Cys-246 nicht direkt an der Interaktion mit MutL beteiligt, sondern liegt vielmehr in der Nähe der eigentlichen Interaktionsstelle. Überraschenderweise zeigte

diese modifizierte Variante jedoch eine veränderte ATP-abhängige Interaktion mit DNA (es wurde mehr Komplex gebildet als im Vergleich mit der ebenfalls an Cys-449 modifizierten MutS Variante, Abbildung 3-XVI). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Modifikation von Cys-246 zumindest teilweise die ATP-induzierte Ausbildung der *sliding-clamp* beeinträchtigt, indem die Modifikation die Beweglichkeit der *mismatch*-Bindungsdomäne verringert. Diese Beobachtung passt zu einer aktuellen Studie ebenfalls aus der Kolodner-Gruppe, die ATPase Varianten von MutS α identifiziert haben, die zwar noch mit MutL interagieren, allerdings keine *sliding-clamp* ausbilden können⁹⁵. Interessanterweise benötigt man zur ternären Komplexbildung nur die ATP-Bindung in der MSH6 Untereinheit von MutS α (entsprechend Unterheit B in *E. coli* MutS), wohingegen ATP-Bindung in MSH6 und MSH2 für die Ausbildung der *sliding-clamp* notwendig ist.

Diese Beobachtungen passen gut zu den Ergebnissen der MutS/MutL-abhängigen Aktivierung der Endonuklease MutH mit unmodifizierten und modifizierten Varianten (Abschnitt 2.3.17). Dabei fiel auf, dass MutS^{R449C/D835R} in der MutH-Aktivierung und die damit verbundene DNA-Spaltung zwischen unmodifizierter und modifizierter Variante keinen Unterschied aufwies (Abbildung 3-XX). Daraus lässt sich schließen, dass die Fluorophormodifikation an sich keinen Einfluss auf die Aktivierung von MutH hat, und die notwendigen Interaktionen (MutS-MutL, MutL-MutH) und Konformationsumwandlungen (z. B. *sliding-clamp* Bildung) nicht eingeschränkt sind. Dafür sprechen ebenfalls die Ergebnisse der DNA-Bindungs-, DNA-Biegungs- und Dissoziationsgeschwindigkeits-experimente, die keine Unterschiede zwischen der nicht markierten und markierten Variante zeigten (siehe Anhang). Es wurde zwar nur ein geringer FRET zum an Cys-297 mit Alexa-488 modifizierten MutL beobachtet, was aber angesichts des im strukturellen Modell bestimmten Abstands zwischen Cys-449 in MutS und Cys-297 nicht anders erwartet worden ist (Abbildung 3-XVIII). Damit wird auch bestätigt, dass Cys-449 nicht innerhalb und auch nicht in der näheren Umgebung der Interaktionsstelle zwischen MutS und MutL liegt. Im Gegensatz dazu weist die modifizierte MutS^{D246C/D835R} Variante eine um mindestens 10fach schlechtere MutH-Aktivierung auf als die unmodifizierte MutS Variante. Da die MutS-MutL-Interaktion (gemessen mittels FRET, Abbildung 3-XVIII) keinen Defekt in der ternären Komplexbildung nahelegt, die ATP-induzierte Dissoziation von der DNA aber offensichtlich gestört ist (Abbildung 3-XVII), könnte in der Tat die Modifikation von Cys-246, das in unmittelbare Nähe zur *mismatch*-Bindungsdomäne liegt, die ATP-induzierte Ausbildung der *sliding-clamp* stören. Dies hätte dann zur Folge, dass sich der ternäre Komplex nicht, wie es vielfach vermutet wird, auf der DNA bewegen kann, um an der nächstgelegenen (in diesem Fall 179 bp entfernten)

GATC-Sequenz die Endonuklease MutH zu aktivieren. Die noch vorhandene Restaktivität der MutH-Aktivierung lässt sich durch die nicht vollständige Modifizierung von MutS am Cys-246 erklären. Die hier verwendeten MutS Varianten wiesen einen Markierungsgrad von 95 % auf. Dadurch liegen im Dimer 10 % der Proteine ohne Markierung oder mit nur in einer Untereinheit markiertem Cysteinrest vor. Geht man nun davon aus, dass die Modifikation die MutS-MutL-Interaktion nicht stört, könnten daher 10 % der Moleküle nach MutL-Bindung an die modifizierte Untereinheit noch mit ihrer nicht-modifizierten Untereinheit (wahrscheinlich Untereinheit A) die *sliding-clamp* ausbilden und zur Aktivierung von MutH beitragen. Die im Assay erhaltene Restspaltung entspricht etwa diesen maximal 10 %, daher kann man durchaus davon ausgehen, dass bei 100 % Markierung auch keine Restspaltung mehr zu erkennen wäre. Ein weiterer Aspekt, der nicht vergessen werden sollte, ist, dass die Modifikation die Bewegung nicht vollständig einschränkt, da der Fluorophor etwas seitlich im Bereich der Bewegungsfreiheit der *mismatch*-Bindungsdomäne liegt. Da keine Einschränkung der DNA-Bindung oder -Biegung beobachtet wird, aber eine eingeschränkte bzw. veränderte Dissoziation von der DNA, scheint es (Abbildung 3-XVII), dass das Ausklappen der *mismatch*-Bindungsdomäne und damit die Konformationsumwandlung in die *sliding-clamp* nicht oder nur schlecht stattfindet.

Das auf den Crosslinkexperimenten und Fluoreszenzassays basierende Modell für den Interaktionsbereich zwischen MutS und MutL konnte die Interaktionsstelle zwar eingrenzen, die Daten sind aber noch nicht ausreichend für eine detaillierte Bestimmung der Interaktionsstelle bzw. der Orientierung von MutL relativ zu MutS. Die hier gezeigte Strategie legt nahe, dass mit weiteren, ähnlichen Experimenten, z. B. weiteren FRET-Messungen mit an unterschiedlichen Positionen markierten Proteinen (z. B. Cys-4 oder Cys-118; Abbildung 4-IV) bzw. Crosslinkexperimenten mit Doppelcysteinvarianten, z. B. Cys-246/Cys-427, eine aussagekräftige bioinformatische Analyse mittels *docking*-Programmen möglich sein sollte.

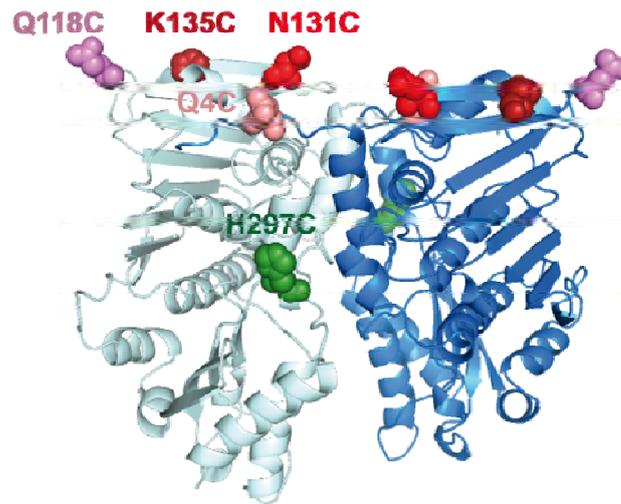


Abbildung 4-IV: SC-MutL Varianten für weitere FRET-Messungen

Dargestellt ist LN40 (pdb 1b63) von MutL. Die Ketten A und B sind respektive in Hellblau und in Dunkelblau gezeigt. In Kalottendarstellung sind die über Mutagenese zu Cysteinresten ausgetauschten Aminosäurereste an den Positionen 4 (Rosa), 118 (Violett), 131 (Rot), 135 (Dunkelrot) und 297 (Grün) hervorgehoben.

Weitere, sehr viel versprechende Möglichkeiten bestehen darin, den kovalenten Komplex zu reinigen und ihn dann z. B. zu kristallisieren oder in Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimenten (SAXS) bzw. Cryo-Elektronenmikroskopieanalysen einzusetzen, um die Struktur des Komplexes zu erhalten. Außerdem ließen sich mit dem hier entwickelten FRET-Assay eine Reihe von Fragen zur Dynamik der Komplexe, z. B. *stopped-flow* Experimente bis hin zu Einzelmolekülexperimenten, z. B. in Kombination von Rasterkraftmikroskopie mit Fluoreszenz (FIONA), beantworten.

In Kombination des vorhandenen Wissens zur Protein-Protein Interaktion zwischen MutS und MutL und Crosslinken von MutL und MutH^{55; 96} auf der einen Seite sowie auf der anderen Seite zum Crosslink von MutS und DNA (Roger Heinze/Peter Friedhoff, persönliche Mitteilung), scheint es durchaus denkbar, den ternären oder gar quaternären Komplex aus DNA, MutS, MutL und MutH mittels Crosslink kovalent darzustellen und strukturell zu charakterisieren. Es sind zwar noch viele Fragen im Basenfehlpaarungskorrektursystem offen, es ist aber im Rahmen dieser Arbeit gelungen, der Struktur des MutS-MutL-DNA-Komplexes entscheidende Schritte näherzukommen und eine methodische Vorgehensweise darzulegen, die für die Untersuchung transienter Komplexe im Allgemeinen eine attraktive Alternative darstellen kann.

5 Zusammenfassung

Ein wichtiger Schritt im *mismatch*-Reparatur System (MMR) ist die Ausbildung des ternären Komplexes aus MutS, MutL und DNA nach der Erkennung der Fehlpaarung durch MutS. Dieser transiente Komplex soll in der Folge weitere Reparaturproteine aktivieren bzw. koordinieren. Zwar sind Kristallstrukturen für die einzelnen *E. coli* MMR-Proteine MutS und MutL seit über 10 Jahren bekannt, nicht jedoch die Struktur des Komplexes. Eines der Hauptprobleme ist dabei die Dynamik des Komplexes. In der hier vorliegenden Arbeit wurden strukturelle und funktionelle Informationen zur ternären Komplexbildung der *E. coli* MMR-Proteine MutS und MutL mit DNA erarbeitet und ein Strukturmodell erstellt.

Die Methoden der Wahl waren dabei chemisches Modifizieren mit Fluoreszenzfarbstoffen und cysteinspezifisches Quervernetzen (*crosslinking*) von endogen vorhandenen oder durch zielgerichtete Mutagenese in MutS und MutL eingeführten Cysteinresten. Auf diese Weise wurden Positionen in den Proteinen bestimmt, die in der Nähe der Proteininteraktionsstellen von MutS bzw. MutL liegen. Ferner konnte der Komplex durch das chemische Quervernetzen stabilisiert werden, so dass der Komplex derzeit in hochauflösenden strukturellen Methoden, wie Kristallisation oder Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) analysiert werden kann.

MutS besteht aus sieben Domänen. Es wurden Einzelcysteinvarianten mit einem Cysteinrest in jeweils einer dieser Domänen mit Ausnahme der C-terminalen Dimerisierungsdomäne über zielgerichtete Mutagenese hergestellt. Mit Hilfe der Crosslinkexperimenten konnte gezeigt werden, dass Positionen in der ATPase Domäne im N-terminalen Fragment von MutL (Aminosäurereste 1 - 200), insbesondere die Positionen 131 und 135 in räumlicher Nähe zu den Positionen 8, 78 und 93 in der *mismatch*-Bindungsdomäne (MBD, Aminosäurereste 1 - 115) von MutS liegen.

Diese Crosslinkreaktionen sind offenbar hoch spezifisch, denn die Crosslinks zwischen MutS und MutL bilden sich nur unter Bedingungen aus, die für die ternäre Komplexbildung notwendig sind, d. h. in Anwesenheit von ATP- und *mismatch*-DNA.

Ein weiterer kovalenter Komplex von MutS und MutL konnte erzeugt werden, wenn MutS Varianten eingesetzt wurden, in denen ein Cysteinrest entweder in der für die an der Interaktion beteiligten *connector*-Domäne (116 - 266)² oder in der strukturell angrenzenden *core/levers*-Domäne (267 - 443 und 504 - 567) vorhanden ist. Interessanterweise war diese Crosslinkreaktion zwar DNA-abhängig, konnte aber auch mit ADP anstelle von ATP beobachtet werden. Dieses Ergebnis war für die Erstellung eines Strukturmodells des

MutS-MutL-Komplexes hilfreich, da im Gegensatz zur *mismatch*-Bindungsdomäne die *connector*-Domäne sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von DNA und unabhängig von der Nukleotidbindung strukturell unverändert vorliegt.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die *mismatch*- und ATP-induzierte interne Crosslinkreaktion von MutS zwischen Cys-93 in der *mismatch*-Bindungsdomäne und Cys-239 in der *connector*-Domäne. Dieses Resultat ist der erste direkte experimentelle Hinweis auf eine seit langem postulierte ATP-induzierte Konformationsumwandlung der *mismatch*-Bindungsdomäne weg von der DNA und hin zur *connector*-Domäne.

Die Crosslinkergebnisse konnten durch chemisches Modifizieren der Proteine und anschließende Funktionsanalysen von MutS und MutL, z. B. in der MutS/MutL-abhängigen Aktivierung der Endonuklease MutH sowie durch analytische Ultrazentrifugationsstudien mit Fluoreszenzdetektion (in Zusammenarbeit mit Dr. Ute Curth, Hannover) bestätigt werden. Zum Schluss war es möglich, auf der Basis der vorhandenen Ergebnisse die mögliche Interaktionsstelle zwischen MutS und MutL präziser als bisher festzulegen. Allerdings ist es bislang nicht gelungen, über Protein-Protein-Docking, *in silico* ein Modell für die Interaktion zwischen MutS und MutL zu erstellen, da die Orientierung von MutL nicht ausreichend eingegrenzt werden konnte. Die vorhandenen Daten sind aber ein vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. & Modrich, P. L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* **106**, 302-23.
2. Mendillo, M. L., Hargreaves, V. V., Jamison, J. W., Mo, A. O., Li, S., Putnam, C. D., Woods, V. L., Jr. & Kolodner, R. D. (2009). A conserved MutS homolog connector domain interface interacts with MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 22223-8.
3. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002). Biochemie. *Spektrum Verlag* **Fifth Edition**.
4. Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-74.
5. Friedberg, E. C., Walker, G. C. (2006). DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press* **Second Edition**.
6. Modrich, P. & Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65**, 101-33.
7. Kolodner, R. D. & Marsischky, G. T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 89-96.
8. Harfe, B. D. & Jinks-Robertson, S. (2000). DNA MISMATCH REPAIR AND GENETIC INSTABILITY. *Annual Review of Genetics* **34**, 359-399.
9. Kunkel, T. A. & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**, 681-710.
10. Stojic, L., Brun, R. & Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1091-101.
11. Schofield, M. J. & Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* **57**, 579-608.
12. Jun, S. H., Kim, T. G. & Ban, C. (2006). DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J* **273**, 1609-19.
13. Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 335-46.
14. Lahue, R. S., Au, K. G. & Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science* **245**, 160-4.
15. Constantin, N., Dzantiev, L., Kadyrov, F. A. & Modrich, P. (2005). Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *J Biol Chem* **280**, 39752-61.
16. Santucci-Darmanin, S., Walpita, D., Lespinasse, F., Desnuelle, C., Ashley, T. & Paquis-Flucklinger, V. (2000). MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J* **14**, 1539-47.
17. Svetlanov, A. & Cohen, P. E. (2004). Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp Cell Res* **296**, 71-9.
18. Yang, W. (2007). Human MutLalpha: the jack of all trades in MMR is also an endonuclease. *DNA Repair (Amst)* **6**, 135-9.
19. Lamers, M. H., Perrakis, A., Enzlin, J. H., Winterwerp, H. H., de Wind, N. & Sixma, T. K. (2000). The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature* **407**, 711-7.
20. Grilley, M., Griffith, J. & Modrich, P. (1993). Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **268**, 11830-7.

21. Dao, V. & Modrich, P. (1998). Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. *J Biol Chem* **273**, 9202-7.
22. Yamaguchi, M., Dao, V. & Modrich, P. (1998). MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J Biol Chem* **273**, 9197-201.
23. Matson, S. W. & Robertson, A. B. (2006). The UvrD helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res* **34**, 4089-97.
24. Szczelkun, M. D., Friedhoff, P. & Seidel, R. Maintaining a sense of direction during long-range communication on DNA. *Biochem Soc Trans* **38**, 404-9.
25. Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P. & Yang, W. (2000). Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* **407**, 703-10.
26. Mendillo, M. L., Putnam, C. D. & Kolodner, R. D. (2007). Escherichia coli MutS tetramerization domain structure reveals that stable dimers but not tetramers are essential for DNA mismatch repair in vivo. *J Biol Chem* **282**, 16345-54.
27. Junop, M. S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P. & Yang, W. (2001). Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol Cell* **7**, 1-12.
28. Lamers, M. H., Winterwerp, H. H. & Sixma, T. K. (2003). The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *Embo J* **22**, 746-56.
29. Alani, E., Lee, J. Y., Schofield, M. J., Kijas, A. W., Hsieh, P. & Yang, W. (2003). Crystal structure and biochemical analysis of the MutS.ADP.beryllium fluoride complex suggests a conserved mechanism for ATP interactions in mismatch repair. *J Biol Chem* **278**, 16088-94.
30. Natrajan, G., Lamers, M. H., Enzlin, J. H., Winterwerp, H. H., Perrakis, A. & Sixma, T. K. (2003). Structures of Escherichia coli DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res* **31**, 4814-21.
31. Lamers, M. H., Georgijevic, D., Lebbink, J. H., Winterwerp, H. H., Agianian, B., de Wind, N. & Sixma, T. K. (2004). ATP increases the affinity between MutS ATPase domains. Implications for ATP hydrolysis and conformational changes. *J Biol Chem* **279**, 43879-85.
32. Yamamoto, A., Schofield, M. J., Biswas, I. & Hsieh, P. (2000). Requirement for Phe36 for DNA binding and mismatch repair by Escherichia coli MutS protein. *Nucleic Acids Res* **28**, 3564-9.
33. Drotschmann, K., Yang, W., Brownwell, F. E., Kool, E. T. & Kunkel, T. A. (2001). Asymmetric recognition of DNA local distortion. Structure-based functional studies of eukaryotic Msh2-Msh6. *J Biol Chem* **276**, 46225-9.
34. Lebbink, J. H., Georgijevic, D., Natrajan, G., Fish, A., Winterwerp, H. H., Sixma, T. K. & de Wind, N. (2006). Dual role of MutS glutamate 38 in DNA mismatch discrimination and in the authorization of repair. *Embo J*.
35. Bjornson, K. P., Blackwell, L. J., Sage, H., Baitinger, C., Allen, D. & Modrich, P. (2003). Assembly and molecular activities of the MutS tetramer. *J Biol Chem* **278**, 34667-73.
36. Wang, H., Yang, Y., Schofield, M. J., Du, C., Fridman, Y., Lee, S. D., Larson, E. D., Drummond, J. T., Alani, E., Hsieh, P. & Erie, D. A. (2003). DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14822-7.
37. Calmann, M. A., Nowosielska, A. & Marinus, M. G. (2005). Separation of mutation avoidance and antirecombination functions in an Escherichia coli mutS mutant. *Nucleic Acids Res* **33**, 1193-200.

38. Calmann, M. A., Nowosielska, A. & Marinus, M. G. (2005). The MutS C terminus is essential for mismatch repair activity in vivo. *J Bacteriol* **187**, 6577-9.
39. Manelyte, L., Urbanke, C., Giron-Monzon, L. & Friedhoff, P. (2006). Structural and functional analysis of the MutS C-terminal tetramerization domain. *Nucleic Acids Res* **34**, 5270-9.
40. Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1990). Superfamily of UvrA-related NTP-binding proteins. Implications for rational classification of recombination/repair systems. *J Mol Biol* **213**, 583-91.
41. Mazur, D. J., Mendillo, M. L. & Kolodner, R. D. (2006). Inhibition of Msh6 ATPase activity by mispaired DNA induces a Msh2(ATP)-Msh6(ATP) state capable of hydrolysis-independent movement along DNA. *Mol Cell* **22**, 39-49.
42. Acharya, S., Foster, P. L., Brooks, P. & Fishel, R. (2003). The coordinated functions of the E. coli MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Mol Cell* **12**, 233-46.
43. Blackwell, L. J., Bjornson, K. P., Allen, D. J. & Modrich, P. (2001). Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *J Biol Chem* **276**, 34339-47.
44. Biswas, I. & Vijayvargia, R. (2000). Heteroduplex DNA and ATP induced conformational changes of a MutS mismatch repair protein from *Thermus aquaticus*. *Biochem J* **347 Pt 3**, 881-6.
45. Mukherjee, S., Law, S. M. & Feig, M. (2009). Deciphering the mismatch recognition cycle in MutS and MSH2-MSH6 using normal-mode analysis. *Biophys J* **96**, 1707-20.
46. Sancar, A. & Hearst, J. E. (1993). Molecular matchmakers. *Science* **259**, 1415-20.
47. Ban, C., Junop, M. & Yang, W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* **97**, 85-97.
48. Hall, M. C. & Matson, S. W. (1999). The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. *J Biol Chem* **274**, 1306-12.
49. Toedt, G. H., Krishnan, R. & Friedhoff, P. (2003). Site-specific protein modification to identify the MutL interface of MutH. *Nucleic Acids Res* **31**, 819-25.
50. Ban, C. & Yang, W. (1998). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95**, 541-52.
51. Guarne, A., Junop, M. S. & Yang, W. (2001). Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. *Embo J* **20**, 5521-31.
52. Guarne, A., Ramon-Maiques, S., Wolff, E. M., Ghirlando, R., Hu, X., Miller, J. H. & Yang, W. (2004). Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *Embo J* **23**, 4134-45.
53. Kosinski, J., Steindorf, I., Bujnicki, J. M., Giron-Monzon, L. & Friedhoff, P. (2005). Analysis of the quaternary structure of the MutL C-terminal domain. *J Mol Biol* **351**, 895-909.
54. Jacquelin, D. K., Filiberti, A., Argarana, C. E. & Barra, J. L. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* MutL protein functions in *Escherichia coli*. *Biochem J* **388**, 879-87.
55. Giron-Monzon, L., Manelyte, L., Ahrends, R., Kirsch, D., Spengler, B. & Friedhoff, P. (2004). Mapping protein-protein interactions between MutL and MutH by cross-linking. *J Biol Chem* **279**, 49338-45.
56. Robertson, A., Pattishall, S. R. & Matson, S. W. (2006). The DNA binding activity of MutL is required for methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*.
57. Kadyrov, F. A., Dzantiev, L., Constantin, N. & Modrich, P. (2006). Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* **126**, 297-308.
58. Grilley, M., Welsh, K. M., Su, S. S. & Modrich, P. (1989). Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product. *J Biol Chem* **264**, 1000-4.

59. Drotschmann, K., Aronshtam, A., Fritz, H. J. & Marinus, M. G. (1998). The *Escherichia coli* MutL protein stimulates binding of Vsr and MutS to heteroduplex DNA. *Nucleic Acids Res* **26**, 948-53.
60. Selmane, T., Schofield, M. J., Nayak, S., Du, C. & Hsieh, P. (2003). Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. *J Mol Biol* **334**, 949-65.
61. Joseph, N., Duppatla, V. & Rao, D. N. (2006). Prokaryotic DNA mismatch repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **81**, 1-49.
62. Friedhoff, P., Thomas, E. & Pingoud, A. (2003). Tyr212: a key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MutH. *J Mol Biol* **325**, 285-97.
63. Au, K. G., Welsh, K. & Modrich, P. (1992). Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **267**, 12142-8.
64. Yang, W. (2000). Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat Res* **460**, 245-56.
65. Lee, J. Y., Chang, J., Joseph, N., Ghirlando, R., Rao, D. N. & Yang, W. (2005). MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage. *Mol Cell* **20**, 155-66.
66. Banerjee, A., Santos, W. L. & Verdine, G. L. (2006). Structure of a DNA glycosylase searching for lesions. *Science* **311**, 1153-7.
67. Banerjee, A. & Verdine, G. L. (2006). A nucleobase lesion remodels the interaction of its normal neighbor in a DNA glycosylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15020-5.
68. Corn, J. E. & Berger, J. M. (2007). FASTDXL: a generalized screen to trap disulfide-stabilized complexes for use in structural studies. *Structure* **15**, 773-80.
69. Corn, J. E., Pelton, J. G. & Berger, J. M. (2008). Identification of a DNA primase template tracking site redefines the geometry of primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 163-9.
70. Hino, N., Okazaki, Y., Kobayashi, T., Hayashi, A., Sakamoto, K. & Yokoyama, S. (2005). Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid. *Nat Methods* **2**, 201-6.
71. Farrell, I. S., Toroney, R., Hazen, J. L., Mehl, R. A. & Chin, J. W. (2005). Photo-cross-linking interacting proteins with a genetically encoded benzophenone. *Nat Methods* **2**, 377-84.
72. Cristovao, M. (2009). Conformational changes in DNA and MutS during mismatch repair in *E. coli*, analyzed by fluorescence spectroscopy. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität.
73. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., and Seidman, J. G. . (1992-2005). *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, New York
74. Feng, G. & Winkler, M. E. (1995). Single-step purifications of His₆-MutH, His₆-MutL and His₆-MutS repair proteins of *Escherichia coli* K-12. *Biotechniques* **19**, 956-965.
75. Cupples, C. G. & Miller, J. H. (1989). A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ISSN (PRINT VERSION): 0027 8424* **86**, 5345-9.
76. Thomas, E., Pingoud, A. & Friedhoff, P. (2002). An efficient method for the preparation of long heteroduplex DNA as substrate for mismatch repair by the *Escherichia coli* MutHLS system. *Biol Chem* **383**, 1459-62.
77. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.

78. Kirsch, R. D. & Joly, E. (1998). An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res* **26**, 1848-50.
79. Wu, T. H. & Marinus, M. G. (1999). Deletion mutation analysis of the mutS gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 5948-52.
80. Loh, T., Murphy, K. C. & Marinus, M. G. (2001). Mutational analysis of the MutH protein from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**, 12113-9.
81. Loo, T. W. & Clarke, D. M. (2001). Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem* **276**, 36877-80.
82. Giron-Monzon, L. (2006). Structural and Functional Studies of the Mismatch Repair System from *Escherichia coli*, Justus-Liebig-Universität.
83. Durchschlag, H. (1986). Specific volumes of biological macromolecules and some other molecules of biological interest. In *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology*. Springer Verlag.
84. Thomas, E., Pingoud, A. & Friedhoff, P. (2002). An efficient method for the preparation of long heteroduplex DNA as substrate for mismatch repair by the *Escherichia coli* MutHLS system. *Biol Chem* **383**, 1459-1462.
85. Smith, J. & Modrich, P. (1996). Mutation detection with MutH, MutL, and MutS mismatch repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4374-9.
86. Yang, Y., Sass, L. E., Du, C., Hsieh, P. & Erie, D. A. (2005). Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules: MutS-DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **33**, 4322-34.
87. Jung, C. P. (2009). Untersuchung des Mechanismus der Signalweiterleitung zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz im bakteriellen mismatch-Reparatursystem Inauguraldissertation Justus-Liebig-Universität.
88. Plotz, G., Welsch, C., Giron-Monzon, L., Friedhoff, P., Albrecht, M., Piiper, A., Biondi, R. M., Lengauer, T., Zeuzem, S. & Raedle, J. (2006). Mutations in the MutSalph interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Res* **34**, 6574-86.
89. Jacobs-Palmer, E. & Hingorani, M. M. (2007). The effects of nucleotides on MutS-DNA binding kinetics clarify the role of MutS ATPase activity in mismatch repair. *J Mol Biol* **366**, 1087-98.
90. Feng, G. & Winkler, M. E. (1995). Single-step purifications of His6-MutH, His6-MutL and His6-MutS repair proteins of *Escherichia coli* K-12. *Biotechniques* **19**, 956-65.
91. Pluciennik, A., Burdett, V., Lukianova, O., O'Donnell, M. & Modrich, P. (2009). Involvement of the beta clamp in methyl-directed mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* **284**, 32782-91.
92. Manelyte, L. (2006). Structural and functional analysis of MutS, a mismatch repair protein from *E. coli*, Justus-Liebig-Universität.
93. Sacho, E. J., Kadyrov, F. A., Modrich, P., Kunkel, T. A. & Erie, D. A. (2008). Direct visualization of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha. *Mol Cell* **29**, 112-21.
94. Galio, L., Bouquet, C. & Brooks, P. (1999). ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. *Nucleic Acids Res* **27**, 2325-31.
95. Hargreaves, V. V., Shell, S. S., Mazur, D. J., Hess, M. T. & Kolodner, R. D. Interaction between the Msh2 and Msh6 nucleotide-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* Msh2-Msh6 complex. *J Biol Chem* **285**, 9301-10.

96. Ahrends, R., Kosinski, J., Kirsch, D., Manelyte, L., Giron-Monzon, L., Hummerich, L., Schulz, O., Spengler, B. & Friedhoff, P. (2006). Identifying an interaction site between MutH and the C-terminal domain of MutL by crosslinking, affinity purification, chemical coding and mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **34**, 3169-80.

7 Anhang

7.1 Zusatzinformationen

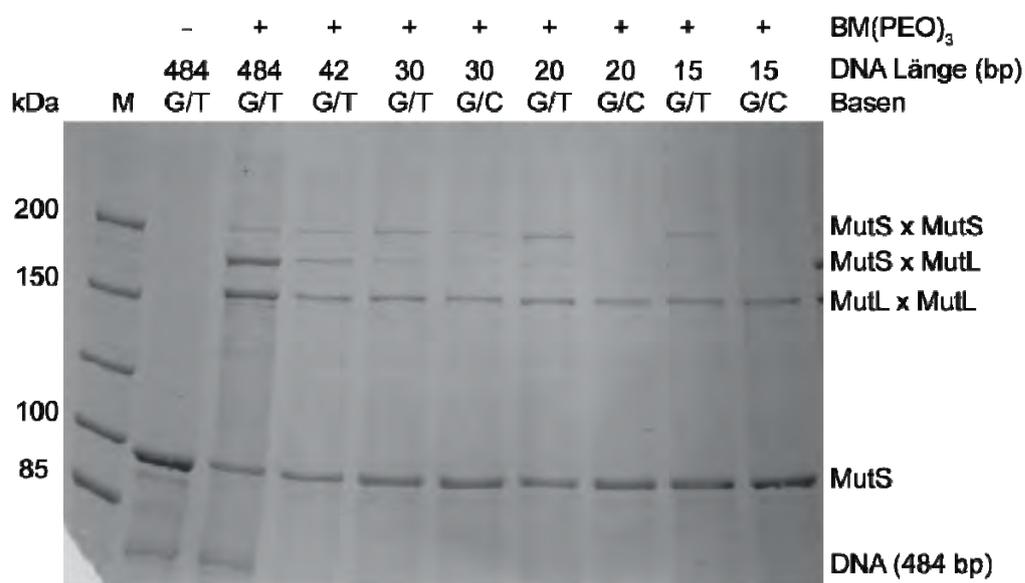


Abbildung 7-I: Crosslink zwischen MutS^{WT} und MutL^{N131C} in Anwesenheit von unterschiedlich langen Hetero- oder homoduplex DNA-Substraten

Die Crosslinkexperimente wurden, wie in Abschnitt 2.1.10 beschrieben, in Anwesenheit von 500 nM DNA, 400 nM MutS, 1 μ M MutL, 1 mM ATP, 125 mM KCl, 50 μ M BM[PEO]₃ und 1 x Bindungspuffer Grün durchgeführt. Die Proben wurden auf einem 6 % SDS-Gel mit anschließender CoomassieFärbung analysiert.

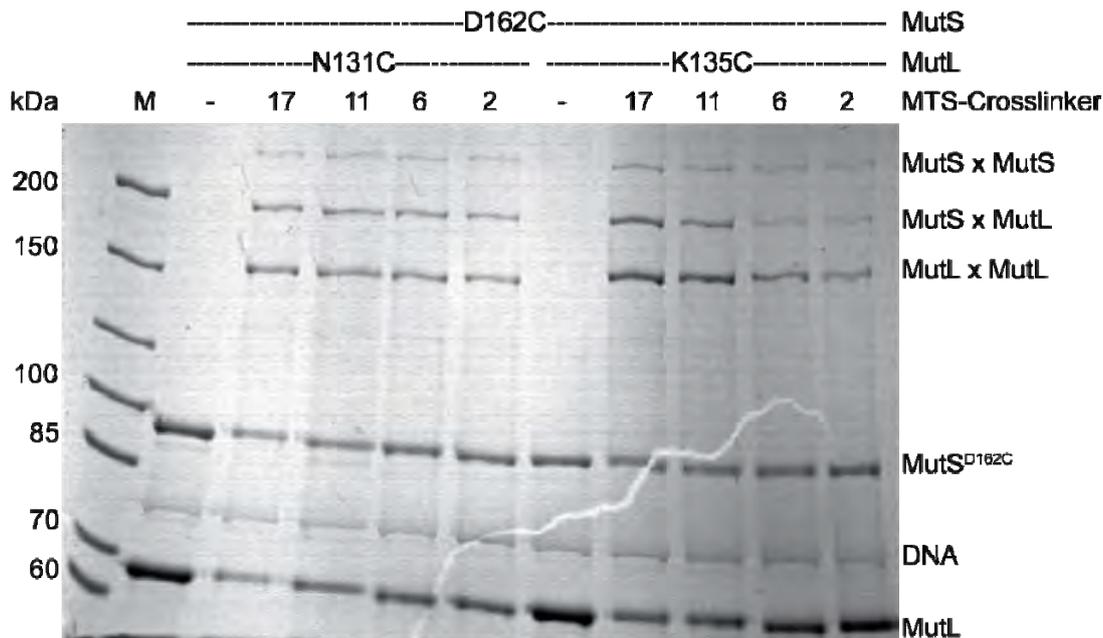


Abbildung 7-II: Crosslink zwischen MutS^{D162C} und MutL^{N131C} bzw. MutL^{K135C} mit unterschiedlich langen Methanthiosulfonat-Crosslinker (MTS)

Die Crosslinkexperimente wurden, wie in Abschnitt 2.1.10 beschrieben, in Anwesenheit von 500 nM DNA, 400 nM MutS, 1 μM MutL, 1 mM ATP, 125 mM KCl, 50 μM BM[PEO]₃ und 1 x Bindungspuffer Grün durchgeführt. Die Proben wurden auf einem 6 % SDS-Gel mit anschließender CoomassieFärbung analysiert.

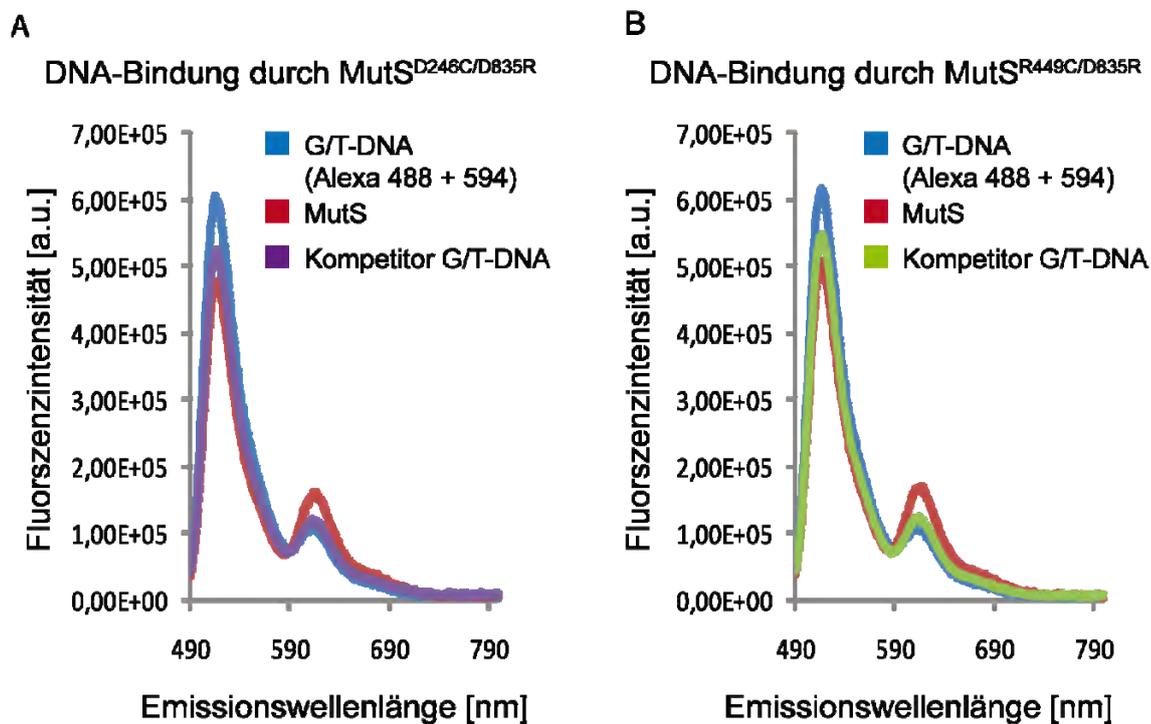


Abbildung 7-III: DNA-Bindung von MutS^{D246C/D835R} oder MutS^{R449C/D835R} gemessen durch FRET

Zu erst wurden 50 nM doppelmarkierte 42 bp heteroduplex DNA gemessen, danach wurden 100 nM MutS^{D246C/D835R} (A) und MutS^{R449C/D835R} (B) dazugegeben und das Fluoreszenzsignal gemessen und im letzten Schritt wurde ein hoher Überschuss (2 μM) an unmarkierter G/T-DNA dazugegeben. Die Anregungswellenlänge für den Donor betrug 470 nm.

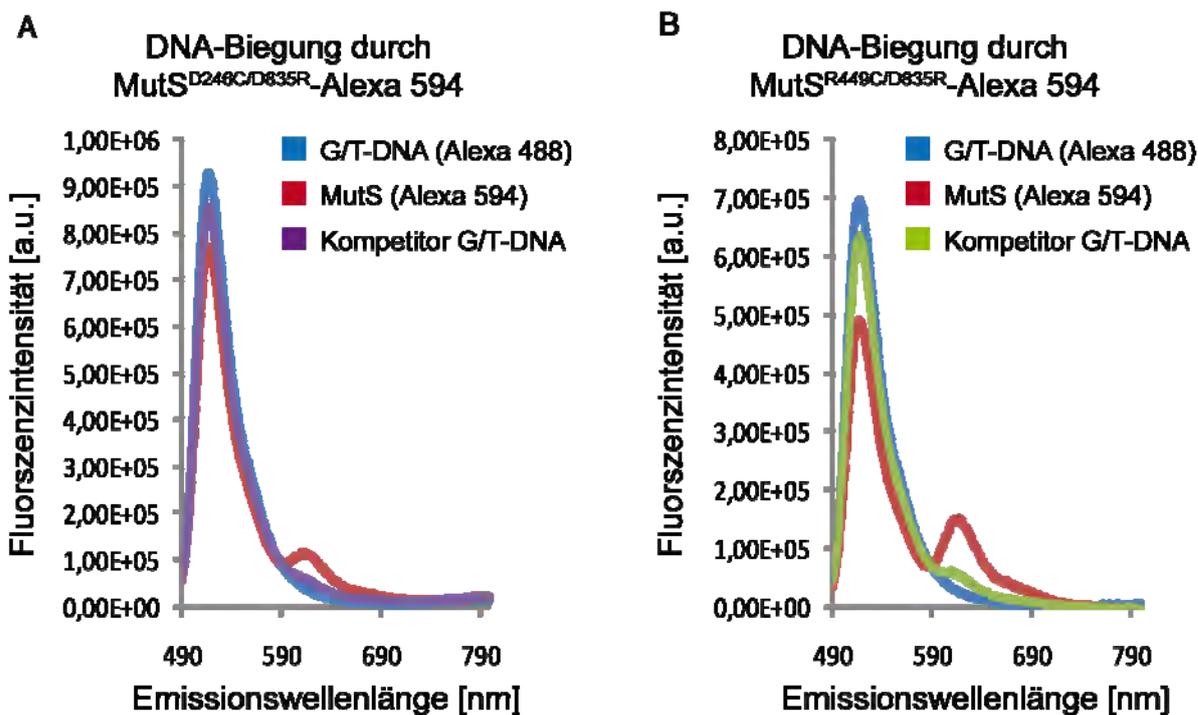


Abbildung 7-IV: DNA-Biegung nach DNA-Bindung durch MutS^{D246C/D835R} oder MutS^{R449C/D835R} gemessen durch FRET

Zu erst wurden 50 nM mit Alexa 488 modifizierte 42 bp heteroduplex DNA gemessen, danach wurden 100 nM mit Alexa 594 modifiziertes MutS^{D246C/D835R} (A) und MutS^{R449C/D835R} (B) dazugegeben und das Fluoreszenzsignal gemessen und im letzten Schritt wurde ein hoher Überschuss (2 μ M) an unmarkierter G/T-DNA dazugegeben. Die Anregungswellenlänge für den Donor betrug 470 nm.

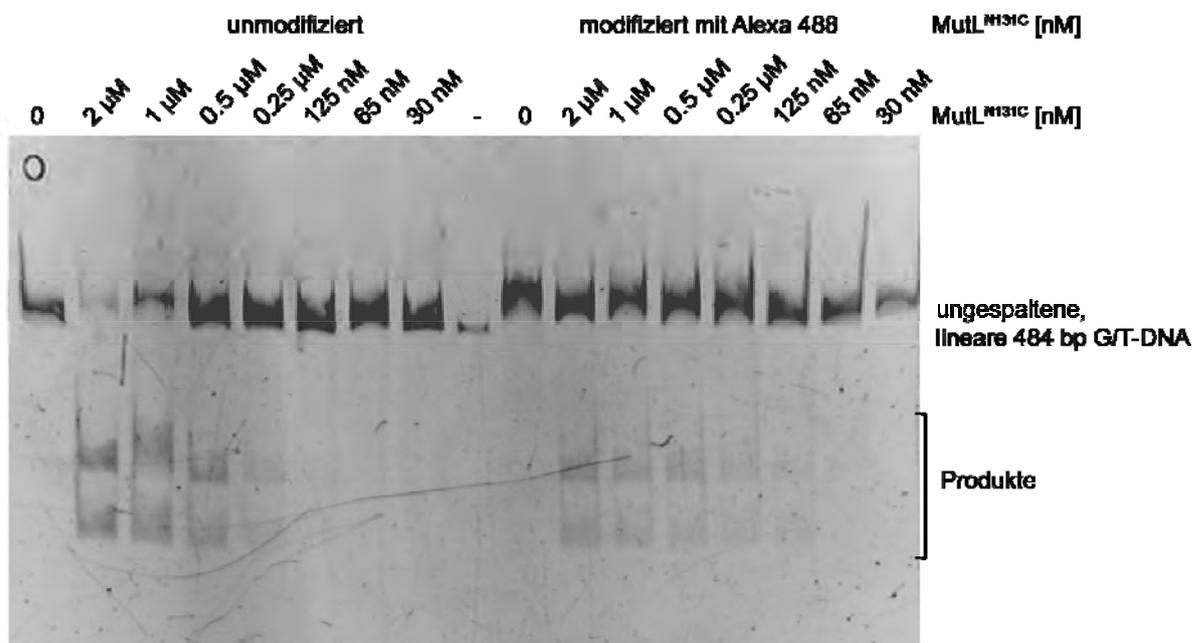


Abbildung 7-V: MutS-abhängige MutH-Aktivierung durch nicht- bzw. mit Alexa 488 markiertes MutL^{N131C}

Die Experimente wurden, wie in Abschnitt 2.3.17 beschrieben durchgeführt. Die MutL Konzentration wurde dabei variiert und die Proben wurden auf einem 6 % Polyacrylamidgel mit anschließender Ethidiumbromidinkubation analysiert.

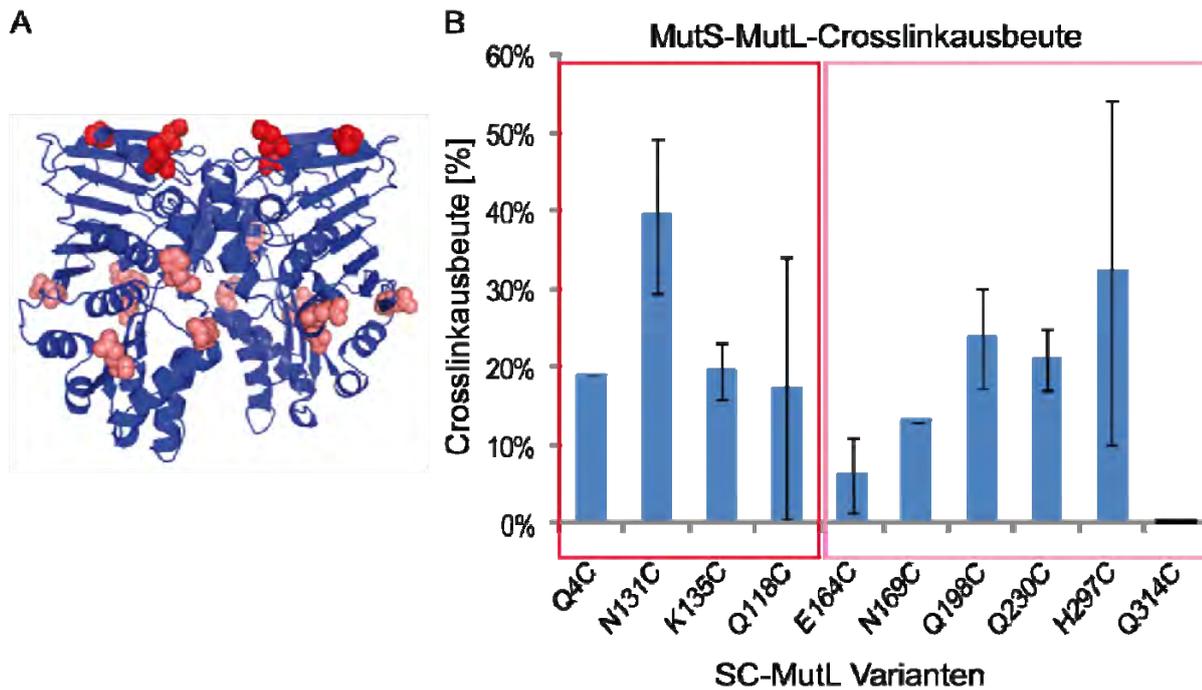


Abbildung 7-VI: MutS-MutL-Crosslinkausbeute zwischen MutS^{WT} und verschiedenen SC-MutL

A) Darstellung von LN40 (pdb 1b63) mit den Cysteinresten, Cys-4, Cys-131, Cys-135 und Cys-118 in Rot und Cys-164, Cys-169, Cys-198, Cys-230, Cys-297 und Cys-314 in Rosa. B) Darstellung der Crosslinkausbeute (\pm Standardabweichung) zwischen 400 nM MutS^{WT} und verschiedenen 1 μ M SC-MutL in Anwesenheit von 1 mM ATP, 125-150 mM KCl und 100 nM 484 bp lange, heteroduplex DNA mit BM[PEO]₃. Die Crosslinkausbeute wurde, wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben, bestimmt. Es wurden mindestens 2 unabhängige Versuche ausgewertet.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Alanin
AA	Acrylamid
AAP	Agaroseauftragspuffer
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5' -diphosphat
ADPNP	Adenosin-5'-(β - γ -imido)triphosphate
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BMOE	bis-maleimidoethane
BM[PEO] ₃	1,11-bis-maleimidotriethyleneglycol
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ccc	kovalent, geschlossene, zirkuläre DNA (<i>covalently closed circle</i>)
CF	cysteinfrei
cm	Zentimeter
D	Aspartat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1, 4-Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
G/C	Homoduplex DNA
G/T	Heteroduplex DNA (mit gewünschten G/T Fehlpaarung)
H, His	Histidin
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

IDL	<i>insertion-deletion loops</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-I-thiogalaktopyranosid
k	Kilo- (10^3)
K	Lysin
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
L	Leucin
l	Liter
LAP ohne	Laemmligel-Auftragspuffer ohne β - Mercaptoethanol
LB	Luria-Bertani
lin	linearisierte DNA
μ	Mikro- (10^6)
m	Milli
M	molar
min	Minute
MLH	<u>MutL</u> Homolog
MMR	<i>mismatch-repair</i>
MSH	<u>MutS</u> Homolog
MTS-17-MTS	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadekan-1,17-diylbismethanthiosulfonat
MTS-11-MTS	3,6,9-Trioxaundekan-1,11-diylbismethanthiosulfonat
MTS-2-MTS	1,2-Ethandiylbismethanethiosulfonat
MTS-1-MTS	1,1-Methandiylbismethanethiosulfonat
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
N	Asparagin
n	nano- (10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
n. b.	nicht bestimmt
NEM	<u>N-Ethylmaleimid</u>
Ni-NTA	Nickel- <i>nitrilo-tri-acetic acid</i>
oc	offen, zirkuläre DNA (<i>open circle</i>)
OD ^{x nm}	optische Dichte bei x nm Lichtwellenlänge
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphated buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rif	Rifampicin
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin

SC	Eincelcystein
sc	<i>supercoiled</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
sec	Sekunde
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
SSB	<i>single-strand binding protein</i>
t	Zeit
T	Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-2-carboxyl-phosphin
TEMED	N, N, N', N',- Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TPE	Tris-Phosphat-EDTA Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>transformation-storage-solution</i>
u	<i>units</i>
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp

Als Dezimalzeichen wird in dieser Arbeit ein Punkt verwende.

7.3 Veröffentlichungen

Manuskript in Vorbereitung für *Journal of Biochemistry* (JBC):

Ines Winkler, Michele B. Cristovao, Andreas D. Marx, Ute Curth, Annet Reumer, Titia K. Sixma, Peter Friedhoff (2010) "*Chemical trapping the dynamic MutS-MutL complex formed in the presence of mismatched DNA*"

Manuskript in Vorbereitung für *Nucleic acid research* (NAR):

Caroline P. Jung, Yu Xiao, Ines Winkler, Joyce H. G. Lebbink, Claire Wyman, Michele B. Cristovao, Peter Friedhoff (2010) "*Generation of DNA circles containing mismatched and modified bases*"

7.4 Teilnahme an Konferenzen/Workshops

Dezember 2009 Gießen, Deutschland: „The GGL concept of supervision”

Präsentation: „*International Research Trainings Group (IRTG)*“

November 2009 Amsterdam, Niederlande: EU-Projekt „mismatch2model (mm2m)“ Meeting

Präsentation: „*MutS-MutL interaction*“

Oktober 2009 Gießen, Deutschland: GGL Konferenz

Poster: „*Topology of the MutS-MutL-DNA complex: a key intermediate in DNA mismatch repair*”

September 2009 Posen, Polen: IRTG-Workshop “Bioinformatik”

Juni 2009 Whistler, Kanada: ASM Konferenz “DNA repair and mutagenesis”

Poster: „*Topology of the MutS-MutL-DNA complex: a key intermediate in DNA mismatch repair*”

Mai 2009 Paris, Frankreich: mismatch2model (mm2m) Meeting

März 2009 Schloss Rauischholzhausen, Deutschland: IRTG-/MC RTN “DNA Enzyme” Workshop
„Pathway to a European Career”

Dezember 2008 York, Großbritannien: Marie Curie RTN, Single-molecule workshop

Poster: „*Towards the topology of the MutS-MutL complex: a key intermediate in DNA mismatch repair*”

November 2008 Rotterdam, Niederlande: mismatch2model (mm2m) Kick-Off-Meeting

Präsentation: „*Trapping the transient MutS-MutL complex using crosslinking*”

Oktober 2008 Gießen, Deutschland: GGL Konferenz

Poster: „*Towards the topology of the MutS-MutL complex: a key intermediate in DNA mismatch repair*”

Juli 2008 Dubrovnik, Kroatien: “2nd International Conference on Molecular Perspectives Protein-Protein Interactions”

Poster: „*Towards the topology of the MutS-MutL complex: a key intermediate in DNA mismatch repair*”

Mai 2008 Amsterdam, Niederlande: Kooperations Meeting

Präsentation: „*Ternary complex formation between MutS-MutL-DNA in mismatch repair*”

März 2008 Schloss Rauschholzhausen, Deutschland: IRTG workshop

Präsentation: „Topology of the MutS-MutL complex: a key intermediate in DNA mismatch repair”

Februar 2008 Moskau, Russland: IRTG Offspring-Meeting

Präsentation: „Chemical crosslinking“

November 2007 Rotterdam, Niederlande: Kooperations Meeting

Präsentation: „Crosslinking to probe conformational changes and protein-protein interactions during the ternary MutS-MutL-DNA complex formation: structural studies”

Juni 2007 Suzdal, Russland: IRTG-Workshop

Poster/Präsentation: „Structural analysis of the ternary MutS-MutL-DNA complex: a key intermediate in DNA mismatch repair”

Dezember 2006 Odense, Dänemark: EU - Marie Curie Research Training Network: "DNA Enzymes":

Workshop “Mass spectroscopy”