

**Untersuchung des Mechanismus der  
Signalweiterleitung zwischen Basenfehlpaarung und  
GATC-Erkennungssequenz im bakteriellen  
*mismatch*-Reparatursystem**

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –  
des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Caroline Jung  
geboren am 16.05.1979 in Giessen

**Giessen, 2009**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie (FB08) der Justus-Liebig-Universität Giessen in der Zeit von September 2005 bis März 2009 unter Leitung von Prof. Dr. P. Friedhoff angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner  
Institut für Organische Chemie, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Friedhoff  
Institut für Biochemie, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann  
Institut für Genetik, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Tag der Promotion:

## Erklärung

Ich versichere hiermit, die folgende Arbeit selbstständig durchgeführt und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ferner bestätige ich, dass diese Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch keinem anderen Prüfungsausschuss vorgelegt wurde.

Giessen, im März 2009

---

(Caroline Jung)

## **Teilnahme an Fachkonferenzen**

**Herbsttagung der GBM (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie),**

**Hamburg:**

*Molecular Life Science*

16.-19. September 2007

Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster:

*“Slide N´ Loop, playing games with MutS”*

## Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. Alfred M. Pingoud für die Aufnahme in das Institut für Biochemie, die freundliche Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme an vielen interessanten Seminaren.

Prof. Peter Friedhoff danke ich für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die vielen anregenden Diskussionen, das viele Erklären und sein immer gute Laune haben.

Herrn Professor R. Dammann für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein Dank an Ina, die mir die Grundlagen beibrachte und immer einen guten Tipp hatte.

Wibke, vielen Dank, weil du immer für ein Gespräch zu haben warst, meine Leidenschaft fürs Otto-Eger-Heim geteilt hast und ich echt gemerkt habe, dass du am Ende meiner Arbeit nicht mehr da warst.

Ein Dank an die MutHLS-Gruppe, besonders Roger für die gute Sprücheklopferi und die seelische Unterstützung, Ines für das Korrekturlesen und natürlich Karo (du weißt schon warum besonders).

Ein Dank an Steffi fürs schnelle und genaue Lesen meiner Arbeit und die Schwätzchen für die sie immer zu haben war.

Ein ganz großes Dankeschön, meiner Familie, für die seelische und finanzielle Unterstützung.

Danke an Gerald für seine Unterstützung, Ruhe, fürs Zuhören und die unendliche Geduld.

Meinen Freunden vielen Dank für die Geduld und ein offenes Ohr, ich werde mir jetzt wieder mehr Zeit für euch nehmen.

## Zusammenfassung

Für die Untersuchung/Unterscheidung der verschiedenen Modelle der DNA-*mismatch*-Reparatur sind geeignete, qualitativ hochwertige DNA-Substrate entscheidend. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch sehr kurze lineare *mismatch*-Substrate für die Analyse des MMR geeignet sind, sofern sich die GATC-Erkennungssequenz in zentraler Position befindet. Weiterhin spielt die Ionenstärke während der *mismatch* und MutS, -L abhängigen Aktivierung von MutH eine große Rolle. Bei physiologischer Ionenstärke (130 und 150 mM KCl) ist eine *mismatch*-spezifische, MutS, -L-induzierte Spaltung von MutH an der GATC-Erkennungssequenz gewährleistet.

MutS ist das Schlüsselprotein während der *mismatch*-Reparatur, es muss den *mismatch* erkennen und das Strangdiskriminierungssignal weiterleiten. Diverse Modelle zur Kommunikation dieser beiden Prozesse und der Stöchiometrie der beteiligten Proteine sind seit Jahren in der Fachwelt umstritten. Innerhalb dieser Arbeit konnte, durch Analyse der MutH-induzierten Spaltung an der GATC-Erkennungssequenz bestätigt werden, dass obwohl MutS Tetramere bilden kann, diese nicht essentiell für seine *in vivo*- und *in vitro*-Aktivität sind. Eine Dimervariante (MutS<sup>D835R</sup>) von MutS zeigte im Vergleich zum Wildtyp zwar eine stärkere Ionenstärke-Sensitivität, war aber in der Lage, die *mismatch*-induzierte Aktivierung der MutH-Endonuklease zu bewirken. Darüber hinaus wurde das MutS-Dimer mit Hilfe eines *crosslinkers* zwischen den *clamp*-Domänen auf der DNA fixiert. Damit konnten in DNA-Bindungs-Experimenten stabile MutS-DNA-Komplexe visualisiert werden. Hiermit wurde eindeutig gezeigt, dass ein Öffnen der *clamp*-Domänen notwendig ist, damit MutS durch direkte Dissoziation DNA mit blockierten Enden verlassen kann. Trotzdem war das quervernetzte Protein noch in der Lage, DNA über deren Enden nach Ausbildung einer sog. *sliding clamp* zu verlassen (*end-dependent dissociation*) und mit Hilfe von MutL die Endonuklease MutH zu aktivieren. Durch Verwendung verschieden langer *crosslinker* konnte belegt werden, dass die *clamp*-Domänen von MutS eine gewisse Flexibilität benötigen, um die Umwandlung in eine *sliding clamp* zu ermöglichen.

Kernpunkt bestehender Diskussion über die Modelle, zur Kopplung der *mismatch*-Erkennung mit der Strangdiskriminierung, ist die Frage nach einem mobilen (*sliding clamp*) bzw. stationären (DNA-*looping*) MutS. Zur Unterscheidung dieser prinzipiell verschiedenen Modelle wurden zwischen der Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz diverse Blockaden in die Substrate eingeführt und anschließend untersucht, ob die Transduktion des Signals zur Aktivierung der Endonuklease MutH durch MutS, noch möglich ist. Eine Blockade bestand dabei aus einem Biotin-Streptavidin-Komplex, der die Signalweiterleitung

um ca. 60 % inhibierte, allerdings wurde das Substrat damit noch dreieinhalbmal besser gespalten als der entsprechende Homoduplex. Dies ist nicht vereinbar mit einem einfachen MutS-*sliding clamp*-Modell. Die zweite Blockade war ebenfalls ein Biotin-Streptavidin-Komplex, der in diesem Fall zwei DNA-Stränge verbrückt (Homoduplex-DNA mit GATC-Erkennungssequenz und/oder Heteroduplex-DNA). Kontrollexperimente mit Typ-IIS- und Typ-IIF-Restriktionsendonuklease zeigten, dass sich auf diesen Substraten DNA-*loops* ausbilden können. Allerdings konnte auf diesen Substraten keine Aktivierung der MutH-Endonuklease auf dem Homoduplex-Substrat detektiert werden, sodass ein einfaches, passives DNA-*looping*-Modell für die *mismatch*-Reparatur unwahrscheinlich ist.

Im nächsten Abschnitt wurde untersucht, inwiefern die Geometrie zwischen *mismatch* und GATC-Sequenz einen Einfluss auf die Aktivierung von MutH hat. Hierzu wurden DNA-Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen und einer Basenfehlpaarung eingesetzt. Die Geometrien der Substrate wurden systematisch variiert, indem verschiedene Abstände zum DNA-Ende bzw. zwischen GATC-Sequenz und *mismatch* verwendet wurden. Dabei zeigte sich, dass nicht der Abstand der GATC-Erkennungssequenz zum *mismatch*, sondern der Abstand zum DNA-Ende für eine effiziente Aktivierung bedeutsam ist. Die GATC-Erkennungssequenz, die am zentralsten lokalisiert ist, wird bevorzugt gespalten. Dies wurde als weiteres Indiz für einen beweglichen Komplex, der über die DNA-Enden zerfallen kann, interpretiert.

Um ein stationäres MutS-Modell (MutS am *mismatch*) endgültig zu widerlegen, wurden DNA-Substrate eingesetzt, bei denen *mismatch* und GATC-Erkennungssequenz nur zwei Basen auseinander liegen, und somit eine gleichzeitige Bindung von MutS an die Fehlpaarung und MutH an die GATC-Erkennungssequenz nicht möglich ist. Dennoch erfolgte eine *mismatch*-abhängige Aktivierung von MutH, sodass der aktive Komplex bestehend aus MutS, MutL und MutH beweglich sein muss.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Teilnahme an Fachkonferenzen</b>	<b>III</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das mismatch-Reparatursystem</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Komponenten des mismatch-Reparatursystems mit Fokus auf mismatch-Erkennung und Strangdiskriminierung</b>	<b>4</b>
1.2.1. MutS – der mismatch-Sensor	4
1.2.2. MutL – <i>molecular matchmaker</i>	7
1.2.3. MutH – Strangdiskriminierung	8
<b>1.3. Die verschiedenen Modelle zur Kopplung von mismatch-Erkennung und Strangdiskriminierung</b>	<b>9</b>
1.3.1. ATP-dependent movement/sliding clamp-Modell	11
1.3.2. MutS-Polymerisations-Modell	11
1.3.3. Bending/looping-Modell	11
<b>1.4. Zielsetzung</b>	<b>12</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>14</b>
2.1.1. Chemikalien	14
2.1.2. Enzyme und Proteine	15
2.1.3. Puffer	15
2.1.3.1. Gelelektrophorese und Substratherstellung	15
2.1.3.2. DNA-Bindungsexperimente	17
2.1.3.3. Proteinreinigung	17
<b>2.2. Mikrobiologisches Arbeiten</b>	<b>18</b>
2.2.1. Bakterienstämme	18
2.2.2. Plasmide	18
<b>2.3. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>18</b>
2.3.1. Plasmid DNA-Präparationen	18
2.3.2. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	18
2.3.3. Gelelektrophoretische Analyse	18
2.3.4. PCR-Reaktionen	19
2.3.4.1. PCR für die mismatch-Substrate	19
2.3.4.2. Primer-Sequenzen	20
<b>2.4. Zielgerichtete Mutagenese</b>	<b>21</b>
2.4.1. Megaprimer-PCR	22
2.4.2. Mutagenese-PCR	22
2.4.3. Restriktionsverdau mit DpnI	23
2.4.4. Ethanolfällung	23
2.4.5. Elektrottransformation	23
2.4.6. Ausplattieren der transformierten Zellen	24
2.4.7. Screening markerpositiver Klone	24
2.4.8. In vivo-Aktivitätstest der Mutanten	24
2.4.9. Proteinexpression und Reinigung	25
2.4.9.1. Proteinexpression	25
2.4.9.2. Protein-Aufreinigung über Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie	25



<b>2.5. Substratherstellung</b>	<b>26</b>
2.5.1. <i>mismatch</i> -Substrat-Synthese für lineare Substrate	26
2.5.2. Homoduplex-Substrat-Synthese für lineare Substrate	28
2.5.3. Unterschiedliche Längen von D1	28
2.5.4. Lineare <i>mismatch</i> -Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen	28
2.5.5. Bindung von Streptavidin an 5'-biotinylierte DNA-Substrate	29
2.5.6. Blockade zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz	30
2.5.6.1. Blockade durch eine Lücke, gefüllt mit SSB	30
2.5.6.2. Erzeugung eines Substrates mit einem Streptavidin als Blockade zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz	31
2.5.6.3. Herstellung eines Substrates mit einem Doppelstrangbruch und einem Streptavidinmolekül als Blockade	32
2.5.7. Herstellung von zirkulären <i>mismatch</i> -Substraten	32
2.5.7.1. PCR für das zirkuläre Substrat	32
2.5.7.2. Inkubation mit Nb.BtsI	33
2.5.7.3. Ligation	33
2.5.7.4. Inkubation mit Exonuklease I und III	34
<b>2.6. MutH-Endonuklease-Aktivierungsassay</b>	<b>35</b>
<b>2.7. Bindungsexperimente (EMSA)</b>	<b>36</b>
<b>2.8. Thiol-<i>crosslink</i>-Experimente</b>	<b>36</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Die <i>mismatch</i>-spezifische MutH-Aktivierungsreaktion ist salzabhängig</b>	<b>38</b>
<b>3.2. Kurze DNA-Substrate mit zentraler GATC-Erkennungssequenz sind für den Mechanismus des MMR gut geeignet</b>	<b>40</b>
3.2.1. Verkürzen des Abstands der Basenfehlpaarung zum DNA-Ende (D3)	42
3.2.2. Minimalsubstrate für die MutHLS-Reaktion	43
<b>3.3. Schnellere Kinetiken durch Einzelstrangspaltung</b>	<b>45</b>
<b>3.4. Kurze, zirkuläre <i>mismatch</i>-Substrate</b>	<b>47</b>
<b>3.5. MutS-Dimere sind ausreichend für die Aktivierung von MutH</b>	<b>49</b>
3.5.1. <i>Mismatch</i> -abhängige MutH-Aktivierung mit verschiedenen langen DNA-Substraten	49
3.5.2. Die MutS-Dimer-Variante mit verschiedenen KCl-Konzentrationen	50
3.5.3. Aktivität der MutS-Dimer-Variante mit einer <i>roadblock</i> -DNA	52
<b>3.6. Fixieren von MutS auf der DNA</b>	<b>55</b>
3.6.1. Die <i>crosslink</i> -Ausbeute mit DNA liegt zwischen 60 % und 70 %	56
3.6.2. Der <i>crosslink</i> stabilisiert den DNA-Protein-Komplex	57
3.6.3. MutS dissoziiert nicht von DNA mit geschlossenen Enden	59
3.6.4. Für die Diffusion auf der DNA benötigt MutS ausreichend Flexibilität innerhalb der <i>clamp</i> -Domäne	61
3.6.5. Bindung eines Dimers an 505 bp lange, zirkuläre <i>mismatch</i> -DNA	62
3.6.7. Ein an der Position 483 vernetztes MutS kann MutH aktivieren	63
3.6.8. Kompetitionsversuche mit zwei verschiedenen DNA-Substraten	65
<b>3.7. Blockade zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz</b>	<b>66</b>
3.7.1. Ein Substrat mit Blockade aber einem kontinuierlichen DNA-Strang inhibiert die Aktivierung von MutH	69
3.7.2. Blockade aus einem Doppelstrangbruch und einem Streptavidin unterbricht die Kopplung von <i>mismatch</i> -Erkennung und Strangdiskriminierung	72
3.7.3. Über Streptavidin verbrückte Substrate sind für einen <i>looping</i> -Mechanismus geeignet	77
<b>3.8. Ein aktiviertes MutS „scant“ die DNA nicht systematisch nach GATC-Erkennungssequenzen ab</b>	<b>80</b>
3.8.1. 484 bp langes Substrat mit zweiter GATC-Erkennungssequenz - 80, 40 oder 20 bp nach der Basenfehlpaarung	83
3.8.2. Verkürzen von D1 zu einem 302 bp langen Substrat	86
3.8.3. Verkürzen von D3 zu einem 406 bp langen Substrat	87

<b>3.9. Unter „single turnover“-Bedingungen spaltet das MMR nur an einer GATC-Erkennungssequenz</b>	<b>90</b>
<b>3.10. MutS muss nicht an der Basenfehlpaarung sein, während MutH an der GATC-Erkennungssequenz spaltet</b>	<b>91</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>4.1. Versuchsaufbau optimieren</b>	<b>95</b>
4.1.1. Die <i>mismatch</i> -spezifische MutH-Aktivierungsreaktion ist salzabhängig	95
4.1.2. Kurze DNA-Substrate mit zentraler GATC-Erkennungssequenz sind für den Mechanismus des MMR gut geeignet	96
4.1.3. Kurze zirkuläre <i>mismatch</i> -Substrate	97
<b>4.2. MutS Dimere sind ausreichend für die Aktivierung von MutH</b>	<b>97</b>
<b>4.3. Fixieren von MutS auf der DNA</b>	<b>98</b>
4.3.1. Für die Diffusion auf der DNA benötigt MutS ausreichende Flexibilität innerhalb der <i>clamp</i> -Domäne	99
4.3.3. Das an der Position 483 vernetzte MutS kann MutH Aktivieren	99
4.3.4. Kompetitionsversuche mit zwei verschiedenen DNA-Substraten	100
<b>4.4. Modelle ausschließen</b>	<b>101</b>
4.4.1. Blockaden inhibieren bzw. stoppen die Weiterleitung der Aktivierung	101
4.4.2. Ein aktiviertes MutS „scannt“ die DNA nicht systematisch nach GATC-Erkennungssequenzen ab	104
4.4.3. Unter „single turnover“-Bedingungen spaltet das MMR nur an einer GATC-Erkennungssequenz	105
4.4.4. Nach Erkennung der Fehlpaarung bewegt MutS sich von dieser weg	106
<b>4.5. Schlussfolgerung</b>	<b>107</b>
<b>5 Literatur</b>	<b>109</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

„*Cancer is a disease of our genes*“ (Hoeijmakers, 2001). Krebs entsteht durch Schäden in den Erbanlagen, Genen eines Organismus. Es sind vor allem drei Gruppen von Genen, die nach ihrer Veränderung Auslöser einer Krebserkrankung sein können: Protoonkogene, Tumorsuppressor-Gene und Reparaturgene. Tumorsuppressor-Gene regulieren den Zellzyklus; ein sehr bekanntes Beispiel ist das P53-Gen (TP 53). Protoonkogene sind normale Gene, die bei ihrer Veränderung zu Onkogenen werden können, diese wiederum fördern bei ihrer Expression den Übergang einer normalen Zelle zu einer Krebszelle. Protoonkogene kodieren für Proteine, die Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung kontrollieren. Reparaturgene kodieren für Proteine, die Komponenten verschiedener DNA-Reparatursysteme sind. Veränderungen bzw. Schäden in der Gensequenz können durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Sie entstehen auf natürlichem Wege, z. B. durch Fehler während der Replikation oder der homologen Rekombination. Veränderungen in der Gensequenz treten aber auch auf, wenn DNA-Bindungen spontan zerfallen. Beispiele für Veränderungen an Basen, den Bausteinen der Gene, sind spontane oder induzierte Desaminierung von Cytosin, Adenin, Guanin oder 5'-Methyl-Cytosin, wobei die Derivate Uracil, Hypoxanthin, Xanthin oder Thymin entstehen (Hoeijmakers, 2001).

Schäden in der Gensequenz eines Organismus können aber auch durch Umwelteinflüsse verursacht werden. Beispiele solcher Umwelteinflüsse sind UV-Strahlung, radioaktive Strahlung oder Chemikalien. Gesunde Organismen sind auf diese Arten von DNA-Schäden vorbereitet und besitzen verschiedene hoch konservierte DNA-Reparatursysteme. Diese DNA-Reparatursysteme können in fünf verschiedene Mechanismus-Typen eingeteilt werden: *direct repair (damage reversal)*, *nucleotide excision repair (NER)*, *base excision repair (BER)*, *double strand break repair (DBR)* und das *mismatch-Reparatur-System (MMR)* (Yang, 2008).

## 1.1. Das *mismatch*-Reparatursystem

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden am MMR aus *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt. Das MMR repariert Basenfehlpaarungen und *insertion/deletion loops (IDLs)*, die während der Replikation auftreten. Es existiert in fast allen Organismen, von Bakterien bis zu höheren Eukaryoten. In *E. coli* trägt das MMR dazu bei, dass die Fehlerrate während der Replikation um das 1000-Fache auf ca.  $10^{-10}$  Fehler pro eingebautes Nukleotid gesenkt wird (Modrich *et al.*, 1996). Ist das MMR einer menschlichen Zelle ausgefallen, z. B. weil eine Mutation in einem Gen der beteiligten Proteine

stattgefunden hat, kann dies eine Ursache für das Auftreten einer speziellen Form des Darmkrebses (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC) beim Menschen sein. Die grundlegenden Mechanismen in diesem System scheinen bei Prokaryoten und Eukaryoten gleich zu sein (Schofield *et al.*, 2003.). Das *E. coli*-MMR konnte *in vitro* durch aufgereinigte Proteine rekonstituiert werden (Lahue *et al.*, 1989). Durch das MMR werden *insertionen*, *deletionen* und Basenfehlpaarungen mit Ausnahme von C/C-Fehlpaarungen erkannt und repariert. Neben der Fehlererkennung ist bei der postreplikativen Reparatur wichtig, den ursprünglichen (fehlerfreien) Mutterstrang vom fehlerhaften, neusynthetisierten Tochterstrang zu unterscheiden (Strangdiskriminierung). Es sind mehrere Möglichkeiten für das Reparatursystem vorstellbar, um die beiden Stränge voneinander unterscheiden zu können. In *E. coli* wird die Strangdiskriminierung durch den Methylierungsstatus der DNA erreicht. Die DNA-Adenin-Methyltransferase (DAM) überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das N<sup>6</sup>-Atom des Adenins innerhalb der GATC-Erkennungssequenz. Nach der Replikation ist der neu synthetisierte Strang daher für eine kurze Zeit nicht methyliert, wodurch er vom Mutterstrang unterschieden werden kann. Insgesamt sind elf Proteinkomplexe an der *mismatch*-Reparatur beteiligt: MutS, MutL, MutH, DNA-Helikase II, *single-strand-binding*-Protein (SSB), Exonuklease I, Exonuklease IV oder RecJ Exonuklease, Exonuklease X, DNA-Polymerase III-Holoenzym und DNA-Ligase, wobei MutS, MutL und MutH die drei Komponenten sind, die für die Erkennung einer Fehlpaarung und die Strangdiskriminierung benötigt werden (siehe Abb.1-1). Zunächst erkennt MutS den *mismatch* und bindet daran. Hierauf erfolgt in einem bislang nur unvollständig verstandenen Prozess nach MutL-Bindung und ATP-Hydrolyse die Aktivierung der Endonuklease MutH. Diese spaltet daraufhin den nichtmethylierten Strang direkt vor dem Guanin der hemimethylierten GATC-Erkennungssequenz, wobei die Distanz zwischen GATC-Erkennungssequenz und Basenfehlpaarung bis zu 1 kb betragen kann. Danach bindet in einer wiederum von MutS und MutL-abhängigen Reaktion die Helikase II an den Einzelstrangbruch und entwindet den DNA-Doppelstrang in Richtung der Basenfehlpaarung. Der Einzelstrang wird anschließend von SSB-Proteinen stabilisiert, während eine der vier Exonukleasen den entwundenen Einzelstrang bis kurz hinter der falsch eingebauten Base durch Hydrolyse entfernt. Danach synthetisiert die DNA-Polymerase III das fehlende Stück des Tochterstranges und die DNA-Ligase I schließt den verbleibenden Einzelstrangbruch. (Au *et al.*, 1992; Lahue *et al.*, 1989; Modrich, 1996). Zum Abschluss der DNA-*mismatch*-Reparatur wird die GATC-Erkennungssequenz des neu synthetisierten Stranges noch durch die *dam*-Methylase methyliert (Friedberg *et al.*, 1995).

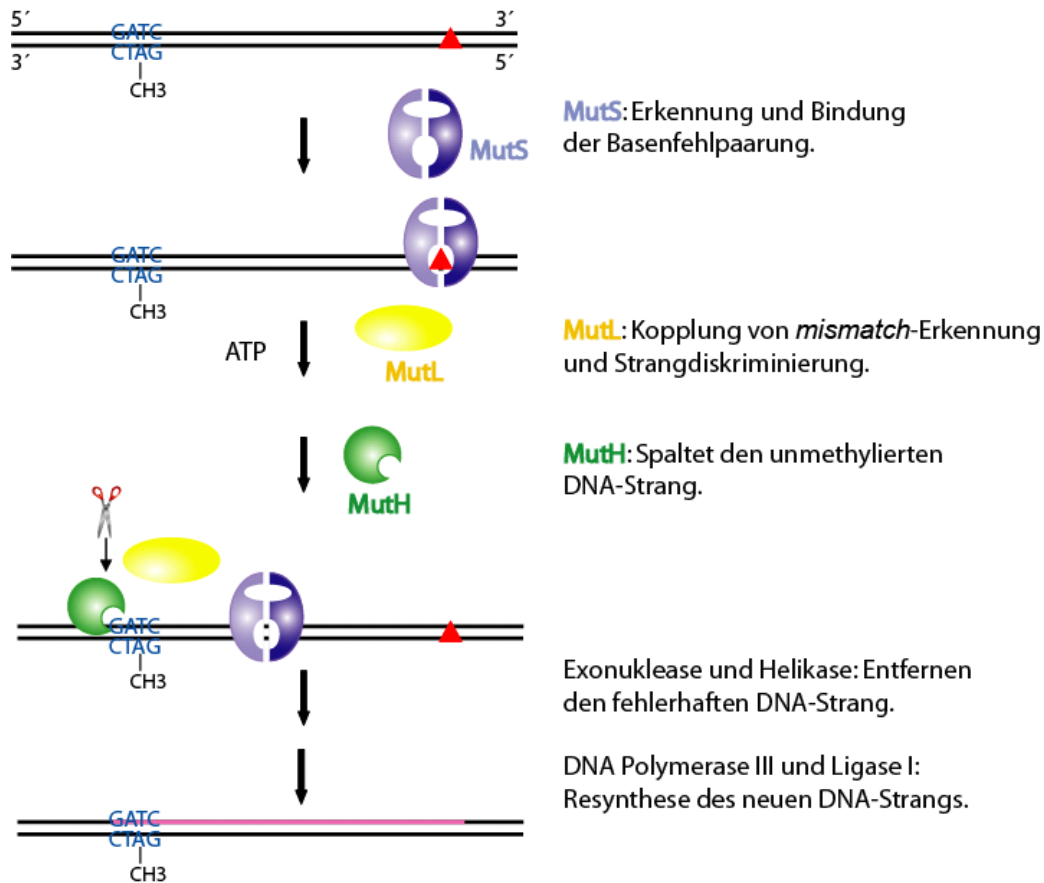


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der *mismatch*-Reparatur in *E. coli*

Wann, ob und auf welche Weise der Initiationskomplex aus MutS, -L und -H nach der Strangdiskriminierung von der DNA dissoziiert, ist nicht bekannt. Allerdings weiß man, dass zum Anlagern der Helikase II sowie der Exonuklease an die DNA die Anwesenheit von MutS und MutL notwendig ist (Viswanathan *et al.*, 1998). Die Strukturen von funktionellen Teilen der MutS, MutL oder MutH Proteine im Komplex mit DNA oder Nukleotiden wurden durch Röntgenstrukturanalysen bestimmt. Allerdings ist weitgehend unklar, wie diese drei Proteine miteinander interagieren, um die *mismatch*-Reparatur einzuleiten und sie zu vollenden.

## 1.2. Komponenten des *mismatch*-Reparatursystems mit Fokus auf *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung

### 1.2.1. MutS – der *mismatch*-Sensor

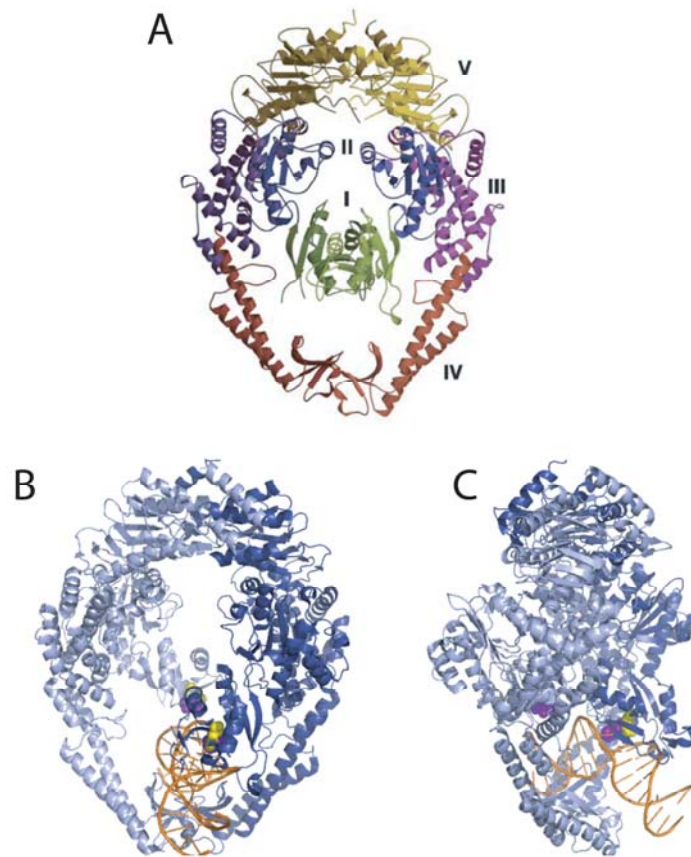
Einer der wichtigsten Schritte innerhalb der DNA-Reparatur ist die Fehlererkennung, d. h. die Unterscheidung einer normalen Basenpaarung von Basenfehlpaarung bzw. von ungepaarten Basen. MutS ist das Protein, das während der MMR die DNA nach einem Fehler absucht, diesen erkennt und an ihn binden kann. Die Bindungsaffinität von MutS ist bis zu 1500-Fach höher für DNA mit einer Fehlpaarung als für Homoduplex-DNA. Die Bindungsaffinität von MutS an Fehler variiert mit den unterschiedlichen Fehlern. Dabei ist die Affinität für G/T-Basenfehlpaarungen oder für IDLs sehr hoch, während die für C/C-Basenfehlpaarungen etwas niedriger ist. (Kunkel *et al.*, 2005). Durch die Kristallstrukturen von MutS aus *E. coli*, *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Abbildung 1-2) und seit kurzem auch aus dem menschlichen Organismus in verschiedenen Komplexen, mit und ohne Oligodesoxynukleotid mit verschiedenen Fehlpaarungen, konnten viele neue Informationen gewonnen werden (Lamers *et al.*, 2000a; Obmolova *et al.*, 2000a; Warren *et al.*, 2007).

<i>MutS</i> Protein	Kofaktor	Basenfehlpaarung	PDB Code	Referenz
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg <sup>2+</sup>	G/T	1e3m	(Lamers <i>et al.</i> 2000b)
<i>Taq</i> (1-768)	-	Unpaired T	1ewq	(Obmolova <i>et al.</i> 2000b)
<i>Taq</i> (1-782)	-	-	1ewr	(Obmolova <i>et al.</i> 2000b)
<i>Taq</i> (1-768)	2 ADP, Mg <sup>2+</sup>	Unpaired T	1fw6	(Junop <i>et al.</i> 2001)
<i>E. coli</i> R697A (1-800)	ADP, Mg <sup>2+</sup>	G/T	1ng9	(Lamers <i>et al.</i> 2003)
<i>Taq</i> (1-768)	ADP, BeF <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Unpaired T	1nne	(Alani <i>et al.</i> 2003)
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg <sup>2+</sup>	C/A	1oh5	(Natrajan <i>et al.</i> 2003)
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg <sup>2+</sup>	A/A	1oh6	(Natrajan <i>et al.</i> 2003)
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg <sup>2+</sup>	G/G	1oh7	(Natrajan <i>et al.</i> 2003)
<i>E. coli</i> (1-800)	ADP, Mg <sup>2+</sup>	Unpaired T	1oh8	(Natrajan <i>et al.</i> 2003)
<i>E. coli</i> (1-800)	ATP, Mg <sup>2+</sup>	G/T	1w7a	(Lamers <i>et al.</i> 2004)

Abb. 1-2: Verfügbare Kristallstrukturen von MutS (aus der Dissertation von Manelyte, 2006)

Allerdings bleiben trotz der Verfügbarkeit der Kristallstrukturen drei wichtige Fragen zur Funktion von MutS ungeklärt. Erstens gibt es bisher noch keine Kristallstruktur von MutS mit

Homoduplex-DNA, zweitens fehlt in allen Kristallstrukturen immer ein Teil des C-Terminus (*E. coli*-MutS besitzt 853 aa und *Taq*-MutS 811 aa) und drittens bildet das bakterielle *full-length*-MutS Tetramere. Allerdings wurde die Struktur nur für die homodimeren Deletions-Varianten bestimmt.



**Abb. 1-3: Drei verschiedene Kristallstrukturen von MutS**

A) *Taq*-MutS, Frontansicht: (I, IV), DNA-Bindungsdomäne; (II, III), Verbindungsdomänen; V, ATPase-Domäne (Kunkel, 2005). B) *E. coli*-MutS (PDB: 1e3m), Frontansicht: Glutamine 38 in jedem Monomer gelb und Phenylalanine 39 lila. C) Abbildung B als Seitenansicht

MutS formt in Prokaryoten Homodimere und in Eukaryoten Heterodimere (Yang, 2008). Insgesamt wird das Protein aus fünf Untereinheiten gebildet (Abbildung 1-3): zwei Untereinheiten für die DNA-Bindung (I, IV), eine mit ATPase Aktivität (V) und die anderen zwei bilden Verbindungsdomänen (II, III). In Anwesenheit von DNA formt MutS eine Struktur, die einen oberen und einen unteren Kanal enthält. Der obere Kanal, begrenzt durch die Domänen I, II und V, ist groß genug und hat das richtige elektrostatische Potential um DNA aufzunehmen. Allerdings hatte ein Austausch der Aminosäuren, der das elektrostatische Potential dieser Region verändern sollte, keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins während der *mismatch*-Reparatur (Junop *et al.*, 2003). Der C-terminale Abschnitt von MutS,

gebildet aus den Aminosäuren 801-853 des Proteins, scheint wichtig für die Tetramerisierung zu sein. Die Deletionsvariante  $\Delta 800$  von MutS liegt nur noch in einem Dimer-Monomer-Equilibrium vor und schon die Mutation von Aspartat 835 zu Arginin verhindert, dass das Protein weiter Tetramere bilden kann (Manelyte *et al.*, 2006). Allerdings scheint die Tetramerisierung für die Funktion des Proteins während der *mismatch*-Reparatur wichtig, aber nicht essentiell zu sein (Manelyte, 2006; Urbanke & Mendillo 2007). In allen MutS-*mismatch*-DNA-Strukturen wird die gebundene DNA in einem Winkel von  $45^\circ$  -  $60^\circ$  gebogen. Diese Biegung in der DNA erleichtert das Binden von MutS, die Bindungsaffinität wird um das 10- bis 30-Fache gegenüber Homoduplex-DNA gesteigert (Schofield *et al.*, 2003). Die Kontakte von MutS mit der gebundenen DNA sind überwiegend unspezifisch, nur zwei Aminosäurereste der einen Untereinheit bilden spezifische Interaktionen mit der Fehlpaarung aus. Diese Aminosäuren gehören zu einem hochkonservierten Sequenzmotiv Phe-X-Glu im N-Terminus des Proteins. Das Phe-36 (*E. coli*-MutS) der *mismatch*-Bindungs-Domäne interkaliert in den DNA-Doppelstrang und tritt in Kontakt z. B. mit dem Thymin eines fehlgepaarten G/T-Basenpaares (Lamers *et al.*, 2000a). Glu-38 (*E. coli*-MutS) formt eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N3-Atom des fehlgepaarten Thymins oder dem N7 eines fehlgepaarten Purins (Tessmer *et al.*, 2008). Diese DNA-Interaktionen des konservierten Phenylalanins konnten in der Vergangenheit bereits in *photocrosslink*-Experimenten für *Taq*-MutS gezeigt werden (Malkov *et al.*, 1997). Tessmer *et al.*, 2008 schlagen dabei folgenden Mechanismus zur Fehlererkennung vor (Abbildung 1-4): Während der Suche nach der Basenfehlpaarung bindet MutS unspezifisch an die DNA und biegt diese, die negative Ladung des Glutamats erleichtert dabei die DNA-Biegung. Das Phenylalanin scheint keine spezielle Interaktion mit der Homoduplex-DNA einzugehen. Trifft MutS auf eine Basenfehlpaarung, wird aus der Biegung ein Knick (engl.: *kink*). Das Glutamat kann nun die Wasserstoffbrückenbindung mit z. B. dem fehlgepaarten Thymin ausbilden und das Phenylalanin interkaliert in den DNA-Doppelstrang und formt den *initial recognition complex* (IRC). Die gespeicherte Energie aus diesem Komplex erleichtert das Ausbilden des *ultimate recognition complex* (URC), welcher die ATP-induzierte Konformationsänderung von MutS auslöst, die zur Aktivierung des Reparatursystems führen soll (Tessmer *et al.*, 2008).



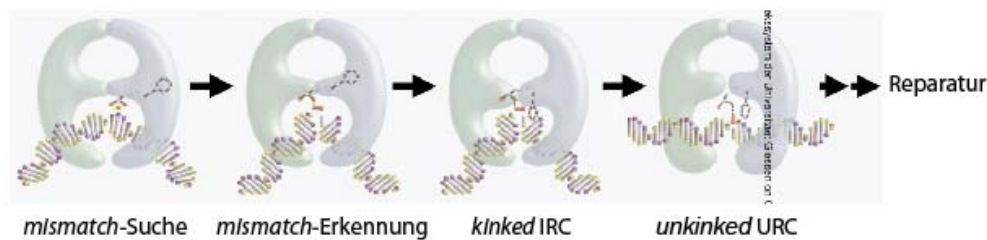


Abb. 1-4: Aktuelles Modell zur *mismatch*-Erkennung durch MutS (Tessmer *et al.*, 2008)

Biochemische und Mutagenese-Studien des *E. coli*-MutS-Proteins zeigen, dass die zwei Untereinheiten des Proteins unterschiedliche Affinitäten für ADP und ATP haben (Bjornson *et al.*, 2003). Die ATPase-Aktivität übernimmt sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der *mismatch*-Erkennung und der anschließenden Strangdiskriminierung. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass MutS nach der Bindung von ATP wie ein Schalter aktiviert wird.

### 1.2.2. MutL – *molecular matchmaker*

MutL koppelt die Erkennung der Fehlpaarung mit dem Prozess der Reparatur. Biochemische Analysen haben gezeigt, dass MutL mit MutH direkt interagiert (Ban *et al.*, 1999; Hall & Matson, 1999; Toedt *et al.*, 2003). Die Kommunikation zwischen MutS und MutH wird demnach durch MutL vermittelt. Das prokaryotische MutL ist wie MutS ein Homodimer. Im eukaryotischen System kommt es als Heterodimer vor und setzt sich aus dem MutL-Homolog MLH1 und entweder PMS1, PMS2 oder MLH3 zusammen. MutL besitzt eine hoch konservierte N-terminale ATPase-Domäne und eine weniger konservierte C-terminale Dimerisierungsdomäne. Beide Domänen sind durch einen flexiblen Linker verbunden. (Kosinski *et al.*, 2005; Drotschmann *et al.*, 1998; Guarne *et al.*, 2004; Ban *et al.*, 1999). Bis jetzt existiert noch keine Kristallstruktur für das *full-length*-MutL. Allerdings wurden die Kristallstrukturen der 40-kD-N-terminalen Domäne (LN-40) (Ban *et al.*, 1998) und der 20-kD-C-terminalen Domäne (LN-20) von *E. coli*-MutL entschlüsselt (Guarne *et al.*, 2004). MutL gehört zur GHKL-ATPase-Familie, der ebenfalls noch Gyrase (eine Typ-II-Topoisomerase), Hsp90 und Histidinkinase angehören. Bei allen Mitgliedern der GHKL-Familie führt die Bindung von ATP zu größeren Konformationsänderungen (Ban, 1999; Sacho, 2008). Es hat sich gezeigt, dass MutL nach der Bindung von ATP eine geschlossene dimere Form bildet, in der es MutH binden und aktivieren kann (Giron-Monzon *et al.*, 2004; Guarne *et al.*, 2004; Sacho, 2008).

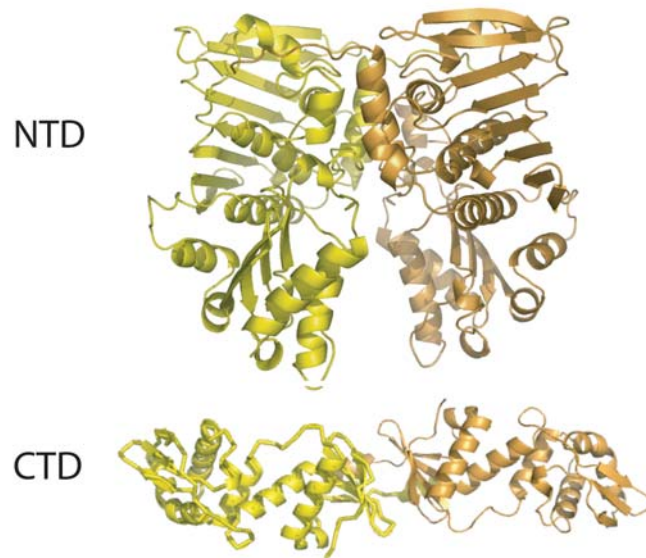
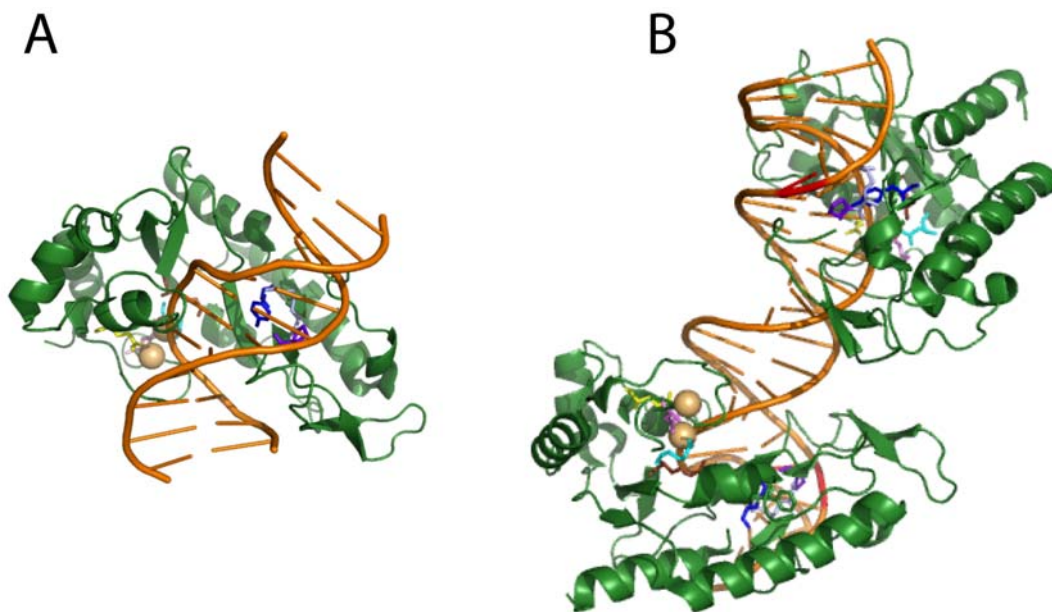


Abb. 1-5: Kristallstruktur von MutL aus *E. coli*: NTD, N-terminaler Teil; CTD, C-terminaler Teil

### 1.2.3. MutH – Strangdiskriminierung

Im Rahmen der MMR übernimmt MutH die Aufgabe der Strangdiskriminierung. Es spaltet in der hemimethylierten GATC-Erkennungssequenz den unmethylierten Strang vor dem G und führt dadurch einen Einzelstrangbruch (*nick*) ein. Dieser kennzeichnet den Strang für den nachfolgenden Reparatur-Mechanismus. Obwohl MutH an hemi- oder unmethylierte GATC-Sequenzen oder sogar GGTC-Sequenzen binden kann (Lee *et al.*, 2005), ist die Endonuklease-Aktivität von MutH spezifisch für GATC-Erkennungssequenzen in unmethylierter oder hemimethylierter DNA (Welsh, 1987, MutH Endonukleaseaktivität). Der methylierte DNA-Strang wird mit einer um 200-400-fach schwächeren Rate gespalten als der unmethylierte Strang (Friedhoff *et al.*, 2003). In Anwesenheit von MutS, MutL und ATP wird die eigentlich sehr geringe Endonukleaseaktivität des MutH-Proteins um das ~ 50-Fache stimuliert (Au *et al.*, 1992; Yang 2000). Die Struktur von MutH ist sequenzell und strukturell homolog zu Typ II Restriktionsendonukleasen (Ban, 1998). Wie die meisten Restriktionsendonukleasen besitzt MutH ein DEK (Asp-X(n)-Glu-X-Lys)-Motif, welches für die Koordination der Metall-Ionen und die DNA-Spaltung wichtig ist (Lee *et al.*, 2005). MutH kann in zwei Subdomänen unterteilt werden, einen N-terminalen und einen C-terminalen Arm, die eine V-ähnliche Struktur formen. Der N-Arm trägt den katalytischen Teil mit dem DEK-Motif, der C-Arm ermöglicht die Basenerkennung und die DNA-Bindung (Lee *et al.*, 2005). Beide Teile sind über drei „Polypeptid-linker“ miteinander verbunden (Ban & Yang, 1998). MutH bindet spezifisch an die GATC-Sequenz und interagiert unspezifisch mit zwei bis drei Basenpaaren jeweils seitlich davon. Nach der Bindung an die

Erkennungssequenz bewegen sich die beiden Arme  $6^\circ$  -  $18^\circ$  zueinander und die DNA-Bindungsfurche verengt sich. Tyr-212 übernimmt eine wichtige Rolle während der Erkennung des Methylierungsgrades der DNA (Friedhoff *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Außerdem sind noch Arg-184 und Pro-185 an der DNA Interaktion beteiligt. Das aktive Zentrum von MthH wird von den Aminosäuren Glu-56, Asp-70, Glu-77 und Lys-79 gebildet. Glu-56, Asp-70 und Glu-77 koordinieren dabei die zwei Metall-Ionen. Wahrscheinlich ist die exakte Koordination der Metall-Ionen im aktiven Zentrum ausschlaggebend für die substratspezifische Spaltung von MthH (Lee *et al.*, 2005).



**Abb. 1-6: Kristallstruktur von MthH mit unmethylierter DNA (A) und hemimethylierter DNA (B) (Lee *et al.*, 2005)**

22 bp lange hemimethylierte DNA, die zwei GATC-Sequenzen sind 8 bp voneinander entfernt. GATC-Sequenz, orange; methylierte Adenin, rot;  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen, hellbraune Kugeln. Glutamat an der Position 56, gelb; Aspartat 70, rosa; Glutamat 77, cyan; Lysin 79, braun; Arginin 184, hellblau; Prolin 185, lila; Tyrosin 212, dunkelblau

### 1.3. Die verschiedenen Modelle zur Kopplung von *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung

Grundlegend für die Reparatur einer Basenfehlpaarung oder IDLs in der DNA-Sequenz ist die Fehlererkennung durch MutS, die dann allerdings an die nachfolgenden Schritte, Strangdiskriminierung und Synthese des neuen DNA-Stranges gekoppelt sein muss. In *E. coli* erfolgen diese Schritte ausgehend von hemimethylierten GATC-Sequenzen. Da die Basenfehlpaarungen in DNA-Sequenzen zufällig auftreten, ist der Abstand zwischen der GATC-Erkennungssequenz und der Basenfehlpaarung sehr variabel. GATC-Sequenzen gibt

es alle 44 Basenpaare (= 256 bp), der mittlere Abstand zwischen einer Basenfehlpaarung und einer GATC-Sequenz ist 64 bp. Eine wichtige Frage, auch bei Untersuchungen anderer Systeme in der Biochemie, ist häufig, wie die Aktivität verschiedener Proteine an zwei manchmal mehr als 1000 bp voneinander entfernte Erkennungssequenzen gekoppelt werden kann. MutS beginnt die *mismatch*-Reparatur, indem es die Basenfehlpaarung in der DNA erkennt und an sie bindet. Ob MutS während der Einleitung des Reparaturprozesses am *mismatch* bleibt oder diesen verlässt, ist nicht bekannt. Das Verhalten von MutS nach der *mismatch*-Erkennung ist entscheidend für den Mechanismus. Prinzipiell lassen sich Modelle unterscheiden, in denen MutS entweder an der Basenfehlpaarung bleibt und von dort aus die Strangdiskriminierung aktiviert (*trans*-Aktivierung), oder Modelle, in denen es die Basenfehlpaarung verlässt und sich zur GATC-Erkennungssequenz hin bewegt um dort, gemeinsam mit MutL, MutH zu aktivieren (*cis*-Aktivierung) (Kolodner, 2007). In Anbetracht des großen Abstands zwischen *mismatch* und GATC-Erkennungssequenz kommen verschiedene Lösungswege infrage. Um einen *cis*-Mechanismen möglich zu machen muss die DNA-Helix intakt sein, damit die Proteine diffundieren/*sliden*, polymerisieren oder auf andere Art entlang der DNA-Helix kommunizieren können. Beispiele für die Aktivierung mit Hilfe von *cis*-Mechanismen gibt es bei Typ-I- und -III-Restriktionsendonukleasen, diese zeigen ATP-abhängige Translokation (Kolodner, 2007). Bei *trans*-Mechanismen werden die zwei verschiedenen Erkennungssequenzen bzw. die Basenfehlpaarung und die GATC-Erkennungssequenz zusammen gebracht, indem die DNA dazwischen gebogen wird (*looping*). *Trans*- Mechanismen können auch zwischen Erkennungssequenzen stattfinden, die auf verschiedenen DNA-Molekülen lokalisiert sind (Kolodner, 2007). DNA-*looping* taucht häufig in zellulären Prozessen, wie z. B. Transkription, Rekombination und Replikation auf (Saiz *et al.*, 2006).

Für den Mechanismus während der MMR sind gegenwärtig drei Modelle in der kontroversen Diskussion: *MutS-nucleated polymerisation*, *DNA bending*, *ATP-dependent movement*.

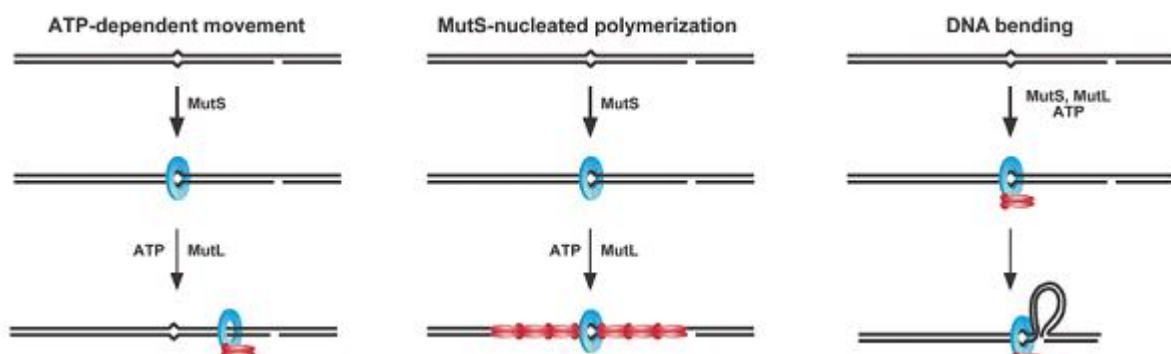


Abb.1-7: Die drei Modelle der *mismatch*-Reparatur (Modrich *et al.*, 2006)

### 1.3.1. ATP-dependent movement/sliding clamp-Modell

Das *ATP-dependent movement* oder auch *sliding clamp*-Modell beschreibt einen *cis*-Mechanismus, MutS erkennt die Basenfehlpaarung und bindet daran, anschließend bewegt es sich im Komplex mit MutL von der Basenfehlpaarung weg. Der Prozess ist an die GDP/GTP-Umwandlung bei G-Proteinen angelehnt (Acharya *et al.*, 2003; Gradia *et al.*, 1999). Die Bewegung wird erreicht durch eine ATP-abhängige Konformationsänderung von MutS. Der *mismatch* initiiert dabei den Austausch von ADP zu ATP und damit die Umformung des MutS-Moleküls (Gradia *et al.*, 1999). MutL bindet an diese Form von MutS und nach Erreichen der GATC-Erkennungssequenz aktivieren sie gemeinsam MutH. Das Signal wird terminiert, sobald MutS ATP hydrolysiert hat. Die Bewegung kann in beide Richtungen der DNA erfolgen, außerdem können auch mehrere MutS-Moleküle, die die Basenfehlpaarung umgeben, auf die DNA aufgeladen werden (Acharya *et al.*, 2003). MutL hat während dieses Prozesses zwei Aufgaben: erstens inhibiert es das neue Aufladen von MutS und zweitens stellt es die physikalische Verbindung zwischen MutS und MutH her (Acharya *et al.*, 2003). Es gibt Beweise dafür dass MutS sich auf der DNA-Helix ATP-abhängig fortbewegt und auch dafür, dass der MutS-MutL-Komplex sich entlang der DNA Helix bewegen kann, aber es ist noch nicht bekannt, ob und wenn ja, welche Rolle diese Art der Bewegung für den Mechanismus während der MMR hat (Pluciennik & Modrich, 2007).

### 1.3.2. MutS-Polymerisations-Modell

Das Polymerisations-Modell beschreibt einen zweiten Mechanismus der in *cis*, entlang der Helix-Kontur, erfolgt. Nach der Bindung von MutS werden nach und nach immer mehr Moleküle eines zweiten Proteins auf die DNA aufgeladen, wahrscheinlich MutL-Moleküle. Die Polymerisation erfolgt bidirektional und endet erst dann, wenn eine GATC-Erkennungssequenz erreicht worden ist. Das letzte MutL bindet und aktiviert MutH, welches anschließend die DNA spaltet.

### 1.3.3. Bending/looping-Modell

Die Gruppen um Wei Yang und Titia Sixma schlagen, ausgehend von strukturellen Informationen, das alternative *looping*-Modell (Guarne *et al.*, 2004; Sixma, 2001) vor. Außerdem zeigen elektronenmikroskopischen (EM-) und *atomic force microscopy* (AFM-) Studien, dass an die DNA gebundenes MutS *loops* ausbilden kann (Allen *et al.*, 1997; Jia *et al.*, 2008). Die elektronenmikroskopischen Studien von D. J. Allen *et al.*, 1997 lieferten Ergebnisse, in denen MutS *loop*-Strukturen nur in Abhängigkeit von einem *mismatch* und mit ATP ausbildet. Die Studien von Y. Jia *et al.*, 2008 zeigten allerdings mit Hilfe von AFM-

Daten, dass MutS auch ohne Nukleotid und unabhängig von einem *mismatch* in der Lage ist *loops* auszubilden. Deshalb ist nicht klar, ob die *loops*, die mit MutS gezeigt wurden konnten ausschlaggebend für die Aktivierung des Reparatur-Mechanismus sind. Das *looping*-Modell geht davon aus, dass MutS während des Reparaturvorgangs am *mismatch* bleibt. Nach der Erkennung der Basenfehlpaarung durch MutS wird MutL aktiviert und bindet an MutS. Während MutS und MutL an der Basenfehlpaarung gebunden sind, findet die Aktivierung von MutH mit Hilfe einer Biegung der DNA durch den Raum statt. Es bildet sich somit induziert durch MutS, MutL und MutH, ein DNA-*loop* zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz aus. Dieses Modell ähnelt dem der *trans*-Aktivierung bei der Genexpression zwischen dem Transkriptionsfaktor und der RNA-Polymerase.

#### 1.4. Zielsetzung

Seit Studien zeigten, dass stabile Dimere von MutS schon ausreichend für eine Aktivierung sind (Mendillo *et al.*, 2007), stellt sich zum einen die Frage, welche Funktion das Tetramer während der Aktivierung von MutH übernimmt, zum anderen ob auch ein Dimer von MutS ausreichend wäre.

Erstes Ziel der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche war es, MutS auf der DNA zu fixieren. Dazu sollte die *clamp*-Domäne des Proteins vernetzt und damit ein Öffnen nach der DNA-Bindung verhindert werden. Um die *clamp*-Domäne vernetzen zu können, sollte an der Position 483 in die cysteinfreie-Variante von MutS ein Cystein eingeführt werden. Mit Hilfe eines Methanthiosulfonat-*crosslinkers* könnten die beiden Cysteine eines jeweiligen Monomers vernetzt werden. Die *crosslink*-Reaktion findet durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Sulfhydrylgruppen statt. Weil MutS in Lösung in einem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht vorliegt und bekannt ist, dass mit Hilfe einer zusätzlichen Punktmutation in der C-terminalen Domäne die Fähigkeit der Tetramerisierung von MutS zerstört werden kann (Manelyte *et al.*, 2006; Menillo *et al.*, 2007), sollte zusätzlich die Mutation D835R eingeführt werden. Damit könnte sichergestellt werden, dass die MutS-DNA-Komplexe nur aus stabilen MutS-Dimeren bestehen. Ziel war es, stabile MutS-DNA-Komplexe zu bilden und möglichst die in diesem Komplex vorhandenen MutS-Moleküle zu „zählen“. Außerdem sollte untersucht werden, ob ein zwischen den *clamp*-Domänen geschlossenes MutS-Molekül endblockierte DNA nicht mehr verlassen kann und trotzdem noch in der Lage ist, in Schritten des MMR zu wirken. DNA ohne offene Enden sollte entweder durch die Bindung von Streptavidin an biotinylierte DNA-Enden oder in späteren

Experimenten, durch das Einsetzen von zirkulären DNA-Substraten erreicht werden. Unter Verwendung verschieden langer *crosslinker* sollte ferner getestet werden, wie viel Flexibilität die *clamp*-Domänen benötigen um ein *sliding* von MutS auf der DNA zu ermöglichen.

Zum Zweiten stand der Mechanismus der Signalweiterleitung, nach der *mismatch*-Erkennung bis zur Strangdiskriminierung, im Mittelpunkt der hier beschriebenen Versuche. Dazu sollten zwei kontrovers diskutierte Modelle zum Mechanismus des MMR bestätigt bzw. widerlegt werden. Beim *moving/sliding clamp*-Modell verlässt MutS für die Aktivierung von MutH den *mismatch* und bewegt sich über lineare Diffusion bis zur GATC-Erkennungssequenz. Beim *static/looping*-Modell bleibt MutS während der Aktivierung der Strangdiskriminierung an der Basenfehlpaarung gebunden und die DNA zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz bildet im Nukleoprotein-Komplex einen *loop*. Die Weiterleitung des Strangdiskriminierungssignals sollte durch das Einsetzen von verschiedenen DNA-Substraten getestet werden. Durch Setzen eines *roadblocks* zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz sollte ein *sliding* von MutS auf der DNA unterbunden werden. Ferner wurden Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen hinter der Basenfehlpaarung verwendet. Ein auf der DNA diffundierendes MutS, vom *mismatch* aktiviert, könnte zuerst MutH an der GATC-Erkennungssequenz aktivieren, die der Basenfehlpaarung am nächsten ist, was auf einen gerichteten Aktivierungsmechanismus hindeuten würde. Schließlich sollten Substrate verwendet werden, bei denen eine gleichzeitige Bindung von MutS an die Fehlpaarung und von MutH an die GATC-Erkennungssequenz nicht möglich ist, da beide nur zwei Basenpaare auseinander liegen. MutS muss die Basenfehlpaarung verlassen, damit MutH spalten kann.

## 2 Material und Methoden

Gängige Standardverfahren wurden, sofern dies nicht anders vermerkt ist, nach den Ausführungen der Laborhandbücher *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 1992-2005) durchgeführt.

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Acrylamid/BisAcrylamid 40 %, 29:1	AppliChem
ADP	Sigma
Agar	AppliChem
Agarose (Ultra PURE™)	AppliChem
Aktivkohle	Merk
Ampicillin	AppliChem
ATP	Sigma
Bromphenolblau	Merk
BSA	New England BioLabs
<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	AppliChem
DNA-Längenstandards	MBI-Fermentas
dNTPs	Fermentas
DTT	AppliChem
EDTA	Roche
Ethanol	Merk
Ethidiumbromid	Merk
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
HEPES	AppliChem
Imidazol	AppliChem
IPTG	AppliChem
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merk
Magnesiumchlorid	Merk
Methanol	Merk
Natriumchlorid	Merk
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN
Oligodesoxyribonukleotide	Biomers
Phosphorsäure	Merk
Salzsäure	Merk
SDS	Sigma
TEMED	Merk
Tris	AppliChem



## 2.1.2. Enzyme und Proteine

BshII	Fermentas
DpnI	Fermentas
Nb.BtsI	New England BioLabs
Nt.AlwI	New England BioLabs
Exonuklease I	New England BioLabs
Exonuklease III	New England BioLabs
FokI	New England BioLabs
NgoMIV	New England BioLabs
MutH	eigene Herstellung
MutL	eigene Herstellung
Cfr13I	Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung (I. Dern)
<i>Single Strand Binding Protein</i> (SSB)	New England BioLabs
Streptavidin	New England BioLabs
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung (I. Dern)
$\lambda$ -Exonuclease	New England BioLabs

## 2.1.3. Puffer

### 2.1.3.1. Gelelektrophorese und Substratherstellung

#### 10x TPE-Elektrodenpuffer

800 mM	Tris-Phosphat
20 mM	EDTA
pH 8.2	mit konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

#### 10x SDS-Elektrodenpuffer

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

#### 10x Puffer gelb

100 mM	Tris/HCl, pH 7.5
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mg/ml	BSA

#### 5x Laemmli-Auftragspuffer (LAP)

160mM	Tris/HCl, pH 6.8
5% (v/v)	2-Mercaptoethanol (BME)
2% (v/v)	SDS
40% (v/v)	Glycerin

**5x Agarose-Auftragspuffer (AAP)**

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

**10x Pfu-Puffer**

200 mM Tris/HCl, pH 9  
100 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>  
100 mM KCl  
1 % Triton X-100  
20 mM MgSO<sub>4</sub>

**10x Taq-Puffer**

100 mM Tris/HCl, pH 9  
500 mM KCl  
1 % Triton X-100  
15 mM MgCl<sub>2</sub>

**10x Ligase Puffer (Fermentas)**

400 mM Tris-HCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT  
5 mM ATP (pH 7.8 bei 25°C)

**10x Exonuklease I Puffer (Fermentas)**

670 mM glycine-KOH (pH 9.5 bei 25°C)  
67 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT

**10x Puffer R (Fermentas)**

10 mM Tris-HCl (pH 8.5 bei 37°C),  
10 mM MgCl<sub>2</sub>,  
100 mM KCl,  
0.1 mg/ml BSA

**10x NEBuffer 3 (New England BioLabs)**

1 M NaCl  
500 mM Tris-HCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Dithiothreitol  
pH 7.9

**10x NEBuffer 2 (New England BioLabs)**

100 mM Tris-HCl  
500 mM NaCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Dithiothreitol  
pH 7.9

**2.1.3.2. DNA-Bindungsexperimente****10x DNA Bindungspuffer**

200 mM	Hepes
50 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.1 mM	EDTA
pH 7.5	mit NaOH

**10x DNA Bindungs-Auftragspuffer**

20 mM	EDTA
50 %	Glycerin
0.01 % (w/v)	Bromphenolblau

**50x TAE-Elektrodenpuffer**

2 M	Tris
1 M	Na-Acetat
50 mM	EDTA
pH 8.0	mit Eisessig eingestellt

**2.1.3.3. Proteinreinigung****1x Bindungspuffer**

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

**1x Waschpuffer**

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

**1x Elutionspuffer**

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

**1x Dialysepuffer**

20 mM	HEPES/KOH, pH 7.9
200 mM	KCl
1 mM	EDTA

## 2.2. Mikrobiologisches Arbeiten

### 2.2.1. Bakterienstämme

Mit Hilfe von *Escherichia coli* HMS174( $\lambda$ DE3) wurden die Varianten von MutS exprimiert (Feng & Winkler, 1995) und die Plasmide amplifiziert, die als *template* für die DNA-Substratherstellung dienten.

#### 1. HMS174( $\lambda$ DE3)

Genotyp: F- *recA hsdR*( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) Rif<sup>R</sup> (DE3).

Dieser Stamm eignet sich besonders gut für die Expression von Proteinen in großem Maßstab.

#### 2. TX2929

(CC106 *mutS* 201:: Tn5; Kan<sup>r</sup>) (Feng & Winkler, 1995)

Bei dem Mutatortest wurde dieser Stamm verwendet (siehe 2.4.8.).

### 2.2.2. Plasmide

pET-15b (His-tag Vektor, Ap<sup>r</sup> (Novagen))

pET15b-XhoI und pET15b-HindIII wurden für die Spaltkinetiken verwendet (Thomas *et al.*, 2002).

pTX412: pET-15b (*E. coli* K-12  $\phi$ (*his*<sub>6</sub>-tag-*mutS*<sup>+</sup>)Hyb (Feng & Winkler 1995)

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

(freundlicherweise von Dr. L. Manelyte zur Verfügung gestellt)

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Plasmid DNA-Präparationen

Die Isolierung von Plasmiden in kleinem Maßstab (3ml) wurde mit den entsprechenden Aufreinigungskits von Promega durchgeführt.

### 2.3.2. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von PCR-Produkten und Plasmiden zu bestimmen, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass bei doppelsträngiger DNA  $1 \text{ OD}^{260}_{\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$  Desoxyribonukleinsäure gilt.

### 2.3.3. Gelelektrophoretische Analyse

Die Analyse von Proteinen und DNA-Fragmenten wurde mit elektrophoretischen Verfahren durchgeführt (Ausubel, 1992-2005).

Dabei diente die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAAG) zur Auftrennung von Nukleinsäuren mit einer Länge unter 1000 bp (Ausubel, 1992-2005). Als DNA-Längenmarker wurde der pUC Mix Marker 8 (Fermentas) verwendet. Die Agarosegelelektrophorese diente zur Auftrennung von Nukleinsäuren mit einer Länge über 1000bp, als Längenmarker wurde der 1 kb Ladder (Fermentas) verwendet, oder für einige Nukleinsäure Protein-Shift-Experimente.

Die analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde für die Analyse von Proteinen eingesetzt. Als Proteinlängenmarker wurde die Page Ruler<sup>TM</sup> Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

#### 2.3.4. PCR-Reaktionen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; (Mullis & Faloona, 1987) wurde in dieser Arbeit für unterschiedliche Zwecke eingesetzt. Sie diente zur Herstellung der *mismatch*-Substrate, zur zielgerichteten Mutagenese und zur Sequenzierung der mutierten *mutS*-Gene. Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet, für die Mutagenese und die *mismatch*-Substratsynthese die *Pfu*-DNA-Polymerase. Die Amplifikationen wurden in Thermocyclern der Firma Whatman Biometra durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt. Für alle innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführten DNA-Aufreinigungen wurde das „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ der Firma Promega benutzt.

##### 2.3.4.1. PCR für die *mismatch*-Substrate

Zwei Bedingungen während der PCR sind entscheidend, um die Fehlerrate in der Basensequenz des PCR-Produktes möglichst gering zu halten. Zum einen wird mit sehr wenigen Zyklen gearbeitet (< 20), zum anderen wird die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Die *Pfu*-DNA-Polymerase besitzt zwei Aktivitäten, die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und die 5'-3'-*proofreading*-Aktivität. Sie weist dadurch eine Fehlerrate bei der Replikation von  $10^{-6}$  pro Basenpaar auf, im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase, die eine Fehlerrate von  $10^{-4}$  pro Basenpaar hat.

Wenn nicht anders im Text angegeben, wurden für eine 30 µl PCR-Reaktion 9 ng *template* DNA, jeweils 400 nM des 5' (Hin-) und 3' (Rück-) *primer*, 200 µM dNTP's und 1 U *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt und die Reaktion in 1x PCR-Puffer durchgeführt.

Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist spezifisch für die jeweiligen *primer* und wird an den entsprechenden Stellen im Text angegeben. Die erhaltenen PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch analysiert und aufgereinigt. Bei der Aufreinigung mit dem „Wizard® SV

*Gel and PCR Clean-UpSystem*“ der Firma Promega werden die PCR-*primer*, die dNTP's und die DNA-Polymerase von dem PCR-Produkt abgetrennt.

#### Temperaturprofil (*mismatch*-Substrat)

Phase	1	2			3	4
T (°C)	94	94	50-56	68	68	4
t (sec)	60	30	30	50	300	∞
Zyklen	1	20			1	∞

Die *annealing*-Temperatur hängt von dem eingesetzten *primer*-Paar ab. Sie wird mit Hilfe des Programms Vector NTI (Informaxx Inc.) berechnet.

#### 2.3.4.2 *Primer*-Sequenzen

Sequenzen der für die Generierung des *mismatch*-Substrats verwendeten *primer* (Biomers):

Bezeichnung:

<b>MutS_CTD</b>	5'-GTTATTAAGCGCGCACGGCAAAGCTG-3'
<b>S_D835R_Cfr13I</b>	5'-GGTGAGTGATCTCGGGTCCAGATTTTCCA-3'
<b>BBseqA</b>	5'-CCCGCGAAATTAATACGACTC-3'
<b>BBseqB</b>	5'-CTTCCTTTCGGGCTTTGTTAG-3'
<b>BBseqB111</b>	5'-TCATCCTCGGCACCGTCAC-3'
<b>BBseqB236</b>	5'-TAGAGGCCCAAGGGGTTAT-3'
<b>BBseqA302</b>	5'-ATCTTCCCACATCGGTGATGTC-3'
<b>Caro_34 Hin</b>	5'-CGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACA-5'
<b>GEX her lang</b>	5'-ATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCAC-3'
Alle oben genannten <i>primer</i> wurden unmodifiziert, aber auch 5'-phosphoryliert und 5'-biotinyliert eingesetzt.	
<b>Back_21-P</b>	5'-TCCGGCGTAGAGGATGAAGCT-3'
<b>T-HindIII-biot</b>	5'-TCCGGCGTAGAGGATGAAGCT <u>TTC</u> GAGCCCGCGAAATTAATA-3'
<b>T-HindIII-6_42bp</b>	5'-TCCGG <u>T</u> GTAGAGGATGAAGCTC TCGAGCCCGCGAAATTAATA-3'
<b>Homo C XhoI-biot</b>	5'-TCCGGCGTAGAGGATGAAGCT <u>C</u> TCGAGCCCGCGAAATTAATA-3'
<b>Gap MM-A401</b>	5'-CGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGG-3'
<b>BBseqA401</b>	5'-CGACGACGGGTACCATATAGA-3'
<b>35_Caro</b>	5'-CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG-5'

Die folgenden *primer* wurden für die Herstellung der zirkulären *mismatch*-Substrate verwendet:

<b>A-Adapter_HindIII_Nb.BtsI_B111</b>	5'-CTC <u>A</u> AGCTTCACTGCTCATCCTCGG CACCGTCAC-3'
<b>A-Adapter_Xho_Nb.BtsI-B111</b>	5'-CTC <u>G</u> AGCTTCACTGCTCATCCTCGG CACCGTCAC-3'
<b>A2-XhoI_Nb.BtsI-A302</b>	5'-AAGCT <u>C</u> GAGCACTGCATCTTCCCCATC GGTGATGTC-3'
<b>Forward_T_bottom_-2GATC_HindIII</b>	5'-ATCA <u>A</u> GCTTCACTGCGTCTCATGAG CGGATACAT-3'
<b>Reverse_A_top_-2GATC_HindIII</b>	5'-AAGCT <u>T</u> GATCACTGCCGGCTGCTAACA AAGCCCGAA-3'
<b>Reverse_G_top_-2GATC_delta_HindIII</b>	5'-AAGC <u>T</u> GATCACTGCCGGCTGCTAACA AAGCCCGAA-3'
<b>Forward_T_bottom-12GATC_HindIII</b>	5'-CTCA <u>A</u> GCTTCACTGCCATGAGCGGA TACATATTT-3'
<b>Reverse_A_top_-12GATC_deltaHindIII</b>	5'-AAGC <u>T</u> TGAGCACTGCCGATCCGGCTGC TAACAAAGC-3'
<b>Reverse_G_top_-12GATC_deltaHindIII</b>	5'-AAGC <u>T</u> TGAGCACTGCCGATCCGGCTGC TAACAAAGC-3'

## 2.4. Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete PCR-Mutagenese erfolgt nach einem Protokoll, das sich an die Methode von (Kirsch & Joly, 1998) anlehnt. Der Basenaustausch innerhalb des zu mutierenden Gens erfolgt dabei in zwei Schritten, die jeweils aus einer PCR bestehen. Die gewünschte Mutation wird durch Genamplifikation mit Hilfe eines PCR-*primers* eingeführt. Durch den Mutagenese-*primer* wird zusätzlich durch eine stille Mutation noch eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym als Marker in das *mutS*-Gen eingefügt. Das Plasmid pTX412-CF dient als *template* und wurde von Frau Laura Manelyte im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurde eine neue Einzelcystein Variante von MutS hergestellt, MutS<sup>D835R H483C</sup>. Im ersten Schritt wird ein sog. *megaprimer* hergestellt, der eine Länge von 161 bp aufweist. Der *megaprimer* dient dann in der zweiten PCR als *primer*, um den gesamten Plasmidvektor linear zu amplifizieren. Das Produkt ist in zirkulärer Form stabil, obwohl die Enden nicht kovalent durch Ligation verknüpft werden.

Die Sequenzen der für die Mutagenese verwendeten *primer*:

**MutS\_CTD** 5'-GTTATTAAGCGCGCACGGCAAAAGCTG-3'

**S\_D835R\_Cfr13I** 5'-GGTGAGTGATCTCGGGTCCAGATTTTCCA-3'

### 2.4.1. Megaprimer-PCR

Ein 50 µl Ansatz enthält folgende Reagenzien:

1x	<i>Pfu</i> -Puffer
50-100 ng	<i>template</i>
0.2 mM	dNTPs
0.4 µM	<i>sense primer</i>
0.4 µM	<i>antisense primer</i>
5U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase

Das Temperaturprofil der PCR kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Temperaturprofil megaprimer-PCR**

Phase	1	2			3	4	5
<b>T (°C)</b>	95	95	56	68	56	68	4
<b>t (sec)</b>	120	30	60	60	60	660	∞
<b>Zyklen</b>	1	20			1	1	1

### 2.4.2 Mutagenese-PCR

Aus der 1. Mutagenese-PCR werden in der Regel 1 µg PCR-Produkt erhalten. Davon werden ca. 200 ng für die nächste PCR eingesetzt.

Ein 50 µl Ansatz umfasst folgende Reagenzien:

100 ng Plasmid
ca. 200 ng <i>megaprimer</i>
0.4 mM dNTPs
3 U <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
1x <i>Pfu</i> -Puffer
Endvolumen 50 µl.

Das Temperaturprofil der PCR kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Temperaturprofil Mutagenese-PCR**

Phase	1	2			3			4	5
<b>T (°C)</b>	95	95	55	68	95	55	68	68	4
<b>t (sec)</b>	120	50	55	1500	50	55	1500	660	∞
<b>Zyklen</b>	1	8			8			1	∞



### 2.4.3. Restriktionsverdau mit DpnI

Mit Hilfe von DpnI kann das als *template*-DNA verwendete Plasmid vollständig entfernt werden, damit nur noch der mittels PCR synthetisierte offenzirkuläre Plasmidvektor in der Probe vorhanden ist. DpnI erkennt und spaltet spezifisch methylierte *dam*-Erkennungsstellen ( $G^mATC$ ). Das als *template* eingesetzte Plasmid stammt aus *dam*<sup>+</sup> Bakterienzellen und ist daher *dam*-methyliert. Im Gegensatz dazu ist das in der PCR gebildete Produkt nicht methyliert und wird deshalb nicht gespalten.

Für den Restriktionsverdau werden 50 µl des 2. Mutagenese PCR-Ansatzes mit 0.5 U DpnI für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 2.4.4. Ethanolfällung

Für eine Transformation von *E. coli* muss die DNA salz- und proteinfrei sein, weshalb eine Ethanolfällung durchgeführt wird. Die Plasmidlösung wird mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4.6) und dem dreifachen Volumen Ethanol 96 % (v/v) versetzt. Durch die hohe Konzentration an monovalenten Kationen und einem anschließenden Lösungsmittelentzug wird eine Fällung der DNA erreicht. Der Ansatz wird für 30 min bei -4 °C inkubiert und dann 30 min bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 300 µl kaltem 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (20 min, 12.000 rpm bei 4 °C) wird wieder der Überstand verworfen. Das Sediment wird getrocknet (37 °C) und zuletzt in 5 µl Reinstwasser aufgenommen.

### 2.4.5. Elektrotransformation

Damit die Plasmid-DNA mit der Mutation in die Bakterienzellen eingeschleust werden kann muss die Zellmembran mit Hilfe von Elektrotransformation durchlässig gemacht werden. Hierfür wird ein Elektroporator der Firma Invitrogen (NV Keek, Niederlande) verwendet. Er hat eine Kondensatorkapazität von 50 µF bei einer Spannung von 1500 V. Spezielle Küvetten (Invitrogen) dienen als Reaktionsgefäße, sie tragen auf zwei Seiten Metallelektroden. Die Zellmembranen der elektrokompenten Bakterien werden durch eine Entladung der Elektroden über der mit Bakterien-/ Plasmidsuspension beladenen Küvette durchlässig gemacht. Die DNA mit der Mutation kann nun ins Zellinnere des Bakteriums eindringen. Die Zelldichte sollte nicht mehr als  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml betragen, um eine Zellfusion zu vermeiden. Die Küvetten und auch die elektrokompenten Zellen müssen vor der Transformation auf Eis gekühlt werden.

### 2.4.6. Ausplattieren der transformierten Zellen

Um das auszuplattierende Flüssigkeitsvolumen gering zu halten, werden die transformierten Zellen nach dem Inkubieren in LB-Medium kurz zentrifugiert und der Überstand bis auf ein Restvolumen von ca. 100 µl dekantiert. Das Pellet wird resuspendiert und der gesamte Ansatz auf eine Agarplatte (LB-Medium) mit dem Antibiotikum Ampicilin (75 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.4.7. Screening markerpositiver Klone

Zur Kontrolle auf markerpositive Klone werden mit einem sterilen Zahnstocher Klone, die als *template* dienen, der angewachsenen Bakterienkulturen von der Agarplatte entnommen und in PCR-Reaktionsgefäßen abgestrichen. Hierauf wird dann der PCR-Reaktionsansatz gegeben. Außerdem werden mit demselben Zahnstocher die gewählten Klone auf einer Agarplatte mit Ampicilin (75 µg/ml) ausgestrichen.

Bei der *screening*-PCR werden die gleichen *primer sense primer* BBseqB und *antisense primer* A verwendet und so für jede generierte Mutante ein Fragment identischer Länge erzeugt. Anhand der Größe des PCR-Produktes bzw. dem Auftauchen von spezifischen Spaltfragmenten kann nun erkannt werden, ob der Klon das gewünschte mutierte *mutS*-Gen enthält oder nicht.

Zu einem Reaktionsansatz von 20 µl werden 2.5 µl (ca. 200 ng DNA) vom *screening*-PCR Ansatz zugegeben. Das PCR-Produkt wurde mit 8-12 U Restriktionsenzym (je nach Aktivität) in entsprechendem Puffer für 30 min bei für das Enzym optimaler Temperatur gespalten. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5x AAP gestoppt und die Spaltprodukte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Das Temperaturprofil der *screening*-PCR kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Temperaturprofil der *screening*-PCR**

Phase	1	2			3	4
T (°C)	94	94	62	72	72	4
t (sec)	300	30	30	180	300	∞
Zyklen	1	30			1	∞

### 2.4.8. *In vivo*-Aktivitätstest der Mutanten

Durch die Bestimmung von spontan auftretender Rifampicin-Resistenz kann die Mutationsfrequenz ermittelt werden. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von (Wu & Marinus, 1999).

Die Bakterien des Stammes TX2929, deren *mutS*-Gen durch Deletion inaktiviert wurde, werden nach der Transformation mit den entsprechenden Plasmiden in 3 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum Ampicilin (100 µg/ml) bei 37 °C für 15-17 h inkubiert. 50 µl Aliquots der Kulturen werden auf LB-Platten mit Ampicilin (75 µg/ml) und Rifampicin (75 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Zahl der Klone bestimmt. Die Rifampicinresistenz beruht auf Mutationen im *rpoB*-Gen, die durch DNA-Polymerase-Synthesefehler entstehen. Bakterien, die das neue Gen aufgenommen haben, besitzen ein intaktes MMR und sind deshalb kaum fähig, durch Mutation eine Rifampicin-Resistenz zu entwickeln. Als Kontrolle dient hierbei eine LB-Platte mit dem Wildtypbakterium. Bakterien mit einem pET-15b Plasmid, die kein neu eingeführtes Gen von MutS besitzen, haben eine stark erhöhte Mutationsrate und werden viel häufiger eine Resistenz gegen Rifampicin ausbilden.

## 2.4.9. Proteinexpression und Reinigung

### 2.4.9.1. Proteinexpression

Die Gene des verwendeten Plasmids stehen unter Kontrolle des T7-Promotors und können durch Zugabe von IPTG induziert werden. Die Induktion führt zur Bildung der T7-RNA-Polymerase, deren Gen unter lac-Promotor-Kontrolle steht.

Die gewählten Klone wurden auf Agarplatten mit Ampicilin (100 µg/ml) ausplattiert. Von einzelnen Kolonien wurden Vorkulturen (25 ml) angeimpft und die Hauptkultur (500 ml) am nächsten Tag mit einem Teil (10 ml) der über Nacht inkubierten Vorkultur beimpft. Kurz vor dem Animpfen wird das Antibiotikum Ampicilin (100 µg/ml) zugegeben. Bei einer optischen Dichte (Extinktion) von 0.3-0.6 bei 600 nm erfolgt die Induktion mit 1 mM IPTG und anschließend wird für 4 h bei 28 °C inkubiert.

### 2.4.9.2. Protein-Aufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

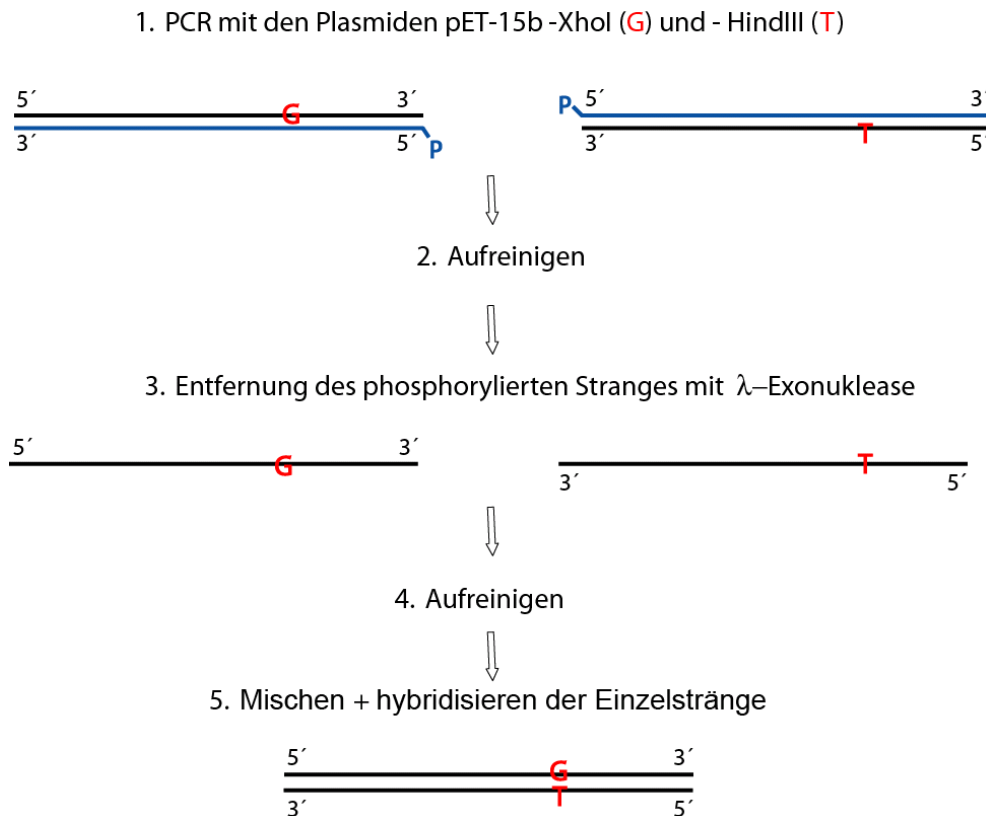
Da die hier verwendeten Proteine einen N-terminalen His<sub>6</sub>-tag tragen, konnten sie über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) aufgereinigt werden. Nach dem Zellaufschluss wurde der klare Überstand mit 1.5 ml der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-beads in einem 15 ml-Falcon<sup>TM</sup>-Röhrchen gemischt und zum Binden der Proteine an das Nickelchelat-Material für 90 min bei 4 °C an die Säulenmatrix gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit 20 ml Waschpuffer wurden die an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-beads gebundenen Proteine in eine Säule überführt. Anschließend wurden sie mit einem Elutionspuffer von dem Säulenmaterial eluiert. Zu den proteinhaltigen Fraktionen wurde 10 mM DTT zugegeben, um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Anschließend wurden die Eluate im

Anschluss intensiv gegen Dialysepuffer dialysiert. Mit Hilfe der bei 280 nm bestimmten Extinktion (E) und dem theoretischen molaren Extinktionskoeffizient ( $\epsilon = 69420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 280 nm von His<sub>6</sub>-MutS (Pace *et al.*, 1995) wurde die Konzentration der Proteine bestimmt.

## 2.5. Substratherstellung

### 2.5.1. *mismatch*-Substrat-Synthese für lineare Substrate

Die Herstellung der *mismatch*-Substrate erfolgte in Anlehnung an ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes Protokoll (Thomas, 2002). Das Protokoll wurde getestet und an einigen Stellen verbessert. Die PCR-Produkte sollten möglichst fehlerfrei sein, um ungewollte Fehlpaarungen zu vermeiden, deshalb wurde die Zyklenanzahl verringert und die eingesetzte *template*-Menge erhöht. Alle Substrate wurden nach diesem, im folgenden Abschnitt beschriebenen Verfahren hergestellt (siehe Abb.2-1). Je nach gewünschtem Substrat wurden die *primer* variiert. Zur Herstellung der zwei PCR-Produkte wurde das Plasmid pET-15b verwendet. Eines der beiden Plasmide enthält eine XhoI-Schnittstelle und das andere eine HindIII-Schnittstelle, so dass sich beide nur in einem Basenpaar unterscheiden.



**Abb. 2-1: Schema für die Herstellung der *mismatch*-Substrate**

Die Herstellung der *mismatch*-Substrate besteht aus fünf Schritten: Im ersten Schritt wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt (*template*-Plasmide unterscheiden sich nur in einem Basenpaar); im zweiten Schritt wurden die Produkte aufgereinigt, im dritten Schritt wurde jeweils der 5'-phosphorylierte Strang durch die  $\lambda$ -Exonuklease entfernt; im vierten Schritt wurden die Einzelstränge nochmals aufgereinigt. Zuletzt wurden equimolare Mengen der Einzelstränge gemischt und hybridisiert.

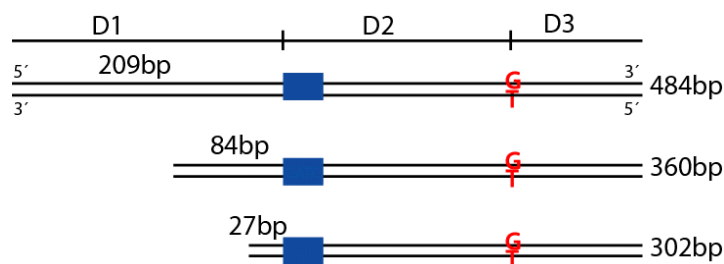
Durch die Verwendung eines phosphorylierten *primers* bei der PCR-Reaktion erhält man ein Produkt, das an einem Strang eine 5'-Phosphatgruppe trägt. Die PCR-Produkte werden aufgereinigt. Um den phosphorylierten Strang zu entfernen, inkubiert man 1000 ng des aufgereinigten PCR-Produkts mit 5 U  $\lambda$ -Exonuklease. Diese entfernt Nukleotide von doppelsträngiger DNA in 5'-3'-Richtung. Die Reaktion erfolgt für 1 h 20 min bei 37 °C und wird auf Eis abgestoppt. Da sich die elektrophoretische Mobilität einzelsträngiger DNA von der doppelsträngiger DNA unterscheidet, kann auf einem 6 %-igen Polyacrylamidgel analysiert werden, ob die Reaktion vollständig stattgefunden hat. Nach dieser Kontrolle wurden equimolare Mengen der beiden Einzelstränge gemischt und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Bei dem langsamen Abkühlen (im ausgeschalteten Heizblock) hybridisieren die komplementären Einzelstränge und bilden den neuen Doppelstrang mit der gewünschten Basenfehlpaarung. Die so hybridisierten Doppelstränge werden noch einmal nach dem „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ von Promega aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

### 2.5.2. Homoduplex-Substrat-Synthese für lineare Substrate

Alle hergestellten Homoduplex-Substrate dienten als Negativ-Kontrolle; sie wurden immer nach dem gleichen in 2.5.1 beschriebenen Protokoll hergestellt, allerdings wurde in beiden PCR-Reaktionen das gleiche Plasmid als *template* eingesetzt. In die Homoduplexe wird keine Basenfehlpaarung eingeführt; idealer Weise sollte bei Homoduplex-Substrat keine *mismatch*-abhängige Aktivierung der MutH-Endonuklease durch MutS zu beobachten sein. Wenn doch eine geringe Aktivierung auftrat, beruht diese nicht auf einer definierten Basenfehlpaarung, sondern vielmehr auf einer Fehlpaarung durch Fehler der Polymerase während der PCR (vgl. Smith & Modrich, 1996).

### 2.5.3. Unterschiedliche Längen von D1

Im ersten Teil der Arbeit wurde nur die Länge D1 (209-84 bp) variiert, die beiden anderen Parameter blieben gleich. D2 hatte eine konstante Länge von 86 bp und D3 von 99 bp. Um die unterschiedlichen Substrate herzustellen, wurden die *primer* in der PCR-Reaktion variiert (siehe *primer*-Sequenzen 2.3.4.2.).



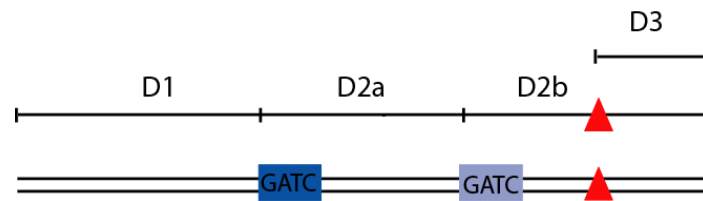
**Abb. 2-2: Drei *mismatch*-Substrate mit unterschiedlicher Länge von D1**

Die Abstände D2 (176 bp) und D3 (99 bp) sind in allen drei Substraten gleich groß.

### 2.5.4. Lineare *mismatch*-Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen

Die Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen, besitzen eine Basenfehlpaarung, die immer an der gleichen Position in der Sequenz liegt. Von den zwei GATC-Erkennungssequenzen befindet sich eine der beiden immer an der gleichen Position innerhalb der Sequenz, die zweite GATC-Erkennungssequenz kann an der Position -20 (d.h. das C der GATC-Erkennungssequenz liegt 20 Basen entfernt von dem G der G/T Basenfehlpaarung), 40 oder 80 bp entfernt von der Basenfehlpaarung positioniert sein. Zum besseren Verständnis kann jedes dieser Substrate in drei Abschnitte unterteilt werden: D1, D2 und D3; D1 beschreibt den Abstand des Guanins der zweiten (bezogen auf die Basenfehlpaarung) GATC-Erkennungssequenz zum 5'-Ende des oberen DNA-Strangs, D2 beschreibt den Abstand zwischen dem Guanin der ersten GATC-Erkennungssequenz und dem der zweiten GATC-Erkennungssequenz und D3 umfasst den Abstand von dem Guanin der ersten GATC-

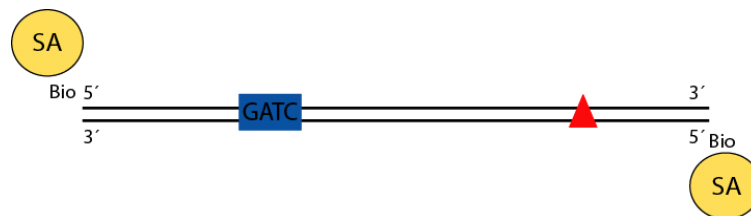
Erkennungssequenz bis zum 3'-Ende des oberen Strangs. Je nach gewünschtem Substrat wurden die *primer* variiert.



**Abb. 2-3: Die drei Abschnitte des *mismatch*-Substrates**

D1 = Abstand zwischen dem Ende der DNA und der zweiten GATC-Erkennungssequenz; D2a = Abstand zwischen der ersten und der zweiten GATC-Erkennungssequenz; D2b = Abstand der ersten GATC-Erkennungssequenz bis zum Ende der DNA

### 2.5.5. Bindung von Streptavidin an 5'-biotinylierte DNA-Substrate



**Abb. 2-4: *Mismatch*-Substrat mit Biotin-Streptavidin-Blockaden an beiden Enden**

Bio, Biotin; SA, Streptavidin

Für die Herstellung der an den Enden biotinylierten Substrate, wurden die gleichen *primer* wie während der *mismatch*-Substrat Synthese (siehe 2.5.1) verwendet, nur war hier jeweils der nicht phosphorylierte *primer* 5'-biotinyliert. Um die Enden zu blockieren, wurde Streptavidin mit der biotinylierten DNA inkubiert. Streptavidin besteht aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 13 kDa pro Untereinheit. Streptavidin hat eine hohe Bindungsaffinität für Biotin ( $K_a \sim 10^{13} \text{ M}^{-1}$ ) (Freitag, *et al.* 1997). Jede Untereinheit besitzt eine Biotinbindungsstelle.

Nach Variation der Konzentrationsverhältnisse zwischen Streptavidin und biotinylierter-DNA wurden gute Ergebnisse mit einem 20-fachen Überschuss von Streptavidin (0.2  $\mu\text{M}$ ) gegenüber DNA (10 nM) erreicht. Die DNA als Spaltssubstrat wurde mit Streptavidin für 30 min bei RT inkubiert. Die weitere Reaktion und Analyse wurde dann wie in Abschnitt 2.6. beschrieben, durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 1, 2, 5, 10, 20, 60 min wurden gleiche Volumina (10  $\mu\text{l}$ ) entnommen und die Reaktion mit 2.5  $\mu\text{l}$  5x AAP gestoppt.

Bedingungen des Aktivitätstests:

1 $\mu$ M	MutL
0.5 $\mu$ M	MutH
0.5 $\mu$ M	MutS
10 nM	DNA
0.2 $\mu$ M	Streptavidin
150 mM	KCl
1 mM	ATP
1x	Puffer gelb

### 2.5.6. Blockade zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz

Als Blockade zwischen der GATC-Erkennungssequenz und dem *mismatch* wurden vier verschiedene Substrate hergestellt 1) mit einer Lücke (73 bp) zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz, 2) mit einer Lücke (73 bp) und SSB gebunden, 3) mit einer Lücke und einem Streptavidin an das Ende eines DNA Stranges innerhalb der Lücke gebunden, 4) ein Doppelstrangbruch und ein Streptavidinmolekül, das die zwei DNA-Stränge miteinander verknüpft.

#### 2.5.6.1. Blockade durch eine Lücke, gefüllt mit SSB

Das *single strand binding protein* (SSB) stammt aus dem *E. coli* Bakterium und besteht aus 177 Aminosäuren. SSB bindet als Homotetramer an einzelsträngige DNA, um diese zu stabilisieren. In Bakterien hat es wichtige Aufgaben bei der Replikation, der Rekombination und der Reparatur von DNA. Um SSB als Blockade zwischen der GATC-Erkennungssequenz und der Basenfehlpaarung zu verwenden, wurden 30 nM des in 3.7.3.1. beschriebenen Substrates mit 500 nM SSB für 1 min inkubiert. Das SSB setzte sich auf den aus einzelsträngiger DNA bestehenden Lücke. Da ein Tetramer SSB ca. einen Umfang von 35 bp einnimmt (Lohman & Ferrari, 1994), sollten zwei Tetramere in den 73 bp langen Einzelstrangabschnitt passen. Wichtig für die Gelanalyse war, dass eine Konzentration von SDS (0.25 % w/v) eingehalten wird. Bei zu hoher Konzentration an SDS wurde der Komplex aus DNA und SSB nicht mehr im Gel beobachtet. Optimal war die Konzentration bei Zugabe von 1.2  $\mu$ l AAP zu 10  $\mu$ l Spaltprodukt.

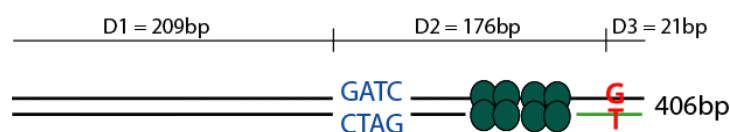
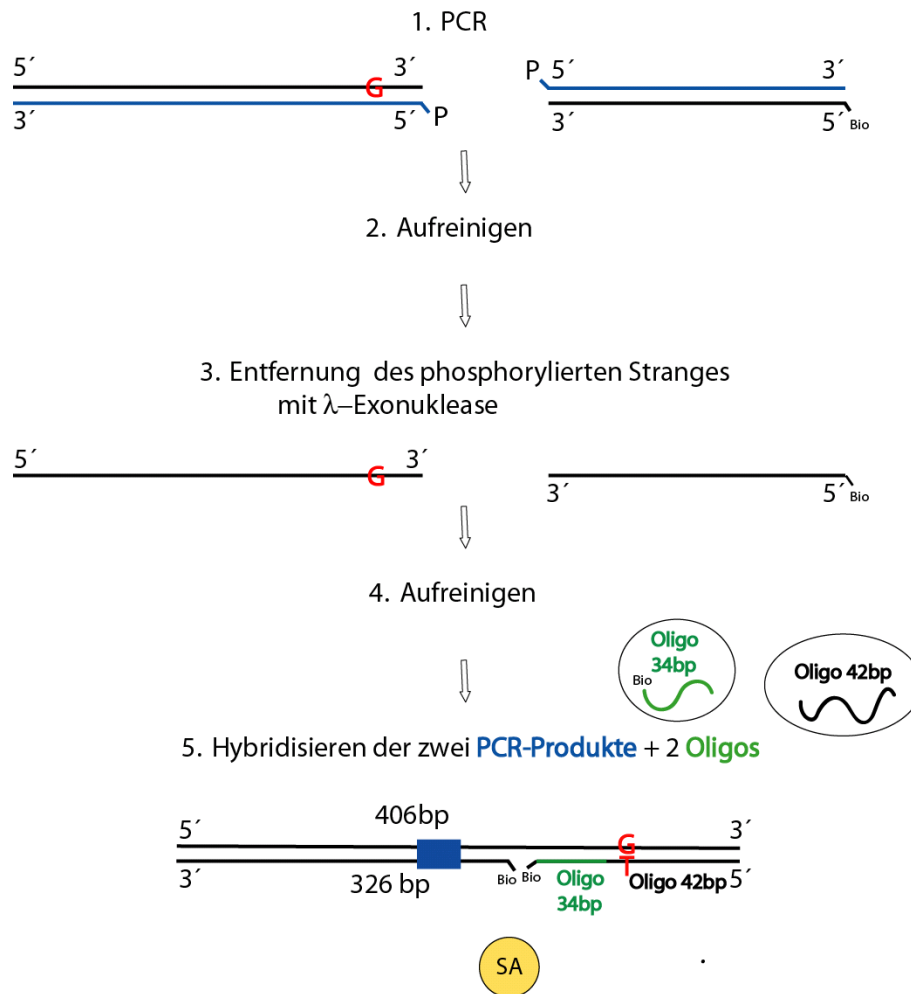


Abb. 2-5: *Mismatch*-Substrat mit einer Lücke, gefüllt mit zwei Tetrameren SSB (grün)

Lücke = 73 bp.



### 2.5.6.2. Erzeugung eines Substrates mit einem Streptavidin als Blockade zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz



**Abb. 2-6: Synthese des Substrates mit Blockade (Biotin-Streptavidin-Komplex) zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz**

Gesamtlänge des Substrates = 406 bp

Die Herstellung beginnt wie die Herstellung der Standard *mismatch*-Substrat mit zwei PCR-Reaktionen. Ein PCR-Produkt wurde mit *primer* BBseqB111/Back\_21-P (406 bp) und dem *template* pET-15b-XhoI durchgeführt, wobei auch hier der Back\_21-P *primer* ein Phosphat am 5'-Ende trägt. Die zweite PCR wurde mit den *primer* BBseqB111-P/BBseqA401 (291 bp) durchgeführt, der *primer* BBseqB111 trägt eine Phosphatgruppe am 5'-Ende und als *template* diente wieder das Plasmid pET-15b-XhoI. Die beiden PCR-Produkte wurden gereinigt und jeweils mit der  $\lambda$ -Exonuklease inkubiert (siehe 2.5.1). Anschließend wurden beide Einzelstränge gemischt und außerdem zu dem Gemisch das Oligodesoxyribonukleotid T-HindIII-biot in 1.2-facher Menge dazugegeben. Dieses Oligodesoxyribonukleotid ist zu den letzten 42 Basen am 3'-Ende des oberen Stranges komplementär. Das Gemisch wurde für 3 min auf 95 °C erhitzt und langsam im ausgeschalteten Heizblock abgekühlt (siehe Abbildung).

2-6). Vor dem Reinigen mit dem Promega-Kit wurde das Produkt auf einem 6 %-igen Polyacrylamidgel analysiert.

Das Oligodesoxyribonukletid trägt das Thymin (T) der G/T-Basenfehlpaarung, der Homoduplex mit einer Lücke wird demzufolge mit der gleichen Methode hergestellt, unter Verwendung eines Oligodesoxyribonukletid mit einem Cytosin (C) an der Position der Basenfehlpaarung.

### 2.5.6.3. Herstellung eines Substrates mit einem Doppelstrangbruch und einem Streptavidinmolekül als Blockade

Für die Herstellung wurden zwei nach dem in Abschnitt 2.5.1. beschriebenen Verfahren hergestellte lineare DNA Substrate verwendet. Die Substrate waren jeweils an einem DNA-Ende am 5'-Strang biotinyliert; das Biotin wurde mit Hilfe der *primer* eingeführt. Die Substrate konnten beliebig ausgewählt werden. Eines der beiden biotinylierten Substrate wurde mit der 1.2-fachen Menge an Streptavidin für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das zweite biotinylierte Substrat zu der Reaktion dazu gegeben und noch mal für 20 min bei RT inkubiert.

### 2.5.7. Herstellung von zirkulären *mismatch*-Substraten

#### 2.5.7.1. PCR für das zirkuläre Substrat

Als *template* für die erste PCR-Reaktion diente das Plasmid pET-15b HindIII. Durch variieren der *primer*-Sequenzen können unterschiedlich große Zirkel hergestellt werden. Abbildung 2-7 zeigt die einzelnen Schritte der Herstellung.

Ein 100 µl Ansatz umfasst folgende Reagenzien:

30 ng Plasmid (pET-15b HindIII)  
 0.4 mM dNTPs  
 3 U *Pfu*-DNA-Polymerase  
 1x *Pfu*-Puffer  
 Endvolumen 100 µl.

Der Ansatz wurde 6-fach angesetzt.

Das Temperaturprofil der PCR kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Temperaturprofil der PCR für die zirkulären Substrate**

Phase	1	2			3	4
T (°C)	94	94	55	68	68	4
t (sec)	120	50	50	60	300	∞
Zyklen	1	20			1	∞

Nach der PCR wurden die Proben aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe des Nanotrop bestimmt.

### 2.5.7.2. Inkubation mit Nb.BtsI

Nach der Bestimmung der Konzentration wurde die DNA mit der Nickase Nb.BtsI inkubiert.

Ein 100µl Ansatz umfasst folgende Reagenzien:

1µg BSA  
20 µl PCR Produkt (ca. 4000 ng)  
20 U Nb.BtsI  
10 µl NEBuffer 4 (10x)  
Endvolumen 100 µl.

Der Ansatz wurde 6-mal angesetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Einzelstränge abzutrennen muss die Probe auf 65 °C erhitzt werden und direkt im Anschluss gereinigt werden. Je 300 µl werden bei einem Aufreinigungsschritt mit 70 µl von der Säule eluiert.

### 2.5.7.3. Ligation

Im nächsten Schritt musste die offen zirkuläre Form der DNA ligiert werden, damit der Zirkel kovalent geschlossen wird.

Ein 200 µl Ansatz umfasst folgende Reagenzien:

30 µl genicktes PCR Produkt  
4 Weiss Units T4 DNA Ligase  
100 µl T4 Ligase Puffer (10x Fermentas)  
0.5 mM ATP  
Mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 1000 µl auffüllen.

Es werden vier Ansätze hergestellt. Die Ligation wird bei RT über Nacht inkubiert und anschließend gereinigt. Je 1000 µl werden über eine Säule aufgereinigt. Pro Bindungsschritt werden aber nur 250 µl der Probe auf die Säule gegeben. Anschließend wird 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Danach werden noch mal 250 µl der Probe auf die Säule gegeben und 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert usw. Wenn alle 1000 µl der Probe auf der Säule sind, wird nach dem Standard-Protokoll weitergearbeitet und im letzten Schritt mit 70 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **2.5.7.4. Inkubation mit Exonuklease I und III**

Die Exonuklease I baut einzelsträngige DNA in 3'- 5'- Richtung ab. Exonuklease III katalysiert die Entfernung einzelner Nukleotide vom 3'- Ende doppelsträngiger DNA. Lineare oder nicht ligierte offen zirkuläre DNA-Substrate werden damit entfernt.

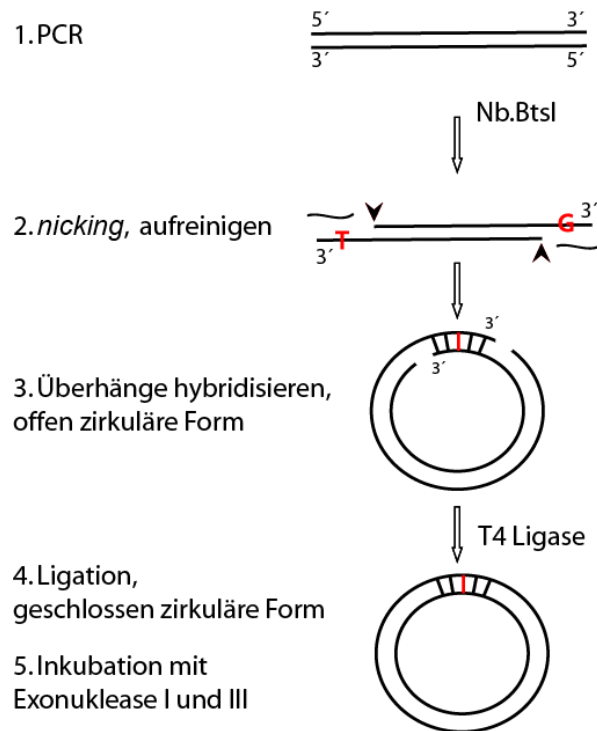
30 µl Ligationsprodukt  
10 µl Exonuklease I Puffer (10x Fermentas)  
60 U Exonuklease I  
Mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 100 µl auffüllen.

Der Ansatz wird viermal hergestellt.

Die Reaktion wird 30 min bei 37 °C inkubiert.

100 µl Exonuklease I Ansatz  
240 U Exonuklease III  
15 µl Puffer R (10x Fermentas)  
Mit H<sub>2</sub>O auf 150 µl auffüllen.

Der Ansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend aufgereinigt.



**Abb. 2-7: Schema für die Herstellung von zirkulären mismatch-Substraten**

Die Herstellung der zirkulären *mismatch*-Substrate besteht aus vier Schritten: Zuerst wird ein PCR-Reaktion durchgeführt (14 Basen der *primer*-Sequenz paaren nicht mit dem *template* und führen so eine neue Sequenz ein, die die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Nb.BtsI enthält). Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und anschließend mit Nb.BtsI genickt. Danach wird es für 20 min auf 65 °C erhitzt und direkt wieder aufgereinigt. Die Überhänge hybridisieren zur offen zirkulären Form und werden anschließend ligiert.

## 2.6. MutH-Endonuklease-Aktivierungsassay

MutH (2.5  $\mu\text{M}$ ) und MutL (5  $\mu\text{M}$ ) wurden für 20 min auf Eis mit ATP (5 mM) in 1x Puffer gelb und 150 mM KCl vorinkubiert. Durch Zugabe von MutS und der Substrat-DNA wird die Reaktion 5-fach verdünnt und gleichzeitig gestartet. MutH spaltet die Substrate an der nicht methylierten GATC-Erkennungssequenz. Alle in dieser Arbeit verwendeten Substrate enthalten nur eine GATC-Erkennungssequenz und anhand der Menge der zwei Spaltprodukte kann die Spaltaktivität des MutHLS-Systems ermittelt werden.

Im Folgenden werden die Bedingungen für die Aktivitätstests beschrieben, sie wurden für alle Aktivitätstests gleich gehalten. Bedingungen während der Aktivitätstests:

1 $\mu\text{M}$	MutL
0.5 $\mu\text{M}$	MutH
0.5 $\mu\text{M}$	MutS
10 nM	DNA
150 mM	KCl
1 mM	ATP
1x	Puffer gelb

Nach 1, 2, 5, 10, 20 und 60 min wurden Aliquots (10  $\mu$ l) entnommen und die Reaktion mit 2.5  $\mu$ l 5x AAP abgestoppt. Die Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch untersucht. Jede Kinetik wurde mindestens dreimal wiederholt und mit dem Programm TotalLab (Nonlinear Dynamics) ausgewertet. Die Geschwindigkeitskonstante ( $k$ ) wurde mit der folgenden Exponentialfunktion ermittelt:

$$\%P = A \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + BL$$

$$\%S = A \cdot e^{-k \cdot t} + BL$$

$\%P$  = % Produkt,  $\%S$  = % Substrat,  $BL$  = Basislinie,  $A$  = Amplitude,  $k$  = Geschwindigkeitskonstante

## 2.7. Bindungsexperimente (EMSA)

Die MutS-DNA-Bindungsexperimente wurden mit verschiedenen Konzentration von MutS, 45 nM 484 bp G/T *mismatch*-DNA, oder 506 bp zirkulärer *mismatch*-DNA, wenn mit Nukleotid dann wurde 1mM ADP/ATP eingesetzt, 50 mM KCl, in 1x Bindungspuffer für 10 min bei 4 °C durchgeführt. Gestoppt wurden 10  $\mu$ l der Reaktion in 4  $\mu$ l 10x DNA-Bindungs-Auftragspuffer (50 % Glycerin, 20 mM EDTA, 0.01% (w/v) Bromphenolblau). Die Ergebnisse wurde auf 2 %-igen Agarosegelen (1x TPE, bei 4 °C) analysiert.

## 2.8. Thiol-*crosslink*-Experimente

Die verwendeten Methanthiosulfonat (MTS) *crosslinker* stammen von der Firma *Toronto Research Chemicals*, sie wurden in DMSO gelöst und bei -20 C° aufbewahrt. Das folgende Schema (Abbildung 2-8) zeigt die MTS-Reaktion.

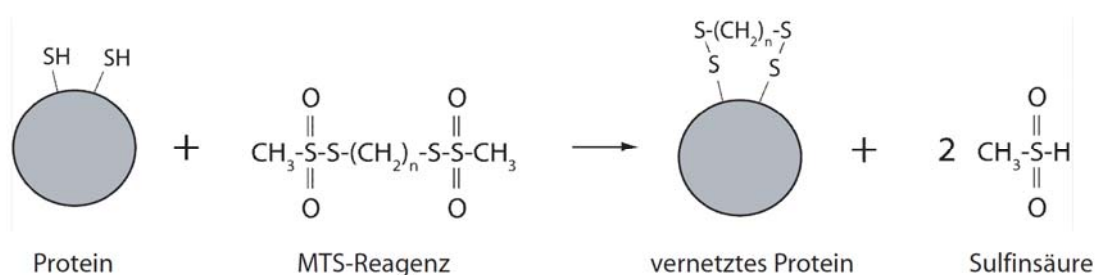

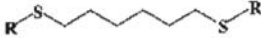

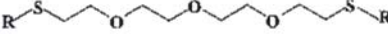

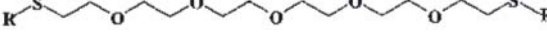


Abb. 2-8: Schema für die MTS-Reaktion (aus der Dissertation von Manelyte, 2006).

Die *crosslink*-Reaktionen wurden mit 50 mM KCl in 1x Puffer gelb für 2 min bei 4 °C durchgeführt. Die Protein und auch die DNA Konzentrationen wurden variiert siehe jeweilige Abbildung. Die Konzentration des *crosslinkers* gegenüber der Protein Konzentration war immer 5:1. In der folgenden Abbildung sind die verschiedenen langen *crosslinker* aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Struktur	Länge
M4M		7.8
M6M		10.4
M8M		13
M11M		16.9
M14M		20.8
M17M		24.7

$R = \text{---S(=O)}_2\text{---CH}_3$

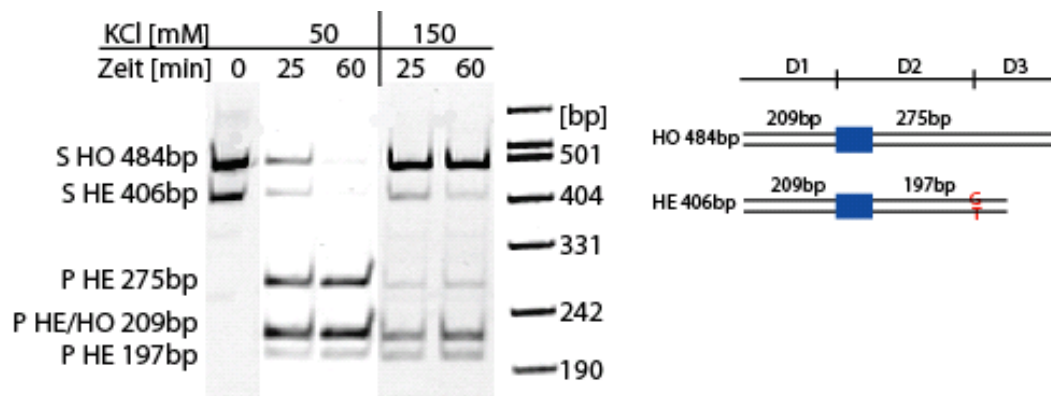
Abb. 2-9: Struktur der verschiedenen *crosslinker* (Loo & Clarke, 2001)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Die *mismatch*-spezifische MutH-Aktivierungsreaktion ist salzabhängig

Bei niedrigen KCl-Konzentrationen ( $< 100$  mM) wird MutH durch MutL auch in Abwesenheit von MutS, und damit auch unabhängig von der Basenfehlpaarung aktiviert (Ban, 1998). Um sicherzustellen, dass bei den hier verwendeten Substraten die Spaltung *mismatch*- und MutS-abhängig ist, wurde in den folgenden Versuchen MutH-induzierte Homoduplex- und Heteroduplex-Spaltung bei verschiedenen KCl-Konzentration getestet und verglichen.

Dazu wurden Reaktionen durchgeführt, in denen sowohl ein Substrat mit Basenfehlpaarung (406 bp) als auch ein Homoduplex-Substrat (484 bp) eingesetzt und KCl-Konzentrationen von 50 mM und 150 mM verwendet wurden.



**Abb. 3-1: Spaltaktivität einer Homoduplex-DNA (HO) mit einer Länge von 484 bp und einer Heteroduplex-DNA (HE) mit einer Länge von 406 bp**

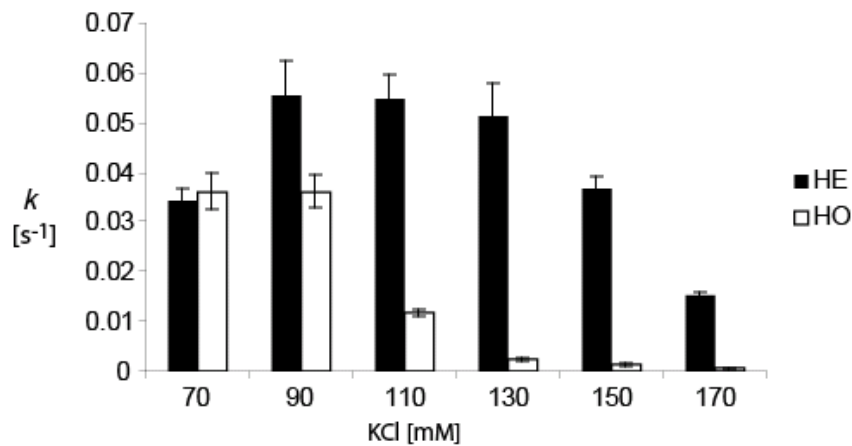
Die Homoduplex-DNA liefert ein Spaltprodukt mit einer Länge von 275 bp und ein zweites mit einer Länge von 209 bp. Aus der Heteroduplex-DNA entstehen nach der Spaltung die Produkte mit einer Länge von 209 bp und 197 bp. Die Reaktion wurde in 1x Puffer gelb mit MutS 500 nM, MutL 1  $\mu$ M, MutH 500 nM, jeweils 10 nM DNA, ATP 1 mM und entweder 50 mM oder 150 mM KCl durchgeführt. Gestoppt wurden 10  $\mu$ l der Reaktion mit 2  $\mu$ l 5x AAP.

S HO, Substrat Homoduplex; S HE, Substrat Heteroduplex; P HE, Produkt Heteroduplex; P HO, Produkt Homoduplex. Polyacrylamidgel (6 %) mit Ethidiumbromid gefärbt

Die Kinetik mit einer KCl-Konzentration von 50 mM zeigt, dass beide Substrate schnell gespalten werden. Bei 150 mM KCl ist dagegen ein deutlicher Unterschied zu sehen: Das Homoduplex-Substrat ist auch nach 60 min kaum gespalten worden, während das Heteroduplex-Substrat zu  $> 90$  % gespalten wurde.

In Abbildung 3-2 sind die Geschwindigkeitskonstanten von Kinetiken mit Homoduplex- oder Heteroduplex-DNA bei KCl-Konzentrationen von 70 mM bis 170 mM dargestellt.



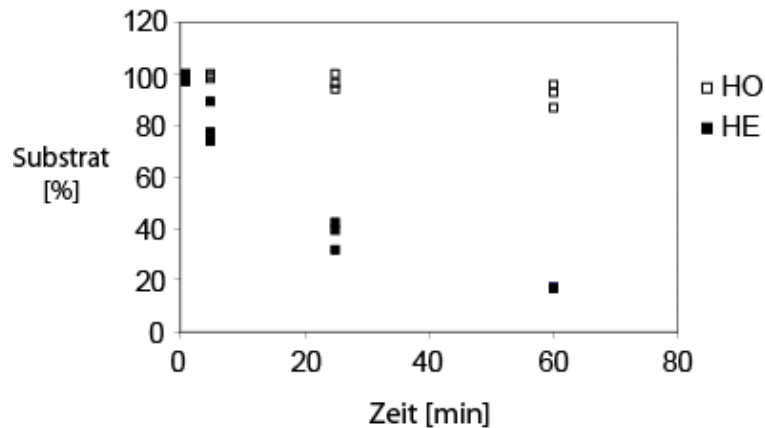


**Abb. 3-2: Spaltaktivität Homoduplex- (weiß) und Heteroduplex-DNA (schwarz) mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen.**

Bei 70 mM KCl wurde der Homoduplex mit einer  $k$  (Geschwindigkeitskonstante) =  $0.036 \text{ s}^{-1}$  und der Heteroduplex mit  $k = 0.034 \text{ s}^{-1}$  gespalten, bei 90 mM KCl wurde der HO mit  $k = 0.036 \text{ s}^{-1}$  und der HE mit  $k = 0.055 \text{ s}^{-1}$  gespalten, bei 110 mM KCl wurde der HO mit  $k = 0.011 \text{ s}^{-1}$  und der HE mit  $k = 0.054 \text{ s}^{-1}$  gespalten, bei 130 mM KCl wurde der HO mit  $k = 0.002 \text{ s}^{-1}$  und der HE mit  $k = 0.051 \text{ s}^{-1}$  gespalten, bei 150 mM KCl wurde der HO mit  $k = 0.001 \text{ s}^{-1}$  und der HE mit  $k = 0.037 \text{ s}^{-1}$  gespalten und bei 170 mM KCl wurde der HO mit  $0 \text{ s}^{-1}$  und HE noch mit  $0.015 \text{ s}^{-1}$  gespalten.

HE, Heteroduplex; HO, Homoduplex;

Der Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten nimmt mit steigenden KCl-Konzentrationen stetig zu; das Homoduplex-Substrat wird ab einer KCl-Konzentration von 110 mM nur noch mit  $k = 0.011 \text{ s}^{-1}$  gespalten, während die Spaltung an einem Heteroduplex-Substrat noch mit  $k = 0.054 \text{ s}^{-1}$  erfolgt. Das Diagramm zeigt, dass die Spezifität des MuthLS-Systems für basenfehlpaarungs-induzierte Spaltung ab 130 mM KCl, oder mehr, immer größer wird. Mit 150 mM KCl in der Reaktion ist die Spaltung des MuthLS-Systems von der Basenfehlpaarung abhängig. Ohne eine Basenfehlpaarung wird die Spaltung an der GATC-Erkennungssequenz nicht aktiviert (Abbildung 3-3).

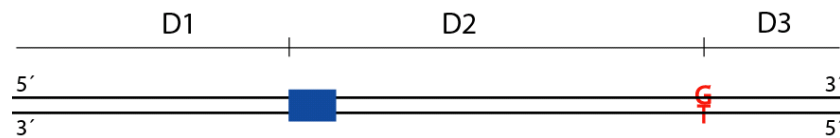


**Abb. 3-3: MutHLS-Spaltkinetiken bei 150 mM KCl**

Werte von jeweils drei verschiedenen Spaltungen; Weiß, Homoduplex-DNA (HO); schwarz, Heteroduplex-DNA (HE)

### **3.2. Kurze DNA-Substrate mit zentraler GATC-Erkennungssequenz sind für den Mechanismus des MMR gut geeignet**

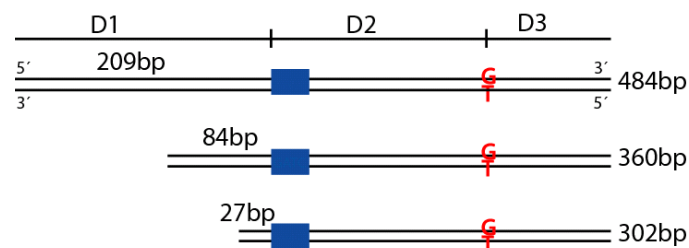
Um für die Durchführung der Spaltexperimente ein optimales, möglichst kurzes DNA-Substrat zu haben, in einer zuvor durchgeführten Arbeit wurde getestet welchen Einfluss die Länge der DNA von der GATC-Erkennungssequenz bis zum Ende (siehe Abbildung 3-4, D1) auf die Spaltreaktion von MutHLS hat. Lineare Heteroduplex-Substrate weisen im Gegensatz zu zirkulären Heteroduplex-Substraten zwei Enden auf. Bereits 1996 wurde gezeigt, dass der Abstand einer GATC-Erkennungssequenz zum Rand eines PCR-Produktes einen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Spaltung von Heteroduplex-Substraten hat (Smith & Modrich, 1996). Bei Abständen unter 150 bp zum DNA-Ende sank die beobachtete Spaltaktivität stetig. Zum gleichen Schluss kam 2001 auch die Gruppe von Krontiris, die, bei Abständen von 30 und weniger Basenpaaren zum DNA-Ende, keine DNA-Spaltung durch MutH detektieren konnte (Beaulieu *et al.*, 2001). Die linearen *mismatch*-DNA-Substrate können in drei Abschnitte aufgeteilt werden: D1 beschreibt den Abstand von der GATC-Erkennungssequenz zum 5'-bzw. 3'-Ende des oberen bzw. unteren DNA-Stranges; D2 den Abstand zwischen GATC-Erkennungssequenz und Basenfehlpaarung und D3 den Abstand der G/T-Fehlpaarung zum 3'-bzw. 5'-Ende des oberen bzw. des unteren DNA-Stranges von der Basenfehlpaarung zum Ende (siehe Abbildung 3-4).



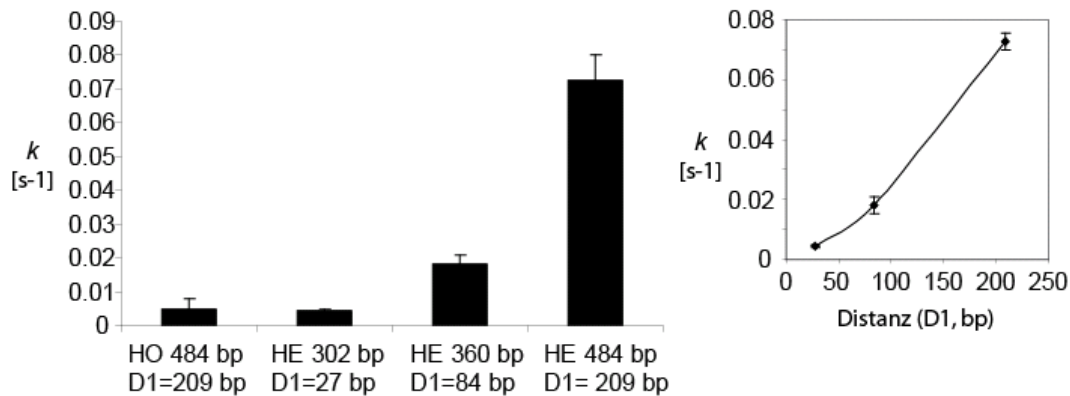
**Abb. 3-4: Mismatch-Substrat mit Kennzeichnung der Abschnitte D1, D2 und D3;**

Blau, GATC-Erkennungssequenz; rot, Basenfehlpaarung

Für den Abstand D1 wurden in zuvor durchgeführten Arbeiten drei verschiedene Abstände gewählt: 27 bp, 84 bp und 209 bp. Die Ergebnisse sind in dem folgenden Diagramm (Abbildung 3-6) dargestellt. Um sicherzustellen, dass die Spaltung nur auf der spezifischen, während der Substrat-Synthese eingeführten G/T-Basenfehlpaarung beruht, wurden immer Kontroll-Homoduplex-Substrate nach dem gleichen Verfahren hergestellt. Die Spaltung von Homoduplex-Substraten war nie größer als 30 %, während ein G/T-Heteroduplex-Substrat in der Regel zu > 90 % gespalten wurde.



**Abb. 3-5: Modell für die drei mismatch-Substrate mit verschiedenen Längen des Abschnitts D1**



**Abb. 3-6: Spaltaktivität der unterschiedlichen mismatch-Substrate**

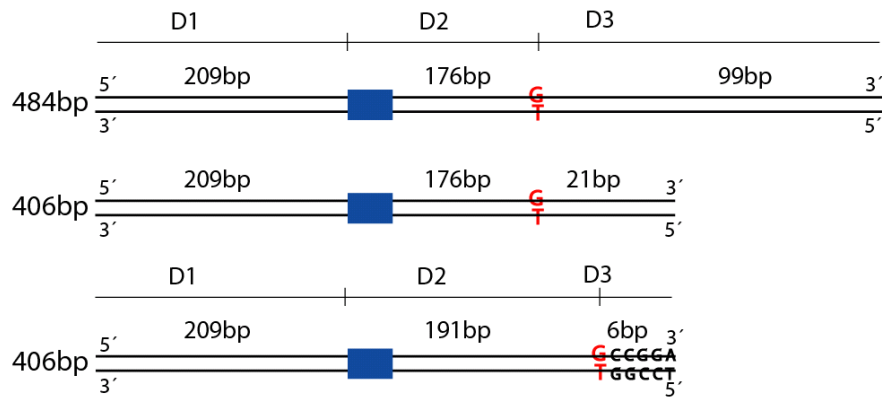
Der Heteroduplex mit einer Gesamtlänge von 484 bp ( $D1 = 209$  bp) wurde mit  $k$  (Geschwindigkeitskonstante) =  $0.073 \text{ s}^{-1}$  gespalten. Der Heteroduplex mit einer Gesamtlänge von 360 bp ( $D1 = 84$  bp), wurde mit  $k = 0.018 \text{ s}^{-1}$  gespalten, der mit einer Gesamtlänge von 302 bp ( $D1 = 27$  bp) wurde mit  $k = 0.004 \text{ s}^{-1}$  gespalten und der Homoduplex mit einer Gesamtlänge von 484 bp mit  $k = 0.005 \text{ s}^{-1}$ . HE, Heteroduplex; HO, Homoduplex.

Die in Abbildung 3-6 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass der Abstand der GATC-Erkennungssequenz zum Ende der DNA einen großen Einfluss auf die Aktivität des MuthLS-Systems hat. Bei einem Abstand von 27 bp sinkt die Spaltgeschwindigkeit auf das Niveau der Geschwindigkeit mit einem 484 bp langen Homoduplex-Substrat. Der Abstand von der GATC-Erkennungssequenz zum DNA-Ende darf demnach nicht viel kürzer als 209 bp sein.

### 3.2.1. Verkürzen des Abstands der Basenfehlpaarung zum DNA-Ende (D3)

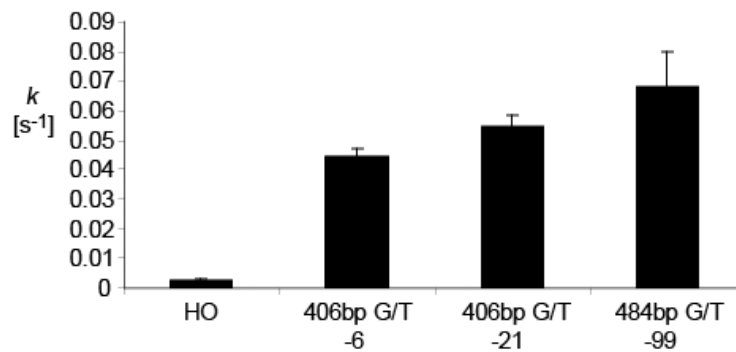
Welchen Einfluss der Abstand der Basenfehlpaarung zum DNA-Ende auf die Spaltaktivität von MuthLS hat, ist weitgehend unbekannt. Frühere Arbeiten zeigen, dass Abstände von 21 bp und 99 bp nur einen geringen Einfluss auf die Effizienz der MuthLS-Reaktion haben {Jung, 2005}. Ein Substrat mit einer Länge  $D3$  von 99 bp wurde zu  $> 90 \%$  gespalten, wenn  $D3$  auf eine Länge von 21 bp verkürzt wird, sinkt die Aktivität auf ca. 80 %.

Basierend auf der Ko-Kristallstruktur von MutS mit Heteroduplex-DNA wurde ein Substrat generiert, bei dem die G/T-Fehlpaarung nur 6 bp vom DNA-Ende entfernt ist. In diesem Substrat kann MutS noch alle Kontakte zur DNA ausbilden. In Abbildung 3-7 sind die Längenverhältnisse der drei verschiedenen DNA-Substrate dargestellt.



**Abb. 3-7: Modelle der drei *mismatch*-Substrate mit den unterschiedlich langen Abständen D3, 99 bp, 21 bp und 6 bp**

Abbildung 3-8 zeigt die Ergebnisse der MutHLS-Aktivitätstest im Vergleich mit den zwei anderen Substraten (Abstand D3: 21 bp bzw. 99 bp).



**Abb. 3-8: Spaltaktivität der unterschiedlichen *mismatch*- und Homoduplex-Substrate**

Der Abschnitt D3 des Substrates 406 bp G/T-6 ist 6 bp lang, das Substrat wurde mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k = 0.044 s^{-1}$  gespalten, der Abschnitt D3 des Substrates 406 bp G/T-21 hat eine Länge von 21 bp und das Substrat wurde mit  $k = 0.054 s^{-1}$  gespalten. In dem Substrat 484 G/T -99 hat der Abschnitt eine Länge von 99 bp, die DNA wurde mit  $k = 0.068 s^{-1}$  gespalten. Der Homoduplex wurde mit  $k = 0.002 s^{-1}$  gespalten.

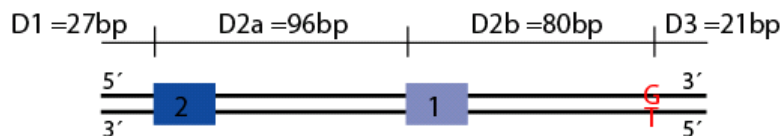
Auch ein weiteres Verkürzen des Abstands D3 auf 6 bp stört das MMR in seiner Aktivierung nur gering. Verglichen mit den Abständen D3 von 99 bp und 21 bp, sinkt die Spaltaktivität bei einem Abstand D3 von 6 bp nur gering auf 65 %.

Ein Abstand von 6 bp nach der Basenfehlpaarung bis zum Ende der DNA ist ausreichend zur Aktivierung der Spaltaktivität von MutH.

### 3.2.2. Minimalsubstrate für die MutHLS-Reaktion

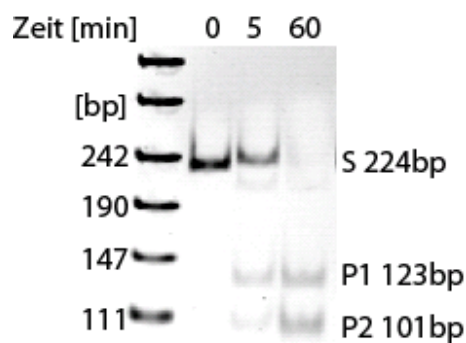
Das 302 bp lange Substrat, beschrieben in 3.2., mit einem Abstand der GATC-Erkennungssequenz zum DNA-Ende (D1) von 27 bp wurde sehr viel schlechter gespalten als

ein 484 bp langes Substrat mit einer Länge des Abstands D1 von 209 bp. Der Abstand der GATC-Erkennungssequenz zum Ende eines Substrates scheint daher entscheidend für die Aktivität des MutHLS-Systems zu sein. Im Folgenden sollte ein Substrat hergestellt werden, das kürzer als 302 bp war, jedoch eine ausreichende Aktivierung des MMR gewährleistet. In die Sequenz (siehe Abbildung 3-9) wurde eine zusätzliche GATC-Erkennungssequenz (1) eingeführt, um so die Spaltung an den beiden Erkennungssequenzen vergleichen zu können.



**Abb. 3-9: Mismatch-Substrat mit einer Gesamtlänge von 224 bp**

Die Position der GATC-Erkennungssequenz (1) wurde zur Mitte der DNA hin verschoben, sodass der Abstand zum Ende ( $D1 = 123$  bp; Abbildung 3-9  $D1+D2a$ ) ausreichend für eine gute Spaltaktivität war. Die Position der Basenfehlpaarung zum Ende des Substrates (D3) betrug 21 bp. Das Substrat mit einer Gesamtlänge von 224 bp wurde in einem MutHLS-Aktivitätstest eingesetzt (Abbildung 3-10).



**Abb. 3-10: MutHLS-Spaltkinetik mit einem 224 bp langen mismatch-Substrat**

Die Reaktion wurde mit 500 nM MutS, 500 nM MutL, 500 nM MutH, 1 mM ATP und 150 mM KCl in 1x Puffer gelb bei 37 °C durchgeführt. 10  $\mu$ l der Probe wurden mit 2  $\mu$ l 5x AAP zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt. Polyacrylamidgel (6 %) mit Ethidiumbromid gefärbt;

S, Substrat; P1, Produkt 1; P2, Produkt 2.

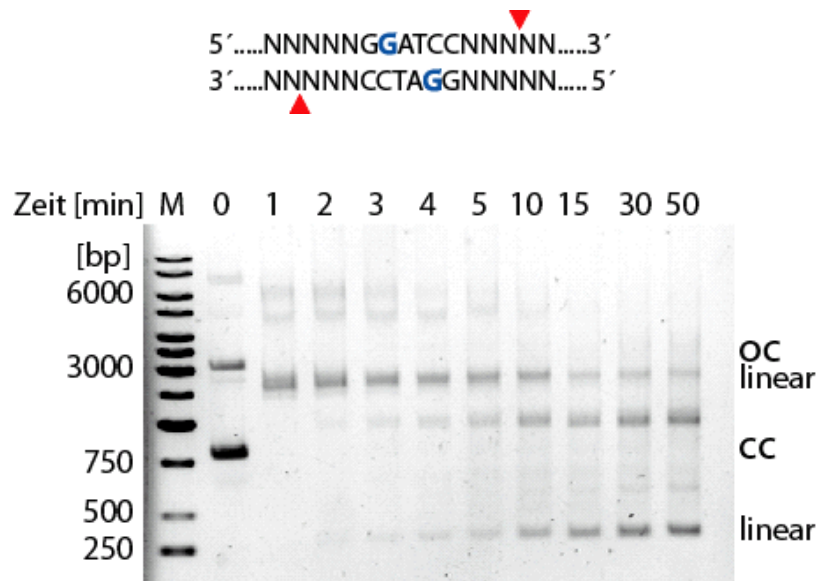
Im Gegensatz zum 302 bp langen Substrat mit einer endständigen GATC-Erkennungssequenz wurde dieses kürzere Substrat sehr schnell gespalten. Eine Gesamtlänge von 224 bp ist also ausreichend, um die Spaltaktivität des MutHLS-Systems zu testen. Der Abstand der

Basenfehlpaarung zum Ende der DNA (D3) könnte auch hier noch verkürzt werden, um die Gesamtlänge weiter zu minimieren, wie die Ergebnisse aus 3.2.1. zeigen.

### 3.3. Schnellere Kinetiken durch Einzelstrangspaltung

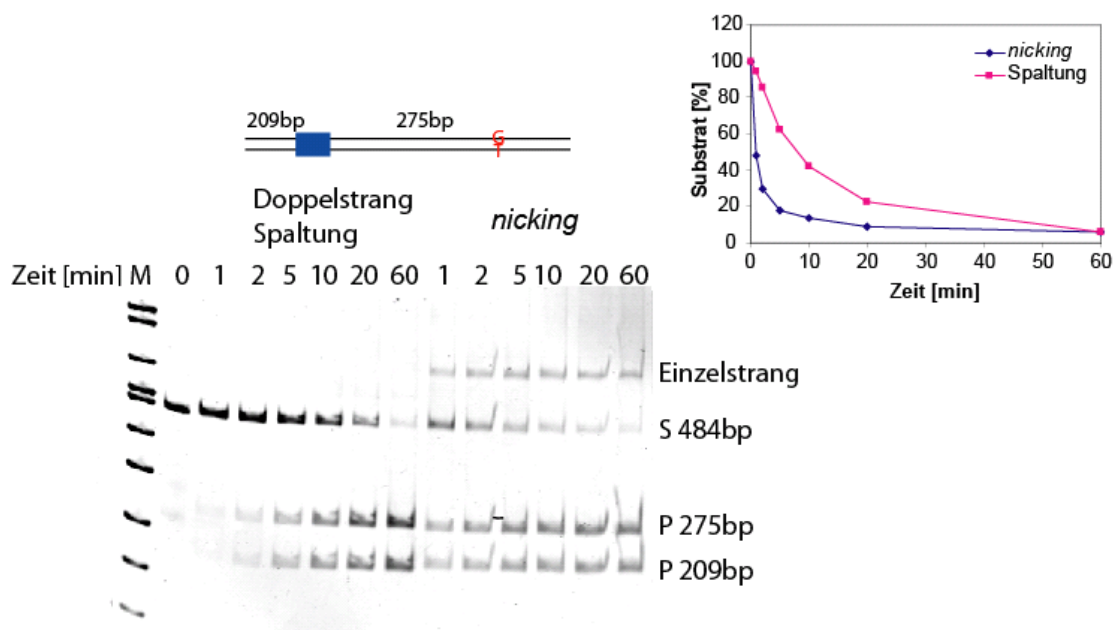
Analysiert man die Spaltung von MutH an linearer DNA, wie zuvor in 3.1. – 3.2., dann werden die Spaltprodukte nur sichtbar, wenn die Endonuklease durch sequentielles Spalten der beiden Stränge an einer GATC-Erkennungssequenz einen Doppelstrangbruch in der DNA einführt. Es ist bekannt, dass der erste Strangbruch deutlich schneller erfolgt als die Spaltung des zweiten Stranges (Thomas, Dissertation, 2006). In *E. coli* ist die DNA hemimethyliert und die MutH-Endonuklease spaltet nur den unmethylierten Strang, danach kann die Helikase den Doppelstrang entwinden. Wie kann ein Einzelstrangbruch an der GATC-Erkennungssequenz auf einfache Weise im nativen Gel sichtbar gemacht werden? Zu einem späteren Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchungen war es möglich, zirkuläre *mismatch*-Substrate herzustellen (siehe 3.4.), bei denen die konvalent geschlossene, zirkuläre Form (CC) von der in einem Strang gespaltenen, offenen Form (OC) im Agarosegel unterschieden werden kann. Bei linearen Substraten wurde folgender „Trick“ angewandt: Die Nickase Nt.AlwI spaltet einen Strang der DNA vier Basen in 3'-Richtung nach dem Cytosin in GGATC-Sequenzen. In palindromen GGATCC-Sequenzen entstehen so Substrate mit jeweils einem Einzelstrangbruch oben und unten, im Abstand von 12 bp. Wenn MutH einen zweiten Einzelstrangbruch nach dem Guanin der GATC-Erkennungssequenz setzt, entsteht ein Doppelstrangbruch.

Zuerst wurde die Aktivität der Nickase Nt.AlwI an einer 2665 bp langen zirkulären DNA (pUC8<sup>dam-</sup>) getestet (siehe Abbildung 3-11). Anschließend wurde ein 484 bp langes *mismatch*-DNA-Substrat mit Nt.AlwI vorinkubiert und danach mit MutH, -L, -S behandelt. In Abbildung 3-12 sind die Spaltkinetiken eines normalen DNA-Substrates und die eines, mit Nt.AlwI vorbehandelten, Substrates nebeneinander aufgetragen.



**Abb. 3-11: Einzelstrangspaltung des Plasmids pUC8<sup>dam-</sup> mit Nt.AlwI**

Die Reaktion wurde in 1x Puffer NEBuffer 2 bei 37 °C mit 11.2 ng/μl pUC8<sup>dam-</sup>-Plasmid DNA und 2.8 *units* Nt.AlwI durchgeführt. Agarosegel (0.8 %) mit Ethidiumbromid gefärbt  
M, Marker 1 kB Ladder Fermentas; OC, offen zirkuläre Form; CC, geschlossen zirkuläre Form



**Abb. 3-12: Spaltung eines 484 bp Heteroduplex-DNA-Substrates (S) und Einzelstrangspaltung eines, mit Nt.AlwI vorbehandelten, 484 bp Heteroduplex-DNA-Substrates**

Die Spaltprodukte (P) sind 275 bp und 209 bp lang, nach der *nicking*-Reaktion entsteht noch eine zusätzliche, langsamer laufende Bande mit einzelsträngiger 484 bp langer DNA. Die Reaktion wurde in 1x Puffer gelb mit 150 mM KCl, 500 nM MutS, 1 μM MutL, 500 nM MutH, 1 mM ATP durchgeführt.

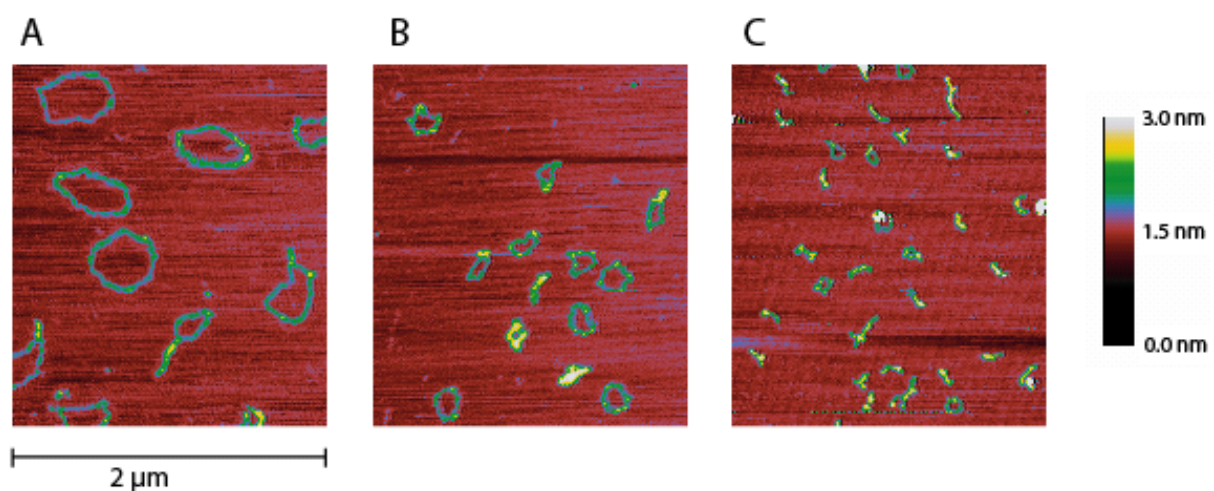
Die vorgespaltene DNA wird mit einer Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) von  $0.61 \text{ s}^{-1}$  in die beiden linearen Produkte überführt, die unbehandelte DNA dagegen wird mit einer sehr viel



langsameren Geschwindigkeit  $k = 0.08 \text{ s}^{-1}$  in die Produkte überführt. Die *nicking*-Reaktion ist fast achtmal schneller als die Spaltreaktion.

### 3.4. Kurze, zirkuläre *mismatch*-Substrate

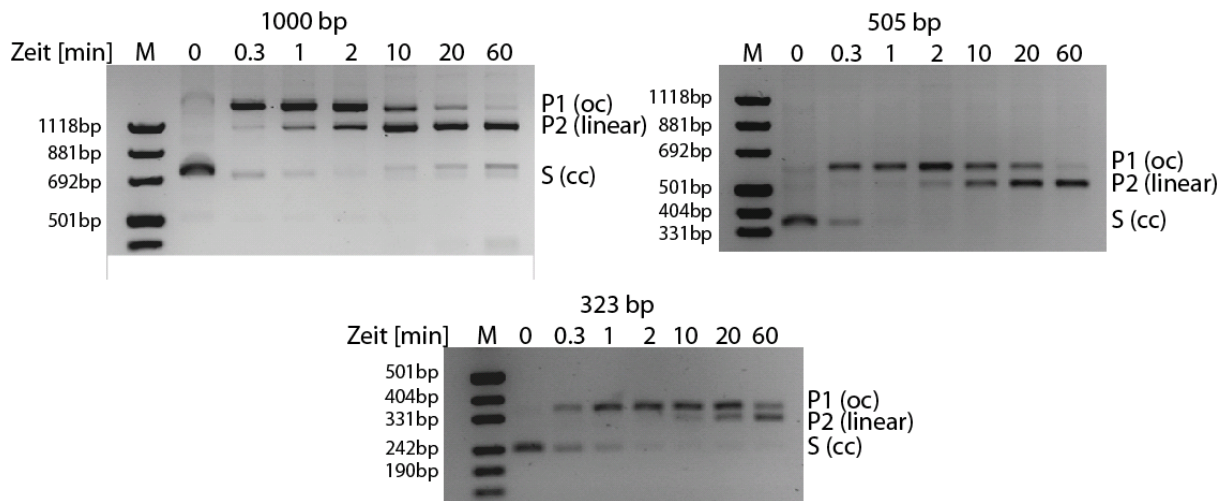
Der größte Teil dieser Arbeit wurde mit linearen *mismatch*-Substraten durchgeführt. Diese Substrate wurden benutzt, um die MutH-induzierte Spaltung an der GATC-Erkennungssequenz zu untersuchen und damit Informationen über den Mechanismus der Kopplung von *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung zu erhalten. Bisher wurden nur lineare Substrate verwendet, weil kein geeignetes Verfahren zur Herstellung zirkulärer, kurzer Substrate mit einer definierten Basenfehlpaarung zur Verfügung stand. Lineare DNA kann allerdings nur bedingt die Situation einer Zelle aus *E. coli* imitieren. Der wichtigste Punkt dabei sind die DNA-Enden. MutS zeigt Bindung an DNA-Enden und die Abstände der Basenfehlpaarung oder der GATC-Erkennungssequenz zum DNA-Ende haben Einfluss auf die MutS und MutL aktivierte Spaltaktivität von MutH (siehe 3.2.). Deshalb wurde eine neue Methode entwickelt, mit der es möglich ist, kleine, zirkuläre *mismatch*-Substrate herzustellen. Die Methode beruht auf einer PCR-Reaktion und wird in 2.5.7. eingehender beschrieben. Zusammen mit einem Masterstudenten, Yu Xiao, konnten diese Substrate in verschiedenen Längen (1000 bp, 505 bp, 323 bp) hergestellt werden. Um die Qualität und Homogenität der *mismatch*-Substrate zu überprüfen, wurden Rasterkraftmikroskopieaufnahmen von den jeweiligen Zirkeln gemacht (die Aufnahmen konnten in Rotterdam im *Erasmus Medical Center* zusammen mit Joyce Lebbink durchgeführt werden).



**Abb. 3-13: Rasterkraftmikroskopbilder von verschiedenen langen zirkulären DNAs**

A, 1000 bp lange DNA; B, 505 bp lange DNA; C, 323 bp lange DNA; Puffer: 10 mM Hepes (pH 7.5) und 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>

Die Qualität und die Reinheit der hergestellten zirkulären DNAs war sehr gut, deshalb konnten daraufhin alle Substrate in Kinetiken auf ihre Spaltbarkeit durch das MutHLS-System getestet werden.



**Abb. 3-14: MutHLS-Spaltkinetiken mit den verschiedenen zirkulären DNA-Substraten**

Die Reaktion wurde mit 500 nM MutS, 500 nM MutL, 500 nM MutH, 20 nM DNA, 150 mM KCl, 1 mM ATP in 1x Puffer gelb bei 37 °C durchgeführt. 10 µl der Proben wurden nach 30 sec, 1, 2, 10, 20 und 60 min mit 2 µl 5x AAP gestoppt. Agarosegel (2 %) 1x TPE mit Ethidiumbromid vorgefärbt

S (cc), geschlossen zirkuläres DNA Substrat; P1 (oc), Produkt nach Spaltung eines DNA-Strangs durch MutH; P2 (linear), Produkt nach der Spaltung von MutH; M, Marker pUC8 Mix Marker.

Alle drei verschieden langen zirkulären DNA-Substrate sind spaltbar, auch ein nur 323 bp langer Zirkel wird von dem MutHLS-System gespalten. Homoduplex-Kontrollen (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass die Spaltung *mismatch*-spezifisch ist.

### 3.5. MutS-Dimere sind ausreichend für die Aktivierung von MutH

In Lösung befindet sich MutS in einem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht. Werden die letzten 53 Aminosäuren des C-Terminus entfernt, ändert sich das Gleichgewicht in ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht (Bjornson *et al.*, 2003; Lamers *et al.*, 2004). Die Funktion des MutS-Tetramers *in vivo* wird noch diskutiert (Iyer *et al.*, 2006), allerdings ist ein Dimer für die DNA-*mismatch*-Reparatur ausreichend, während für die Funktion von MutS in der Anti-Rekombination ein Tetramer benötigt wird (Calmann *et al.*, 2005b; Calmann *et al.*, 2005a; Nowosielska *et al.*, 2008). Schon eine Punktmutation an der Position 835 im C-Terminus (53 Aminosäuren) von MutS verhindert, dass das Protein Tetramere bilden kann (Manelyte *et al.*, 2006; Mendillo *et al.*, 2007). Die Dimer-Variante von MutS hat ähnliche Bindungsaffinitäten zu Heteroduplex-DNA wie der tetramerbildende MutS-Wildtyp. Im folgenden Abschnitt wurde die Aktivität der cysteinfreien MutS-Variante (MutS<sup>CF</sup>) mit der cysteinfreien MutS-Variante D835R (MutS<sup>CF/D835R</sup>) in der *mismatch*-abhängigen MutH-Aktivierung verglichen.

#### 3.5.1. Mismatch-abhängige MutH-Aktivierung mit verschiedenen langen DNA-Substraten

In den ersten Aktivitätstest mit einer 484 bp langen Heteroduplex-DNA unter den Standardbedingungen, allerdings mit 125 mM KCl (siehe 2.6.), zeigte die Dimer-Variante von MutS nahezu die gleiche Aktivität wie die Tetramer-Variante. Wenn die Tetramerisierung von MutS eine wichtige Rolle während der *mismatch*-Reparatur spielt, dann wäre es möglich, dass sich ein Unterschied der beiden Varianten erst dann zeigt, wenn die Parameter des DNA-Substrates variiert werden. Im folgenden Abschnitt sind Experimente beschrieben, in denen zwei verschieden lange DNA-Substrate eingesetzt wurden. Der Abstand (D1) von der GATC-Erkennungssequenz zum Ende der DNA wurde variiert und betrug für das 484 bp lange Substrat 209 bp und für das 360 bp lange Substrat 84 bp.

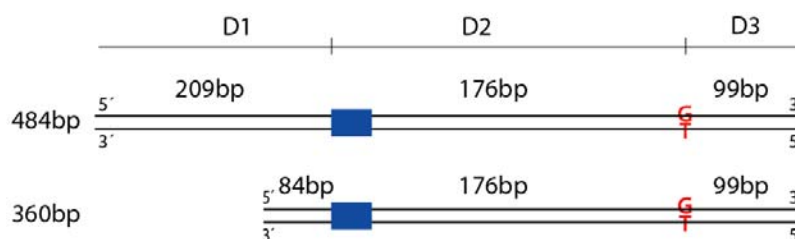
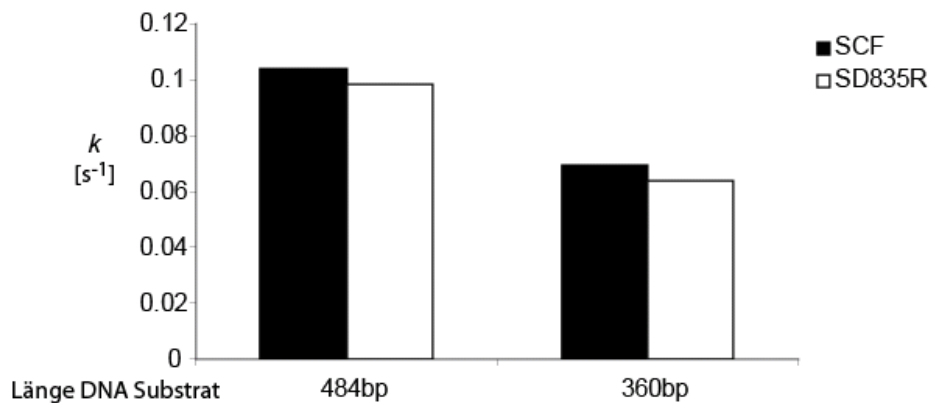


Abb. 3-15: Modell der beiden DNA-Substrate 484 bp und 360 bp, mit Kennzeichnung der Abschnitte D1, D2 und D3

Blau, Position der GATC-Erkennungssequenz; rot, Basenfehlpaarung

Die Geschwindigkeitskonstante der Spaltaktivität wurde im *mismatch*-abhängigen MutH-Aktivierungsassay ermittelt. Das Balkendiagramm in Abbildung 3-16 zeigt die verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich.



**Abb. 3-16: Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) der Spaltkinetiken für ein 484 bp und ein 360 bp langes Substrat**

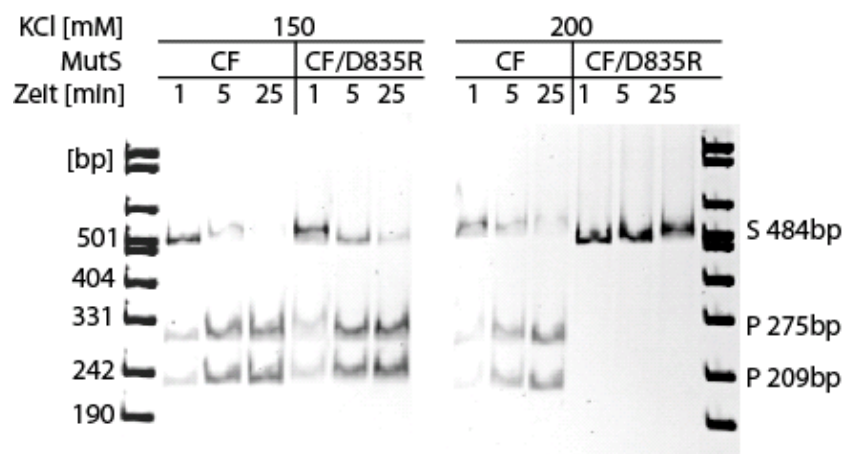
Schwarz, Geschwindigkeitskonstanten für das MutS<sup>CF</sup>; weiß, Geschwindigkeitskonstanten für die Dimer-Variante MutS<sup>D835R</sup>

Mit der 484 bp langen DNA wurde für MutS<sup>CF</sup> die Geschwindigkeitskonstante  $k = 0.1 \text{ s}^{-1}$  und für die MutS<sup>CF/D835R</sup>  $k = 0.098 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Das kürzere, 360 bp lange Substrat wird von der MutS<sup>CF</sup>-Variante mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k = 0.069 \text{ s}^{-1}$  und von MutS<sup>CF/D835R</sup> mit  $k = 0.063 \text{ s}^{-1}$  gespalten. Zwischen beiden Substraten konnte in dieser Versuchsanordnung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

### 3.5.2. Die MutS-Dimer-Variante mit verschiedenen KCl-Konzentrationen

Die KCl-Konzentration spielt bei der Untersuchung des *mismatch*-Reparatursystems eine wesentliche Rolle. Bei niedriger KCl-Konzentration (50 mM), spaltet MutH im Komplex mit MutL, unabhängig von der Aktivierung durch MutS. Bei einer KCl-Konzentration zwischen 100 und 150 mM wird MutH nur nach der Erkennung der Basenfehlpaarung durch MutS und MutL zum Spalten aktiviert. Bei einer KCl-Konzentration von über 150 mM nimmt die Aktivierung von MutH durch MutS zunehmend ab. Bei einer Konzentration von 250 mM KCl arbeitet das MutHLS-System nicht mehr, weil MutS nicht mehr an die DNA binden kann (siehe 3.1.). Warum bei hohen KCl-Konzentrationen keine Bindung von MutS an die DNA mehr stattfinden kann, ist unklar. Deshalb wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Dimer- und der Tetramer-Variante von MutS bei verschiedenen KCl-Konzentrationen

untersucht. Das folgende Gelbild zeigt MuthLS-Spaltkinetiken der beiden MutS-Varianten bei einer KCl-Konzentration von 150 mM und 200 mM.



**Abb. 3-17: In der MuthLS-Spaltkinetik wurde die Aktivität des MutS<sup>CF</sup> Proteins mit der MutS<sup>D835R</sup>-Variante verglichen** Als Substrat (S) wurde eine 484 bp lange DNA mit einer Basenfehlpaarung verwendet, nach der Spaltung von MuthLS entstehen ein 209 bp langes Spaltprodukt (P 209 bp) und ein 275 bp langes Spaltprodukt (P275 bp). Die Reaktionen wurden mit 1  $\mu$ M MutL, 500 nM MuthLS, 500 nM MutS, 1 mM ATP in 1x Puffer gelb bei 37 °C durchgeführt, 10  $\mu$ l der Probe wurden in 2  $\mu$ l AAP gestoppt und anschließend auf ein Polyacrylamidgel (6%) aufgetragen. Marker pUC 8 Mix

Mit zunehmender KCl-Konzentration werden die Ergebnisse für die Kinetiken mit der Dimer- und der Tetramer-Variante von MutS immer unterschiedlicher. Bei 150 mM KCl sind die Kinetiken mit der Dimer-Variante und der Tetramer-Variante noch fast gleich. Nach 5 min sind mit dem Dimer 80 % des Substrates gespalten, mit dem Tetramer hingegen 84 %. Nach 25 min sind mit der Dimer-Variante 93 % und mit der Tetramer-Variante von MutS schon etwa 97 % des Substrates gespalten worden. Mit 200 mM KCl in der Reaktion vergrößert sich der Unterschied in den Kinetiken extrem. Die Tetramer-Variante von MutS zeigt bei 200 mM KCl noch gute Aktivität, nach 25 min waren 93 % des Substrates gespalten, während die Dimer-Variante von MutS bei 200 mM KCl nicht mehr aktivieren kann, nur ca. 1 % des Ausgangssubstrates war gespalten.

Für eine weitere Auswertung wurden die KCl-Konzentrationen von 100-200 mM getestet und die Geschwindigkeitskonstanten aus MuthLS-Spaltkinetiken von MutS<sup>D835R</sup> und MutS<sup>CF</sup> ermittelt. Das folgende Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse.

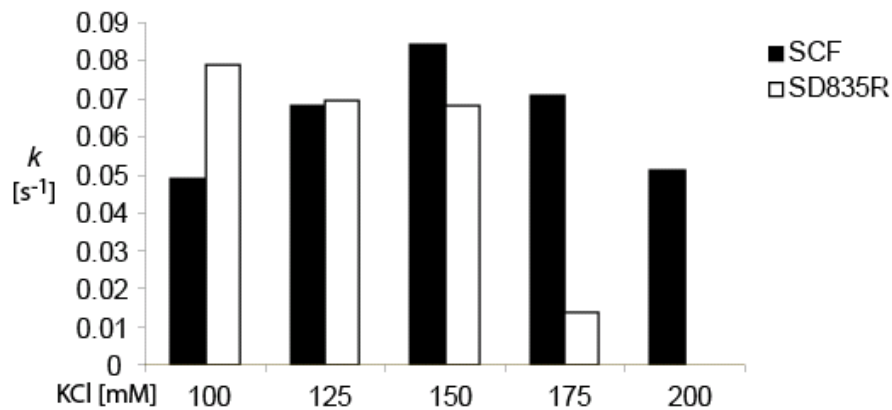


Abb. 3-18: Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) der MutHLS-Spaltkinetiken mit verschiedenen KCl-Konzentrationen

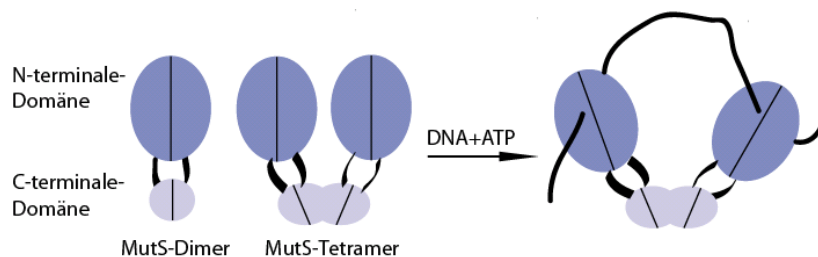
Schwarz, Spaltaktivitäten mit MutS<sup>CF</sup>; weiß, Spaltaktivität mit MutS<sup>D835R</sup>

Die Dimer-Variante von MutS ist empfindlicher gegenüber hohen KCl-Konzentrationen als die Tetramer-Variante. Schon bei einer KCl-Konzentration von 175 mM ist die Fähigkeit der Dimer-Variante, MutH zu aktivieren stark eingeschränkt, ab einer Konzentration von 200 mM KCl aktiviert das MutS-Dimer nicht mehr.

### 3.5.3. Aktivität der MutS-Dimer-Variante mit einer *roadblock*-DNA

Derzeit ist unklar, mit welchem Mechanismus die Proteine MutH und MutL, nach der Erkennung der Basenfehlpaarung durch MutS, aktiviert werden, um die Strangdiskriminierung durchzuführen. Es ist nicht sicher, wie viele und woran MutS-Moleküle bei diesen Vorgängen beteiligt sind. Wenn MutS für die Ausbildung der DNA-*loops* während der Aktivierung von MutH verantwortlich ist, dann könnte die Aktivierung von MutS über eine Blockade hinweg davon abhängig sein, ob MutS Tetramere ausbilden kann (siehe Abbildung 3-19). Der *loop* in der DNA könnte gebildet werden, indem die jeweilige DNA-Bindungsdomäne eines Dimers an verschiedenen Stellen der DNA bindet. Die DNA wird dann von MutS „zusammengezogen“, sodass im *loop* die Basenfehlpaarung und die GATC-Erkennungssequenz räumlich zusammen kommen.

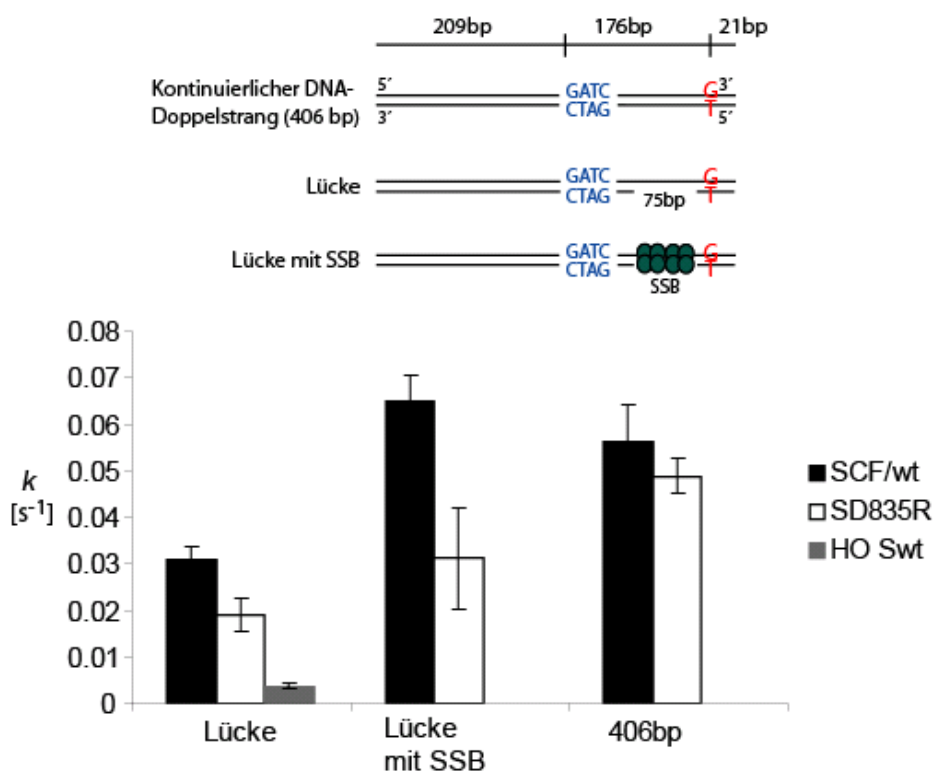
Ein *loop*-Mechanismus zeigt seine Vorteile erst, wenn die Aktivierung von MutH über größere Distanzen bzw. über Hindernisse hinweg erfolgen muss. Deshalb zeigten sich in Kinetiken mit 484 bp oder 360 bp langen, linearen *mismatch*-Substraten keine Auswirkungen, auch wenn die MutS-Dimer-Variante eingesetzt wurde.



**Abb. 3-19: Modell für die Tetramerisierung von MutS**

Hellblau, C-terminale Domäne, die für die Tetramerisierung von MutS vermittelt; schwarz, DNA

Um dieses Modell zu testen, wurden DNA-Substrate mit einem *roadblock* zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz in Aktivitätstests mit der MutS Tetramer-Variante und der Dimer-Variante eingesetzt. Folgende, in Abbildung 3-20 dargestellten, Substrate mit einer Einzelstranglücke (Lücke) und einem ssDNA-SSB-Komplex (Lücke mit SSB) wurden verwendet:

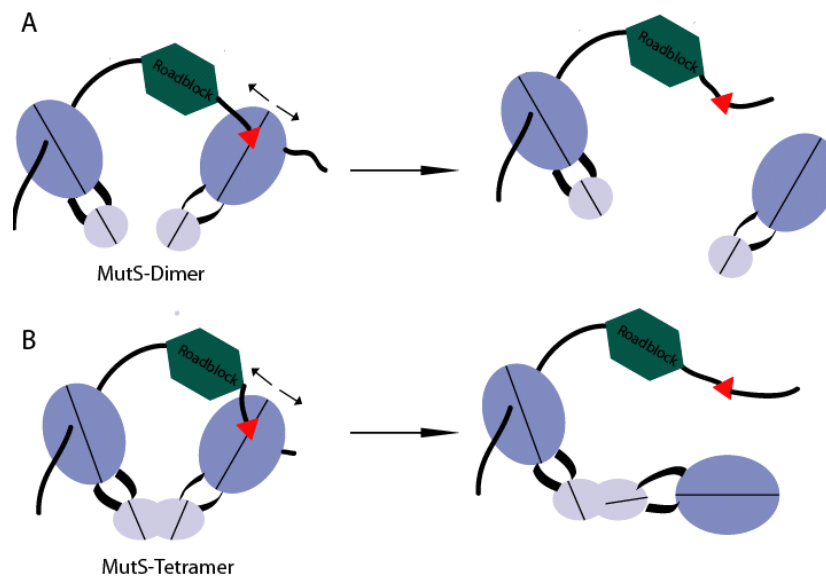


**Abb. 3-20: Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) der verschiedenen MutH-Aktivierungsreaktionen**

Die schwarzen Balken zeigen  $k$  für die MutS<sup>CF</sup>-Variante, die weißen  $k$  für die MutS<sup>D835R</sup>-Variante und der graue Balken zeigt die Homoduplex-Spaltung mit MutS<sup>wt</sup>.

Die Aktivierung von MutH durch das Dimer von MutS ist wie vermutet schlechter auf Substraten mit einer Blockade zwischen dem *mismatch* und der GATC-Erkennungssequenz. Dabei scheint eine Lücke aus ssDNA-SSB-Komplex mehr zu stören als nur eine Einzelstranglücke. Wenn der Mechanismus der Aktivierung verlangt, dass ein MutS-Dimer

am *mismatch* bindet und ein zweites Dimer die GATC-Erkennungssequenz erreicht, dann verursacht die Blockade die Inhibition der Aktivierung, weil das erste *mismatch*-gebundene Dimer den Kontakt zum zweiten Dimer nicht halten kann. Die Basenfehlpaarung sehr nah am Ende der DNA bewirkt ein Diffundieren von MutS von den DNA-Enden (siehe Abbildung 3-21, A). Das Tetramer stabilisiert sich über die C-terminale Domäne, ein von den Enden diffundiertes Dimer wird schneller wieder auf die DNA geladen (siehe Abbildung 3-21, B). Um dieses „kritische“ Phänomen besser zu charakterisieren, sind allerdings weitere Studien nötig.



**Abb. 3-21:** Das dimere und das tetramere MutS nach der *mismatch*-Erkennung auf einem Substrat mit Blockade



### 3.6. Fixieren von MutS auf der DNA

MutS ist das Schlüsselprotein des *mismatch*-Reparatursystems in *E. coli*. Die Funktion von MutS besteht darin, Basenfehlpaarungen oder IDLs (*insertion/deletion loops*) in doppelsträngiger DNA zu finden und zu erkennen. Nach der Bindung des Proteins an die DNA muss die weitere Aktivierung von MutL und MutH stattfinden, damit an der bis zu 1000 bp entfernten GATC-Erkennungssequenz gespalten werden kann und die fehlerhafte Stelle in der DNA repariert wird. Es ist bekannt, dass MutS Dimere und auch Tetramere ausbildet. Durch eine Punktmutation an der Position 835 von Aspartat zu Arginin wird die Tetramerisierung des Proteins verhindert (Manelyte *et al.*, 2006; Mendillo *et al.*, 2007). In Aktivitätstests zeigt die Dimer-Variante ein kaum verändertes Verhalten gegenüber der Tetramer-Variante, allerdings zeigt die Dimer-Variante eine starke KCl-Konzentrationsabhängigkeit (siehe 3.5.). Es stellt sich nun die Frage, ob ein einzelnes MutS-Dimer ausreicht, um MutL und MutH zu aktivieren. Unklar ist auch, auf welche Weise MutS den Reparaturprozess initiiert. Vermutlich ändert MutS nach der erfolgreichen Erkennung der Basenfehlpaarung mit Hilfe der ATP Bindung seine Konformation und kann dann MutL rekrutieren und die nachgeschalteten Reparaturschritte initiieren. Dazu gibt es zwei unterschiedliche Modelle (Iyer *et al.*, 2006): Einerseits könnte MutS an der Basenfehlpaarung bleiben und von dort aus weiter agieren (stationäres MutS-Modell), andererseits könnte MutS auch die Basenfehlpaarung verlassen und zur MutH-Erkennungssequenz wandern, z. B. durch Diffusion entlang der DNA-Helix (mobiles MutS-Modell). Dabei würde die Umwandlung von der „*scanning*“-Form des MutS-Proteins in eine aktivierende Form mit Hilfe von ATP stattfinden und sich in einer Konformationsänderung des Moleküls äußern. Es wird angenommen, dass MutS nach der Basenfehlpaarungserkennung eine Ringstruktur bildet, damit es entlang der DNA-Helixkontur diffundieren kann. Das Protein funktioniert demnach in diesem Mechanismus wie ein molekularer Schalter (*molecular switch*), der durch die Bindung an die Fehlpaarung und einen ADP/ATP-Austausch „angeschaltet“ wird. Nach der Umwandlung könnte es MutL und MutH aktivieren und die DNA-Reparatur in Gang setzen (Gradia *et al.*, 1997; Acharya *et al.*, 2003). Welche Bewegungen müssten dazu im Protein stattfinden? Wie verlässt das Protein die DNA? Vielleicht muss es die Nukleotid-Bindungsdomänen öffnen, um eine zirkuläre DNA ohne offene Enden verlassen zu können. Ziel der im folgenden Abschnitt beschriebenen Experimente war es, MutS auf der DNA zu fixieren, indem die DNA-Bindung des Proteins irreversibel gemacht wird. Die Idee bestand darin, das Protein an die DNA zu binden und anschließend beide *clamp*-Domänen um die DNA herum mit Hilfe eines *crosslinkers* zu schließen.



Abb. 3-22: MutS mit DNA und vernetzten *clamp*-Domänen (aus Manelyte, 2006, Dissertation)

Aus der Dissertation (Manelyte, 2006) gab es Ergebnisse, nach denen ein an der Position 483 mit dem *crosslinker* M4M vernetztes MutS noch lineare DNA, aber keine zirkuläre DNA mehr binden kann (siehe Abbildung 3-23). Das Experiment wurde durchgeführt, indem zuerst MutS an eine 42 bp lange DNA gebunden wurde und anschließend die Plasmid-DNA (pUC8) als Kompetitor in steigenden Mengen dazu gegeben wurde.

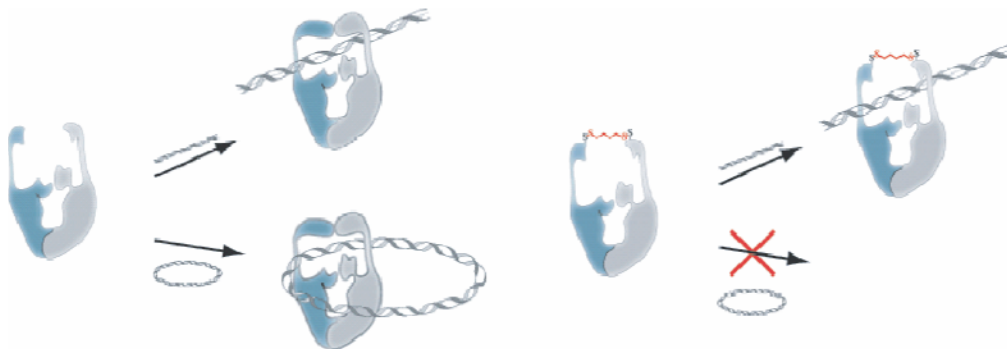


Abb. 3-23: Modell für die Bindung von MutS an lineare oder zirkuläre DNA mit und ohne *crosslink* (aus Manelyte, 2006, Dissertation)

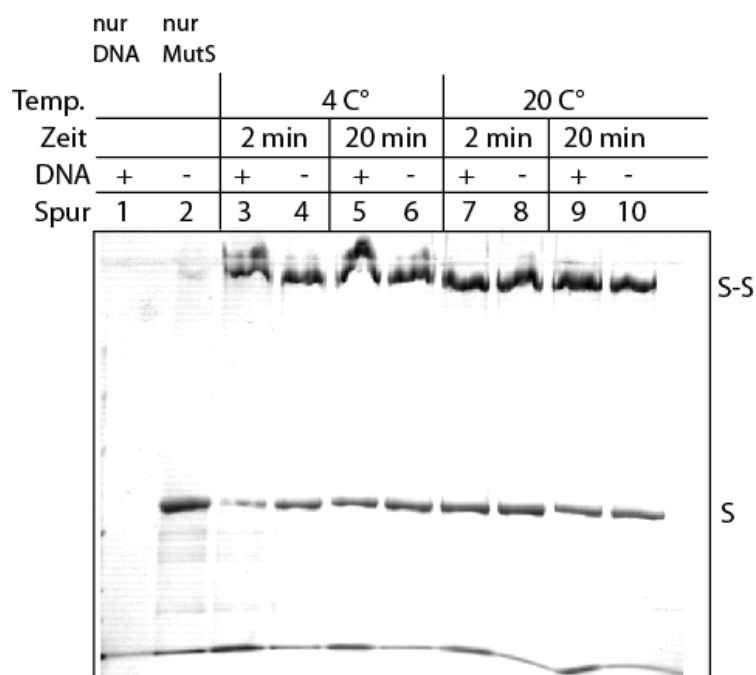
Das vernetzte MutS ist nicht mehr in der Lage, an eine zirkuläre DNA zu binden. Durch den *crosslink* wurde die DNA-Bindungsdomäne geschlossen; eine lineare DNA kann noch in den DNA-Bindungstunnel gelangen, aber für eine zirkuläre DNA gibt es keinen Zugang mehr.

### 3.6.1. Die *crosslink*-Ausbeute mit DNA liegt zwischen 60 % und 70 %

MutS aus *E. coli* besitzt sechs Cysteine, für die folgenden Reaktionen wurde die cysteinfreie Variante von MutS (Manelyte *et al.*, 2006) verwendet. An der Position 483 wurde ein Histidin durch ein Cystein ersetzt, um *crosslink*-Experimente durchführen zu können. Die Position 483 liegt oberhalb der DNA-Bindungsstelle in der *clamp*-Domäne von MutS und die Cysteine in

den jeweiligen Monomeren liegen 18.2 Å auseinander (Abb. 3-22). Für die *crosslink*-Reaktionen wurden zwei Methan-Thiosulfonat-*crosslinker* (MTS) mit verschiedenen langen Linkern eingesetzt. Die „Reichweite“ (von Schwefel- zu Schwefelatom) dieser Reagenzien beträgt 24.7 Å (MTS M17M) bzw. 20.8 Å (MTS M14M) (Loo *et al.*, 2001) .

Zuerst wurde getestet, wie hoch die Ausbeute des vernetzten Proteins ist, wenn das Protein vor der *crosslink*-Reaktion an DNA (42 bp mit G/T-Fehlpaarung) gebunden hat. Vor der *crosslink*-Reaktion wurde MutS<sup>H483CD835R</sup> für 10 min bei 4 °C an die DNA gebunden.



**Abb. 3-24: Protein-Protein-*crosslink* (mit dem MTS-*crosslinker*, M14M) der Variante MutS<sup>H483CD835R</sup> nach Bindung an *mismatch*-DNA**

Die Reaktion wurde mit 2 µM MutS<sup>H483CD835R</sup>, 10 µM DNA (42 bp G/T), 50 mM KCl in 1x Puffer gelb durchgeführt. 10 µl der Probe wurden mit 4 µl 5x LAP gestoppt und auf ein SDS-Gel (6 % Sammelgel, 6 % Trenngel) aufgetragen. Spur 1, nur DNA; Spur 2, nur MutS<sup>H483CD835R</sup>. Das Gel wurde mit *Coomassie* gefärbt

Es konnte kein Einfluss durch einzelne Parameter, wie Temperatur, Reaktionszeit oder Zugabe von DNA, beobachtet werden. Die *crosslink*-Ausbeute lag bei 60-70 %. Für die weiteren *crosslink*-Reaktionen wurde eine Reaktionszeit von 2 min und eine Temperatur von 4 °C gewählt.

### 3.6.2. Der *crosslink* stabilisiert den DNA-Protein-Komplex

Um das Bindungsereignis von MutS an die Basenfehlpaarung besser zu analysieren, wurden zuerst Elektrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) mit nativen Gelen durchgeführt. Ziel war es, den Bindungskomplex einer 484 bp langen DNA mit MutS im Gel als klare Bande

festzuhalten und außerdem die verschiedenen Komplexe aus DNA mit einem MutS, DNA mit zwei MutS-Molekülen usw. aufzutrennen. Da diese Experimente zu Beginn der Studien mit der 483-Variante von MutS entstanden, wurde hier noch die Variante ohne die Mutation an der Position 835 verwendet. Die Bindungsexperimente wurden mit und ohne crosslinker durchgeführt. Das Protein, dessen *clamp*-Domänen nach der DNA-Bindung vernetzt wurden, sollte stabilere Komplexe bilden als das nicht vernetzte Protein. In den EMSA-Experimenten wurden verschiedene Konzentrationen des MutS<sup>H483C</sup>-Proteins mit 484 bp langer linearer DNA inkubiert.

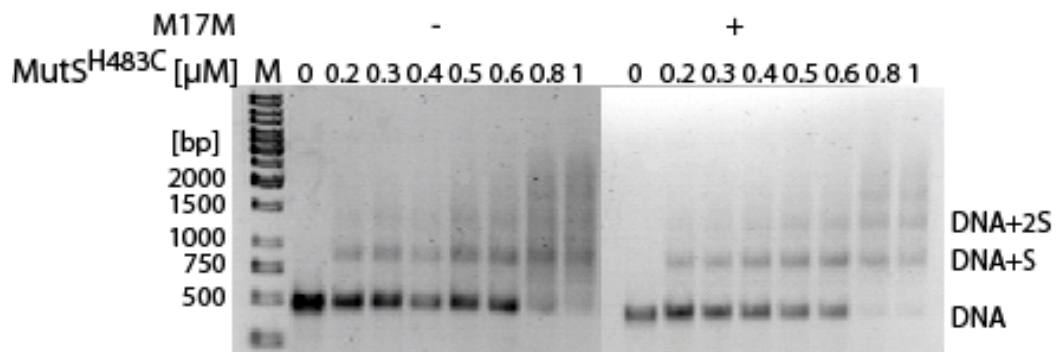
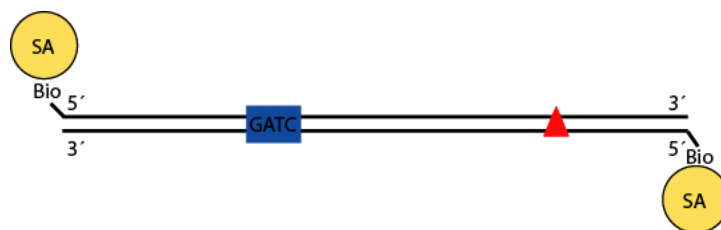


Abb. 3-25: Shift-Experiment mit MutS<sup>H483C</sup> und DNA 484 bp (HE)  
Die Bindung wurde mit 25 nM DNA, 125 mM KCl, ADP 1 mM und M17M 5 μM in 1x DNA-Bindungspuffer für 10 min bei 4 °C durchgeführt. 10 μl der Probe wurden mit 4 μl Bindungs-Auftragspuffer gestoppt und auf ein Agarosegel (1.5 %) in 1x TAE aufgetragen, das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. M, Marker pUC8 Mix Marker; x, *crosslinker* M17M

Die Agarosegele zeigen, dass MutS an die DNA gebunden hat und verschiedene Komplexe nachweisbar sind (Abbildung 3-25). Bei steigenden Konzentrationen entstehen weitere Komplexe mit zunehmend abnehmender elektrophoretischer Mobilität, was in erster Näherung als Komplexe mit mehr als einem MutS-Dimer interpretiert wurde. Die Gelbilder mit *crosslinker* zeigen definiertere Banden und bei einer Konzentration von 800 nM des Proteins ist kaum noch freie DNA detektierbar. In der Tat scheint der *crosslinker* den Protein-DNA-Komplex zu stabilisieren.

### 3.6.3. MutS dissoziiert nicht von DNA mit geschlossenen Enden

MutS hat die Möglichkeit, über verschiedene Mechanismen von der DNA zu dissoziieren: Zum einen kann es von der DNA durch Öffnen der *clamp*-Domäne direkt (ATP-unabhängig), zum anderen, nach Ausbildung der *sliding clamp*, über die Enden (ATP-abhängig) dissoziieren (Blackwell *et al.*, 2001). Die folgenden Experimente zeigen die Bindung von MutS an eine 484 bp lange Heteroduplex-DNA, deren Enden entweder frei oder mit Streptavidin (SA) blockiert waren, sodass MutS im letzteren Fall nur noch direkt von der DNA dissoziieren könnte.

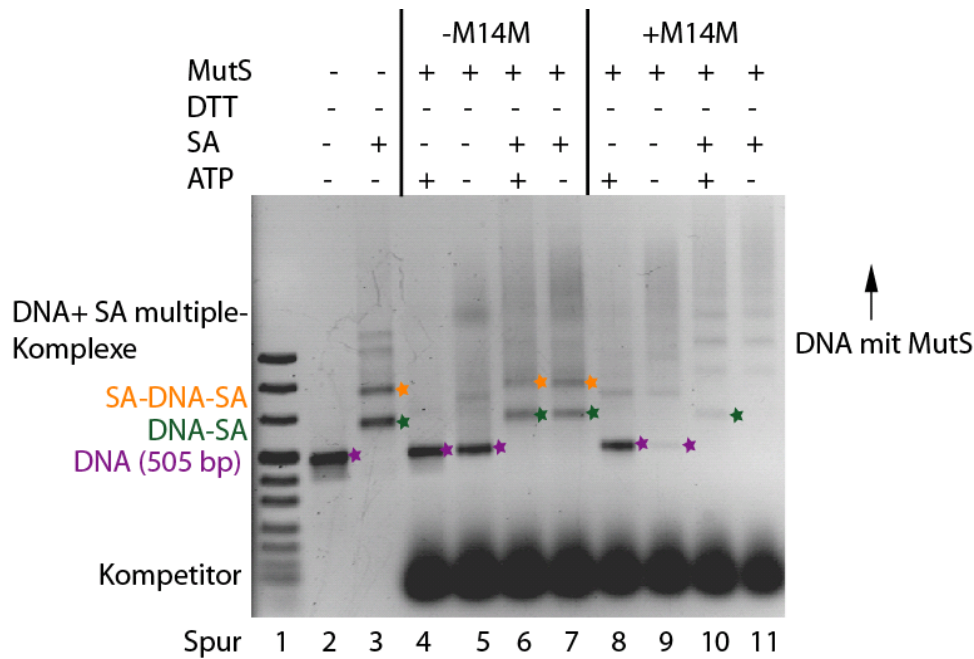


**Abb. 3-26: 484 bp langes, doppelt endblockiertes, lineares *mismatch*-Substrat**

Das DNA-Substrat wurde an beiden Enden mit Hilfe eines *primer* biotinyliert und anschließend mit Streptavidin (SA, gelb) inkubiert.

Rot, Basenfehlpaarung; blau, GATC-Erkennungssequenz

Dabei wurden die Reaktionen sowohl mit ADP als auch mit ATP durchgeführt und nach dem Binden von MutS an die DNA wurde eine 42 bp lange *mismatch*-DNA zum Abfangen aller freien Proteine der Reaktion beigelegt. Wie verhält sich ein kovalent gebundenes (+M14M) MutS-Protein, kann es die DNA nur noch über deren Enden verlassen?



**Abb. 3-27: Bindung von MutS<sup>H483C/D835R</sup> an eine 484b lange DNA**

Die DNA besitzt eine Basenfehlpaarung und trägt an beiden Enden ein Biotin. Die Reaktion wurde mit 560 nM MutS<sup>H483C/D835R</sup> und 35 nM DNA durchgeführt. Spur 2, DNA alleine; Spur 3, DNA mit Streptavidin. Spur 4-7, ohne *crosslinker*; Spur 8-11, mit *crosslinker* M14M; Spur 6, 7, 10, 11, mit Streptavidin (DNA mit blockierten Enden); Spur 4, 6, 8, 10 mit ATP; Um freie Proteine nach der Bindungsphase zu stoppen, wurde zu allen Proben nach der Bindungs- und *crosslink*-Reaktion 1  $\mu$ M Kompetitor-DNA (G/T 42 bp) dazugegeben. Agarosegel (1.5 %) mit 1x TAE, mit Ehtidiumbromid gefärbt

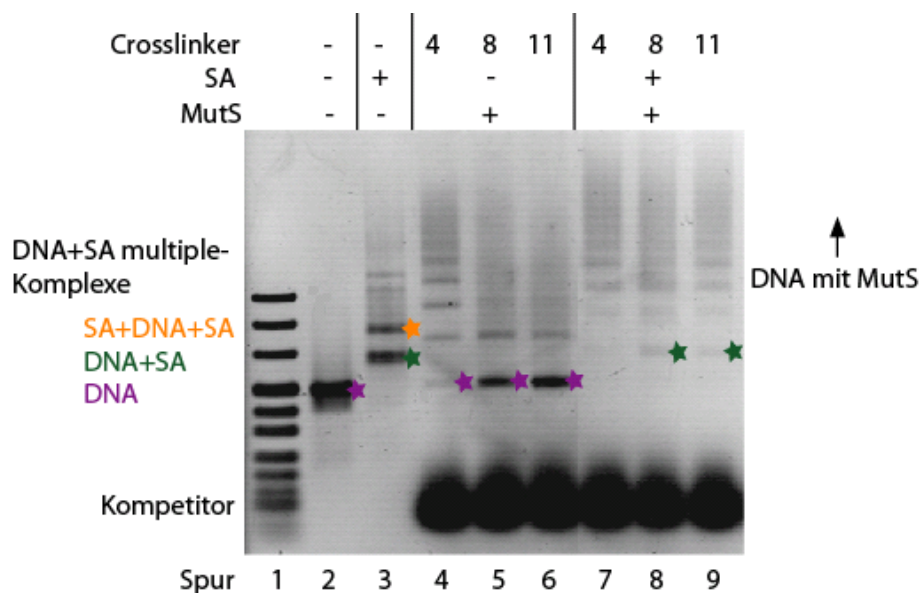
Die DNA in Spur 3 (Abbildung 3-27) ist nicht homogen, nach der Zugabe von Streptavidin (SA) bilden sich Komplexe aus einem DNA-Molekül mit einem SA-Molekül, Komplexe aus einem DNA-Molekül mit zwei SA-Molekülen und Komplexe aus mehreren DNA-Molekülen, die mit Hilfe des SA vernetzt wurden. Um die Diffusion von MutS von den DNA-Enden beobachten zu können, muss die DNA, die mit einem bzw. zwei SA-Molekülen gebunden hat, betrachtet werden. Spur 4 und 5 zeigen MutS gebunden an DNA mit offenen Enden, mit ATP diffundieren alle MutS-Moleküle von den Enden der DNA, ohne ATP bleibt zumindest ein Teil der Proteine an der DNA. Spur 6 und 7 zeigen kaum einen Unterschied in der Menge an freier DNA, nur ein Teil der freien DNA wird im Gel sichtbar, einige der MutS-Moleküle diffundieren nicht über die Enden der DNA. Die Proben aus Spur 10 und 11, MutS mit *crosslinker* und endblockierter DNA, verdeutlichen, dass MutS auf der DNA fixiert werden kann, wenn die *clamp*-Domänen eines Dimers mit Hilfe einer Disulfidbrücke geschlossen werden und keine Enden zum Herunterdiffundieren vorhanden sind. Das Protein kann nicht mehr direkt durch Öffnen der *clamp*-Domänen von der DNA diffundieren und durch die blockierten Enden bleibt auch das ATP gebundene MutS in Form der *sliding clamp* auf der

DNA. Ein kleiner Anteil, der, nur an einem Ende mit SA blockierten DNA, taucht im Gel auf, denn dort kann MutS die DNA über das offene Ende verlassen.

### 3.6.4. Für die Diffusion auf der DNA benötigt MutS ausreichend Flexibilität innerhalb der *clamp*-Domäne

Für die vorherigen Ergebnisse wurde ein *crosslinker* mit einer Länge von 20.8 Å verwendet, der Abstand zwischen den Cysteinen an der Position 483 im MutS Protein beträgt 18.2 Å. Die Länge des *crosslinkers* sollte das Protein in seiner natürlichen Konformation nicht behindern, die *clamp*-Domänen haben mit diesem 20.8 Å langen *crosslinker* sogar noch einen gewissen Bewegungsspielraum. Im nächsten Abschnitt wurden kürzere *crosslinker* verwendet, um zu testen, ob das Protein in seinem Dissoziationsverhalten eingeschränkt sein würde. Mit einem kürzeren *crosslinker* hat das Protein einen geringen Bewegungsspielraum zwischen den *clamp*-Domänen.

Es wurden drei verschiedene *crosslinker* getestet. M4M mit einer Länge von 7.8 Å, M8M mit einer Länge von 13 Å und M11M mit einer Länge von 16.9 Å.



**Abb. 3-28: Bindung von MutS an lineare, 484 bp lange DNA**

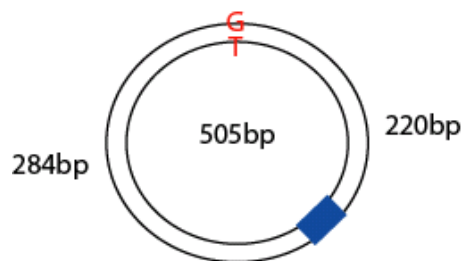
45 nM DNA wurden für 10 min bei 4 °C mit 720 nM MutS<sup>H483C/D835R</sup> in 1x Puffer gelb mit 50 mM KCl inkubiert, die anschließende *crosslink*-Reaktion, mit 3.6 µM *crosslinker*, inkubiert für 2 min bei 4 °C. Danach wurden 1 mM ATP und 1µM Kompetitor-DNA (G/T 42 bp) zugegeben und nach 1 min wurde die Reaktion in 4 µl Bindungs-Auftragspuffer gestoppt. Alle Proben wurden mit und ohne Streptavidin (SA) angesetzt. Agarosegel (1.5 %), 1x TAE mit Ethidiumbromid gefärbt

MutS<sup>H483CD835R</sup> verlässt die DNA sehr langsam, wenn die *clamp*-Domänen mit dem M4M *crosslinker* verbunden sind. Auch von der DNA mit offenen Enden und ATP dissoziiert das

mit dem M4M vernetzte Protein nur sehr langsam, im Gel zeigt sich keine Bande mit freier DNA (vgl. Abb. 3-28, Spuren 4 und 7 mit Spuren 5-6 bzw. 8-9).

### 3.6.5. Bindung eines Dimers an 505 bp lange, zirkuläre *mismatch*-DNA

Im Laufe der hier durchgeführten Arbeiten wurde in der Arbeitsgruppe (Prof. P. Friedhoff) ein Verfahren zur Herstellung 505 bp langer zirkulärer DNA-Substrate mit einer definierten Basenfehlpaarung entwickelt. Diese zirkulären Substrate wurden im nächsten Abschnitt in DNA-Protein-Bindungsexperimenten eingesetzt. Kurze Plasmide haben den Vorteil, dass sie gut für Gelanalysen verwendet werden können. Gegenüber linearen Substraten haben sie den Vorteil, dass sie keine Enden besitzen, mit denen MutS interagiert oder von denen es dissoziieren kann.



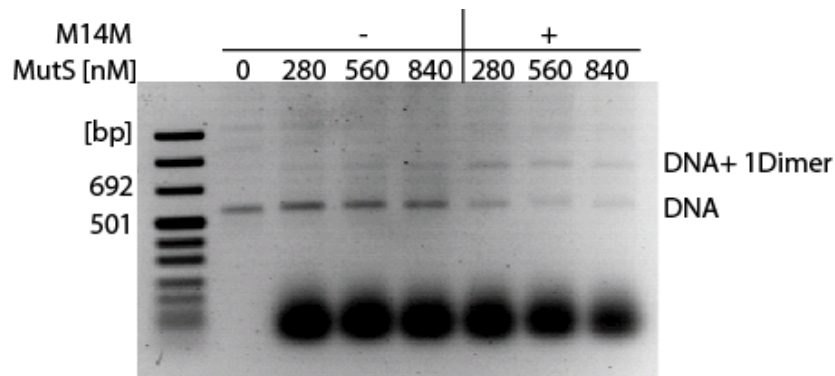
**Abb. 3-29: Schema für ein 505 bp langes zirkuläres DNA-Substrat**

Der Abstand von der Basenfehlpaarung beträgt in Richtung des Uhrzeigersinns 220 bp und entgegengesetzt 284 bp.

Rot, Basenfehlpaarung; blau, Position der GATC-Erkennungssequenz

Auch mit der zirkulären DNA wurden EMSA-Experimente durchgeführt, dabei sollten Bedingungen geschaffen werden, die es nur einem Molekül MutS<sup>H483C/D835R</sup> ermöglichen, an die DNA zu binden. Ziel war es, mit nur einem Dimer von MutS einen Aktivitätstest durchzuführen um zu sehen, ob ein Dimer für die Aktivierung ausreicht. Die Experimente wurden mit und ohne zusätzlichen *crosslinker* (M14M) durchgeführt.





**Abb. 3-30: Bindung von MutS an zirkuläre DNA**

10  $\mu$ l der Probe wurden in 4  $\mu$ l Bindungs-Auftragspuffer gestoppt und aufgetragen. Die Bindungsreaktion wurde mit unterschiedlichen Mengen von MutS<sup>H484CD835R</sup> und 45 nM 505 bp langer zirkulärer DNA, mit 50 mM KCl durchgeführt. Agarosegel (2 %), 1x TPE, mit Ethidumbromid gefärbt

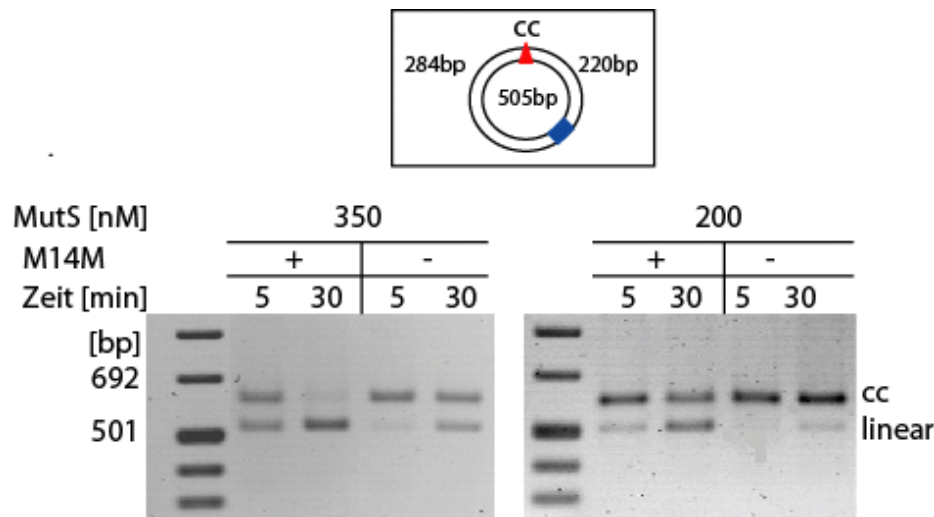
Mit der zirkulären DNA und den in Abbildung 3-30 verwendeten MutS<sup>H483C/D835R</sup>-Konzentrationen scheint es möglich zu sein, bevorzugt ein Dimer des Proteins an die DNA zu binden, und mit Hilfe des *crosslinkers* kann der Komplex stabilisiert werden. Allerdings wurde noch nicht versucht mit denselben Konzentrationen einen MutH Aktivierungstest durchzuführen, weil erhebliche Schwankungen in den Anteilen der gebundenen Komplexe auftraten.

### 3.6.7. Ein an der Position 483 vernetztes MutS kann MutH aktivieren

Mit Hilfe von Aktivitätstests sollte im nächsten Abschnitt gezeigt werden, dass das an der Position 483 vernetzte MutS eine zirkuläre DNA ohne Enden nicht mehr verlassen kann, weil es zum Verlassen der DNA die *clamp*-Domänen öffnen müsste. Das Protein behält seine Aktivität bzw. bildet wegen der Vernetzung einen stabileren Komplex mit der DNA aus und zeigt dadurch sogar mehr Aktivität als das nicht vernetzte Protein. Die Daten aus 3.5.2. dieser Arbeit zeigen, dass die MutS-Dimer-Varianten mit der Mutation D835R gegenüber den Tetramer-Varianten stärkere Sensibilität für Salzkonzentrationen besitzen. Das heißt, die Proteine, die keine Tetramere mehr bilden können, verlieren ihre Aktivität bei einer KCl-Konzentration von  $> 180$  mM. Durch die Vernetzung der *clamp*-Domänen könnte der Dimer-DNA-Komplex stabilisiert werden, wie die Ergebnisse aus 3.6.2. zeigen. Bei vergleichender Messung der Aktivität von MutS<sup>H483CD835R</sup> vernetzt und unernetzt, mit hohen KCl-Konzentrationen sollte sich ein Unterschied zeigen.

Die folgenden Aktivitätstests wurden so durchgeführt, dass die Bindung von MutS an die DNA bei 50 mM KCl und ohne Nukleotid stattfand. Anschließend wurde die KCl-Konzentration mit Zugabe der Proteine MutL, MutH und ATP auf 250 mM erhöht und damit freie Proteine aus der Lösung nicht erneut an die DNA binden konnten, wurde eine 42 bp

Kompetitor-DNA dazugegeben. Die zu spaltende DNA hatte eine Länge von 505 bp und war zirkulär. Unter genau gleichen Bedingungen wurden parallel MutHLS-Spaltkinetiken mit und ohne vernetztes MutS durchgeführt. Das Gel in Abbildung 3-31 zeigt vier Spaltkinetiken, die Kinetiken wurden einmal mit 350 nM MutS<sup>H483C/D835R</sup> und einmal mit 200 nM MutS<sup>H483C/D835R</sup> durchgeführt.



**Abb. 3-31: MutHLS-Reaktion mit vernetztem und nicht vernetztem MutS und 505 bp langer, zirkulärer mismatch-DNA**

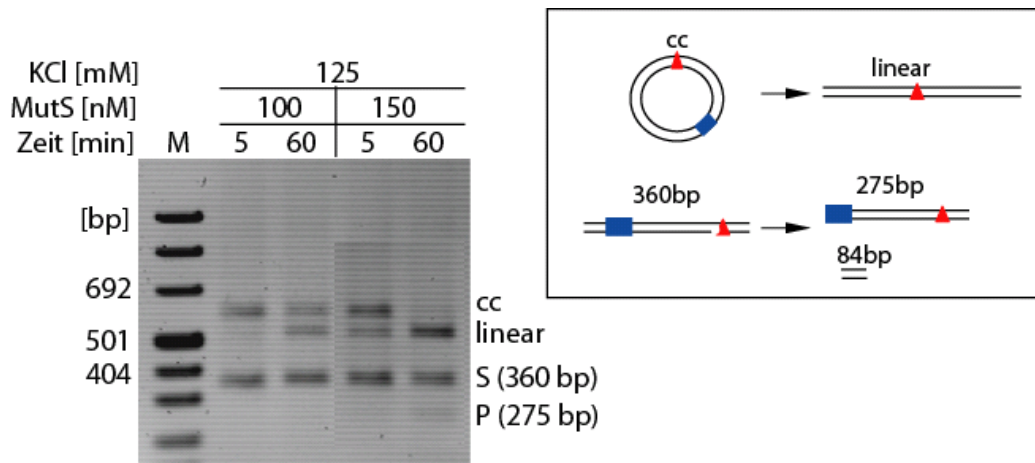
Die Reaktion wurde mit 350 nM und 200 nM MutS<sup>H483C/D835R</sup>, mit 500 nM MutL<sup>CF</sup>, 500 nM MutH<sup>CF</sup>, 1 mM ATP, jeweils der 5-Fachen MutS Konzentration des M14M-crosslinkers in 1x Puffer gelb durchgeführt. Zuerst wurde MutS mit der DNA mit 50 mM KCl für 10 min bei 4 °C vorinkubiert. Danach wurde die KCl-Konzentration auf 250 mM erhöht und 2 µM Kompetitor-DNA (G/T 42 bp) zu der Reaktion dazugegeben. MutL wurde mit ATP für 20 min vorinkubiert, anschließend wurden MutL und MutH zusammengegeben. Die Reaktion wurde gestartet mit dem Zusammenbringen von MutS, MutL und MutH und mit 2.5 µl 5x AAP gestoppt. Der geschlossene Zirkel wird nach Doppelstrangspaltung durch MutH zu einem 505 bp langen linearen Produkt. Zwei Agarosegele (2 %), in 1x TPE mit Ethidiumbromid gefärbt

Die MutHLS-Reaktionen (Abbildung 3-31) zeigen unterschiedlich gute Aktivität, die Kinetiken mit vernetztem MutS sind schneller. Mit einer Konzentration von 200 nM MutS ohne crosslinker entsteht auch nach 30 min fast kein Produkt. Offensichtlich beeinflussen die hohen KCl-Konzentrationen die Aktivität der MutS-Dimer-Variante nicht mehr, wenn die clamp-Domänen des Proteins vernetzt worden sind. Anscheinend ist ein Öffnen der clamp-Domänen nach der DNA-Bindung nicht mehr nötig. Überraschenderweise zeigt auch die Reaktionen ohne crosslinker Spaltung. Offensichtlich können durch die DNA-Bindung bei 50 mM KCl und eine erst anschließende Erhöhung der KCl-Konzentration auf 250 mM schon stabile Komplexe gebildet werden, auch ohne dass die Proteine mit einem crosslinker vernetzt wurden.

### 3.6.8. Kompetitionsversuche mit zwei verschiedenen DNA-Substraten

Was passiert mit MutS, nachdem es die Basenfehlpaarung erkannt und die Aktivierung von MutL und MutH ausgelöst hat?

In den folgenden Experimenten wurden zwei verschiedene DNA-Substrate in einer Reaktion eingesetzt. Eine der beiden DNAs war eine 505 bp lange zirkuläre DNA, die zweite war eine 360 bp lange lineare DNA. MutS wurde zuerst, bei 50 mM KCl, an die zirkuläre DNA gebunden. Anschließend wurde die KCl-Konzentration mit der Zugabe der zweiten DNA auf 125 mM erhöht. Bei 125 mM KCl sollte MutS eigentlich in der Lage sein, von einer DNA zu dissoziieren und erneut an eine weitere DNA zu binden. Mit beiden DNAs in der Lösung wurde die Reaktion dann mit MutL, MutH und ATP gestartet.



**Abb. 3-32: MutHLS-Spaltkinetiken mit zirkulärer und linearer DNA**

Die Reaktion wurde in 1x Puffer gelb mit 125 mM KCl bei 37 °C durchgeführt. Von MutH und MutL wurden 0,5 µM eingesetzt, von MutS<sup>H483C/D835R</sup> 100 nM oder 150 nM und 18 nM der jeweiligen DNA. Nach den angegebenen Zeiten (5, 60 min) wurden jeweils 10 µl-Aliquots mit 2,5 µl 5x AAP abgestoppt. Agarosegel (2 %), Färbung mit Ethidiumbromid;

M, Marker (pUC Mix Marker 8); cc, geschlossener Zirkel; S, Substrat; P, Spaltprodukt.

Aus Abbildung 3-32 wird anhand des Bandenmusters im Gel deutlich, dass nur die zirkuläre, zuerst gebundene DNA gespalten wurde. MutS scheint nicht in der Lage zu sein, nach dem Aktivieren von MutL und MutH auf einer anderen DNA neu zu aktivieren. Ein Molekül MutS wird scheinbar nicht direkt „recycelt“, sondern bleibt auf der DNA.

### 3.7. Blockade zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz

Entscheidend für die *mismatch*-Reparatur ist das Zusammenspiel der Proteine MutS, MutL und MutH, trotz einer Distanz von bis zu 1000 bp zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz wird die Strangdiskriminierung erst nach der Erkennung einer Basenfehlpaarung initiiert. Die Reaktion von zwei unterschiedlichen Proteinen an zwei weit voneinander entfernten Positionen kann generell in *cis* oder in *trans* stattfinden, für einen Mechanismus in *cis* wird eine intakte DNA-Helix benötigt, damit die Proteinmoleküle diffundieren (mit oder ohne ATP) oder polymerisieren können. Bei *trans*-Mechanismen werden die zwei Positionen mit Hilfe einer Schleifenbildung in der DNA zusammengebracht (*looping*), diese Reaktion kann innerhalb eines DNA-Moleküls, aber auch zwischen zwei DNA-Molekülen stattfinden (siehe Abbildung 3-33) (Kolodner, 2007).

Für den Mechanismus der *mismatch*-Reparatur werden dazu verschiedene Modelle diskutiert. Eines dieser Modelle stellt MutS als eine *sliding clamp* dar. Nach der Bindung von ATP ändert MutS seine Konformation in eine Art Ring, die Ring-Struktur ermöglicht dem Protein die Diffusion entlang der DNA-Helix-Struktur. MutS verlässt die Basenfehlpaarung und bewegt sich bis zu einer GATC-Erkennungssequenz, dort aktiviert es zusammen mit MutL die Endonuklease MutH. Ein anderes Modell geht von einer *loop*-Bildung in der DNA aus, bei der Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz zusammengebracht werden. Der *loop* kann dabei gebildet werden, indem MutS oder MutL durch den Raum nach einem zweiten Ende der DNA greifen, möglich wäre aber auch, dass die DNA durch ein MutS-Dimermolekül hindurchgefädelt wird und sich so ein *loop* bildet (Translokation). Bislang konnte gezeigt werden, dass MutS sich auf der DNA bewegen kann, und dass es, nach der Bindung von ATP, von einer DNA mit offenen Enden sehr schnell herunter dissoziiert, was für das Modell einer MutS-*sliding clamp* spricht. Um in Form eines „*sliding*“-Mechanismus zu aktivieren, braucht MutS einen intakten kontinuierlichen DNA-Strang. (Pluciennik & Modrich, 2007) haben in ihrer Arbeit die hydrolysedefekte Variante von EcoRI eingesetzt, um auf einer DNA-Doppelhelix eine Blockade zu schaffen. Die Blockade inhibierte die MutH-Aktivierung um 70-80 %. In einer weiteren Arbeit über das humane MMR konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der humanen Exonuklease durch die humanen Homologe von MutS und MutL trotz Blockaden, bestehend aus DNA-*hairpin*-Strukturen bzw. Biotin-Streptavidin-Komplexen, zwischen der Fehlpaarung und dem Einzelstrangbruch (engl. *nick*) stattfindet (Wang & Hays, 2003; Wang & Hays, 2004). Die beiden Arbeiten liefern

unterschiedliche Ergebnisse, allerdings könnte das daran liegen, dass der Aktivierungsmechanismus im bakteriellen System sich von dem des humanen Systems unterscheidet. Hinzu kommt, dass die Geometrien der DNA-Substrate unterschiedlich gewählt wurden, bei Pluciennik & Modrich, 2007 beträgt der kürzere Abstand zwischen der Blockade und der GATC-Erkennungssequenz z. B. 715 bp und der längere 5.231 kbp. Bei Wang & Hays, 2004 beträgt der kürzere Abstand der Blockade zur GATC-Erkennungssequenz 150 bp und der längere Abstand umfasst 1.730 kbp.

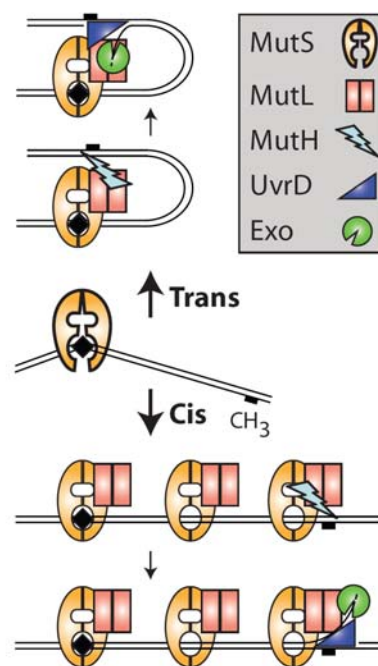


Fig. 1. Cis and trans models for mismatch repair.

**Abb. 3-33: Cis- und trans-Modelle für die mismatch-Reparatur (Kolodner, 2007)**

Nach der Bindung von MutS an die Basenfehlpaarung werden zwei verschiedene Mechanismen für die nachfolgende Strangdiskriminierung vorgeschlagen: Der Erste erfolgt in *cis*, das heißt MutS bewegt sich auf der DNA durch Diffusion. Der zweite Mechanismus beschreibt eine Reaktion in *trans*, dabei findet eine Schleifenbildung der DNA-Helix statt, bei welcher die Basenfehlpaarung mit der GATC-Erkennungssequenz zusammengeführt wird.

In einer vorausgegangenen Arbeit wurden schon zwei verschiedene Substrate mit einer Blockade zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz hergestellt. Mit den unterschiedlichen Substraten wurde die Aktivierung der MutH-Endonuklease durch MutS, MutL getestet und die verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten ermittelt. In Abbildung 3-34 sind die Modelle dieser DNA-Substrate dargestellt. Beide Substrate haben eine Gesamtlänge von 406 bp. Die Blockade wird einmal durch eine Lücke, d. h. einen

einzelsträngigen Bereich, oder im zweiten Fall in Form einer Lücke gefüllt mit *single strand binding protein* (SSB) gebildet.

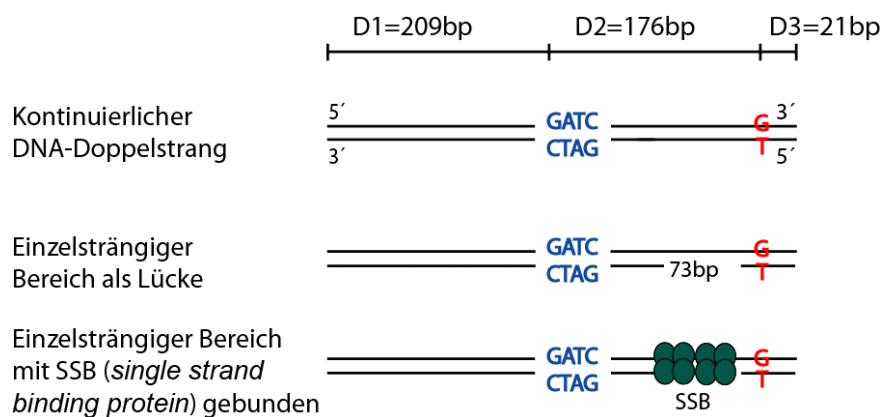


Abb. 3-34: Modelle für die unterschiedlichen *mismatch*-DNA-Substrate

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Spaltkinetiken mit den unterschiedlichen Substraten sind in Abbildung 3-35 in einem Balkendiagramm dargestellt.

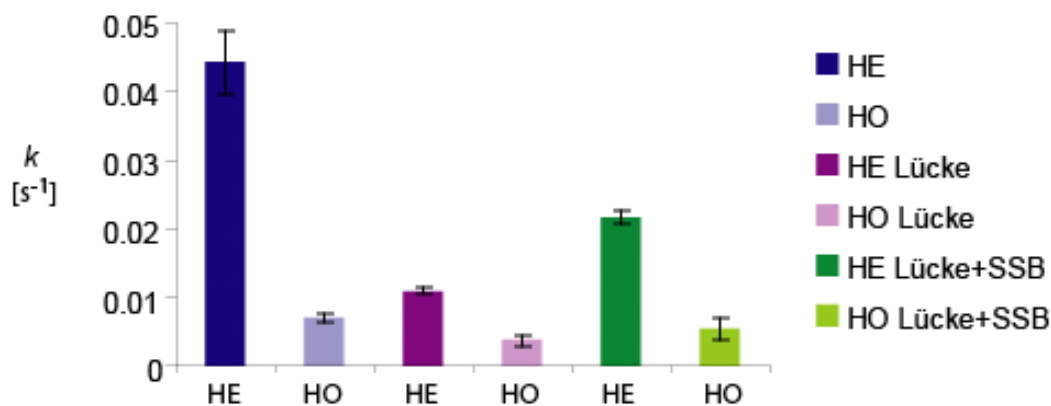


Abb.3-35: Geschwindigkeitskonstanten für die Aktivierung der MuthH-Endonuklease durch MutS, -L Substrate mit und ohne Blockade. Der blaue und der hellblaue Balken zeigen die Geschwindigkeitskonstanten für das 406 bp lange Substrat ohne Blockade als Heteroduplex (HE) und als Homoduplex (HO).

Alle Kinetiken wurden als Kontrolle zusätzlich für die entsprechenden Homoduplex-Substrate durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Spaltung durch die Basenfehlpaarung induziert wurde. Die Geschwindigkeitskonstante ( $k$ ) für die Reaktion mit einem 406 bp langen Substrat ohne Blockade war mit  $0,044 s^{-1}$  am höchsten. Im Falle einer Lücke sank sie auf  $k = 0,011 s^{-1}$ . Das Vorhandensein einer Lücke inhibiert demnach die Aktivierung um 75 % und führt zu einer vierfach geringeren Geschwindigkeitskonstante (Abbildung 3-35). Verglichen mit der Spaltung an einem Homoduplex ( $k = 0,004 s^{-1}$ ) erfolgt aber trotz der DNA-Lücke immer noch eine fehlpaarungsabhängige Aktivierung der MuthH-Endonuklease durch MutS,-L. Die Lücke

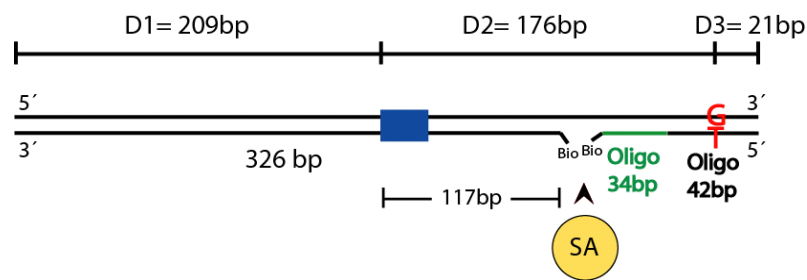
stört die Aktivierung der Endonuklease MutH, stellt aber keine 100%-ige Inhibition dar. Bei Zugabe von SSB stieg die Geschwindigkeitskonstante unerwartet wieder an ( $k = 0.021 \text{ s}^{-1}$ ). Die Inhibition der Aktivierung von MutH sank auf ca. 50 %.

Die Ergebnisse dieser Vorarbeiten zeigen damit, dass die MutH-Endonuklease in einem Substrat mit einem SSB-DNA-Komplex zwischen der Fehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz aktivierbar ist. Die Aktivierung erfolgt über diese Art der Blockaden hinweg. Die hier dargestellten Ergebnisse sind daher nur bedingt mit einem einfachen *sliding clamp*-Modell, wie es bislang in der Literatur beschrieben worden ist, zu vereinbaren.

### **3.7.1. Ein Substrat mit Blockade aber einem kontinuierlichen DNA-Strang inhibiert die Aktivierung von MutH**

Möglicherweise waren die Blockaden Lücke oder Lücke gefüllt mit SSB keine wirklichen Blockaden, die MutS während seiner Bewegung auf der DNA stoppen können. Der eine kontinuierliche DNA-Strang zwischen dem *mismatch* und der GATC-Erkennungssequenz könnte ausreichend sein, um ein Diffundieren von MutS über die Lücke hinweg zu ermöglichen. Das zugegebene SSB ist gegebenenfalls nicht kontinuierlich an der DNA gebunden, sondern bewegt sich in einem Gleichgewicht zwischen Bindung und Diffusion, oder MutS schiebt den SSB-Komplex während des *sliding*-Mechanismus von der DNA runter, danach könnte der Komplex wieder an den Einzelstrang binden. Eine andere Erklärung wäre, dass der MutHLS-Mechanismus in der Lage ist, eine physikalische Blockade auf der DNA zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz mit Hilfe eines *looping*-Mechanismus zu überwinden, dass allerdings bedingt durch die Geometrien des Substrates die *loop*-Bildung gestört wird und deshalb kein optimales Ergebnis zu beobachten ist. In den folgenden Experimenten sollte mit einer stabileren Blockade auf der DNA gearbeitet werden. Mit Hilfe eines Primers wurden in das Substrat zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz zwei Biotine eingebracht. Die Blockade bildet dann ein gebundenes Streptavidinmolekül (Herstellung siehe 2.5.6.2.). Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ist eine der stärksten bekannten nicht kovalenten Bindungen mit einer Dissoziationskonstanten von  $K_d = 4 \times 10^{-14} \text{ M}$ , der Komplex (Biotin-Streptavidin) bildet sich sehr schnell aus und ist in einem großen pH- und Temperaturbereich stabil (Holmberg, 2005). Die Blockade sollte also sehr stabil sein. Durch die Modifikation der DNA mit einem 3' oder 5'-Biotin wird das Laufverhalten im Gel nicht gravierend verändert. Die Bindung des Streptavidinmoleküls an das Biotin verlangsamt allerdings durch seine Masse das Laufverhalten der DNA. Durch das veränderte Laufverhalten ergibt sich eine gute

Kontrolle, um sicherzustellen, dass die Blockaden auch nach der Spaltung noch an den richtigen Positionen sitzen. Das Substrat hat eine Gesamtlänge von 406 bp, der Abstand zwischen der GATC-Erkennungssequenz und der Basenfehlpaarung (D2) beträgt 176 bp und die GATC-Erkennungssequenz ist 117 bp von der Blockade entfernt. Die Herstellung des Substrates wurde durch die Hybridisierung von vier verschiedenen DNA-Stücken erreicht: ein PCR-Produkt für den oberen Strang, ein PCR-Produkt und zwei Oligonukleotide (34 nt und 42 nt) für den unteren Strang des Substrates.

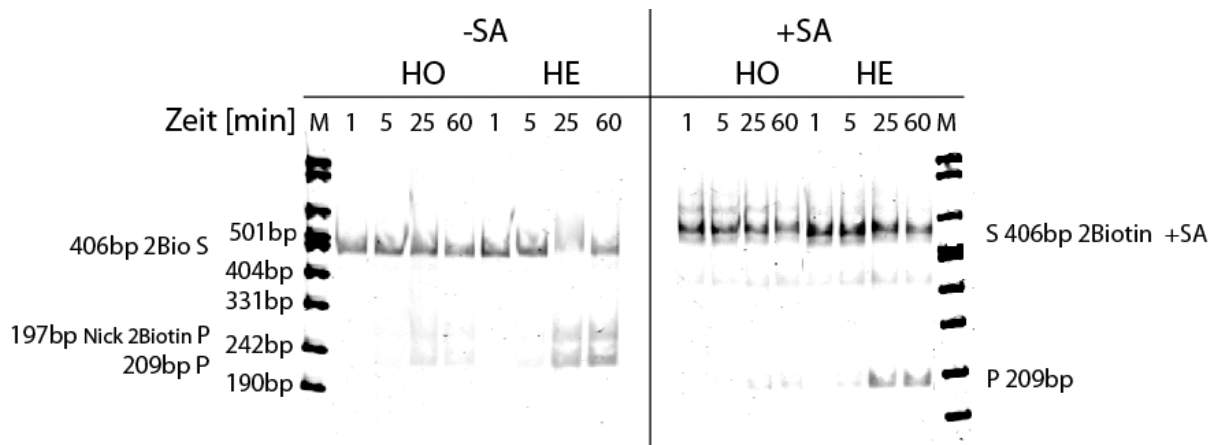


**Abb. 3-36: DNA-Substrat mit Streptavidin zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz**

D1 bezeichnet den DNA-Abschnitt vom 5'-Ende des oberen Strangs bis zum G der GATC-Erkennungssequenz, D2 ist der Abschnitt zwischen der GATC-Erkennungssequenz und der Basenfehlpaarung und D3 bezeichnet den Abschnitt von der Basenfehlpaarung bis zum 3'-Ende des oberen DNA-Strangs. Die GATC-Erkennungssequenz ist als blaues Quadrat dargestellt. Der Abstand vom G der GATC-Erkennungssequenz bis zu der Blockade beträgt 117 bp. Die Blockade besteht aus einer 4 bp-Lücke und einem Streptavidinmolekül (SA). Von der Blockade bis zur Basenfehlpaarung sind es 54 bp. Von der Basenfehlpaarung bis zum 3'-Ende des oberen Strangs sind es 21 bp.

Abbildung 3-37 zeigt die MutS, -L-induzierte Spaltaktivität der MutH-Endonuklease, jeweils am Homo- und Heteroduplex, mit und ohne Streptavidin. Das Substrat mit der Blockade zeigt bessere Spaltung als das dazugehörige Homoduplex-Substrat. Die MutH-Endonuklease wird trotz der Blockade von MutS, -L aktiviert.



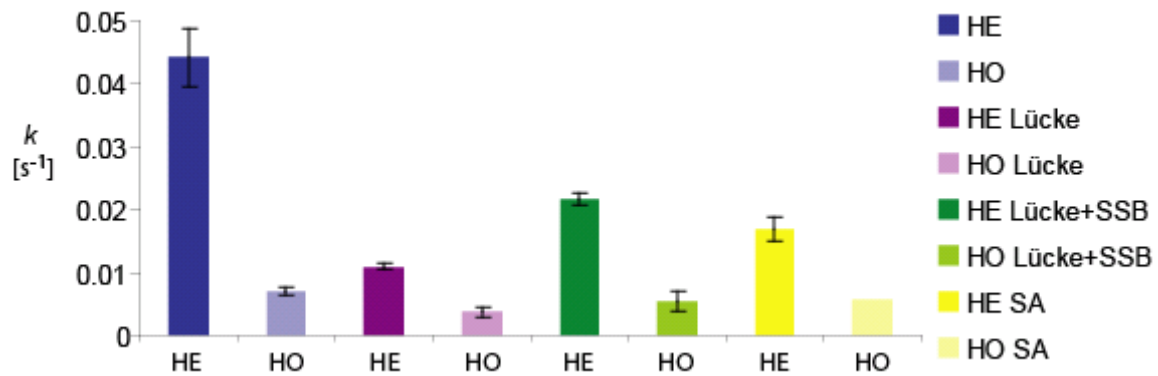


**Abb. 3-37: Spaltung eines DNA-Substrates mit und ohne Streptavidin-Blockade**

Die Reaktion wurde in 1x Puffer gelb, mit 125 mM KCl bei 37 °C durchgeführt. Von MutH und MutS wurden jeweils 0,5 µM, 1 µM MutL und 10 nM DNA eingesetzt. Nach den angegebenen Zeiten (1, 5, 25, 60 min) wurden jeweils 10 µl-Aliquots mit 2,5 µl 5x AAP abgestoppt. Polyacrylamidgel (6 %), mit Ethidiumbromid gefärbt.

M, Marker (pUC Mix Marker 8); S, Substrat; P, Spaltprodukt; SA, Streptavidin.

Die Geschwindigkeitskonstante der Kinetik liegt bei  $0.017 \text{ s}^{-1}$ , das Substrat ohne Blockade wurde mit einer Geschwindigkeit von  $0.044 \text{ s}^{-1}$  gespalten. Damit wird die Spaltung durch die Blockade um ca. 60 % inhibiert. Das Diagramm in Abbildung 3-38 zeigt den Vergleich der verschiedenen Blockaden. Die Blockade in Form einer Lücke inhibiert die Aktivierung der MutH-Endonuklease am stärksten, am schwächsten inhibiert die Lücke mit gebundenem SSB. Trotz der Inhibition war die Spaltaktivität mit den Blockaden Lücke und Lücke gefüllt mit SSB dreimal oder bei Einsetzen einer Blockade aus Streptavidin sogar dreieinhalbmal höher, als die Spaltaktivität bei dem Einsetzen der entsprechenden Homoduplices.



**Abb. 3-38: Die Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen MutH-Spaltkinetiken**

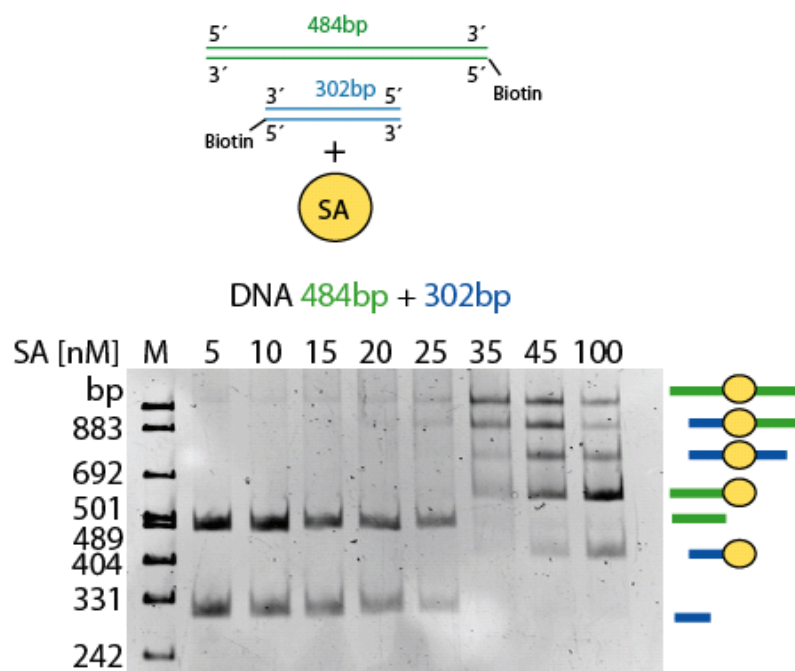
Der Heteroduplex, ohne Blockade (dunkelblau) mit einer Gesamtlänge von 406 bp, wurde mit der Geschwindigkeitskonstante ( $k$ ) = 0.044  $s^{-1}$  gespalten. Der Homoduplex ohne Blockade (hellblau), mit einer Gesamtlänge von 406 bp, wurde mit  $k$  = 0.007  $s^{-1}$  gespalten. Der Heteroduplex mit einer Blockade Lücke (lila) wurde mit  $k$  = 0.012  $s^{-1}$  und der Homoduplex mit einer Blockade Lücke (rosa) mit  $k$  = 0.004  $s^{-1}$  gespalten. Der Heteroduplex mit einer Blockade Lücke gefüllt mit SSB (grün) wurde mit  $k$  = 0.021  $s^{-1}$  und der passende Homoduplex (hellgrün) mit  $k$  = 0.006  $s^{-1}$  gespalten. Das Substrat mit der Blockade aus Streptavidin (gelb) wurde mit  $k$  = 0.017  $s^{-1}$  und der zugehörige Homoduplex (hellgelb) mit  $k$  = 0.006  $s^{-1}$  gespalten.

Alle in Abbildung 3-38 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten zeigen eine Inhibition der Aktivierung von MutH durch Blockaden, ein Teil des Signals wird allerdings trotz der Blockade weitergeleitet. Ist es der eine kontinuierliche DNA-Strang, der eine Aktivierung trotz der Blockaden ermöglicht? Sind die Blockaden ausreichend, um die Diffusion von MutS entlang der DNA-Helix-Struktur zu verhindern?

### 3.7.2. Blockade aus einem Doppelstrangbruch und einem Streptavidin unterbricht die Kopplung von *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung

Alle Blockaden, die bisher getestet wurden, hatten die Gemeinsamkeit, dass sie einen kontinuierlichen DNA-Strang besitzen. Verglichen mit anderen Arbeiten (Pluciennik, 2007; Wang, 2004) waren die Abstände zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz (D2) recht kurz (176 bp), wenn man von einem *looping*-Mechanismus und von einem möglichen Abstand zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz von 1000 bp ausgeht. In der Folge wurde getestet, ob ein Substrat mit einem Doppelstrangbruch zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz gespalten werden kann. Das Substrat setzt sich aus zwei verschiedenen DNA-Molekülen zusammen, eines trägt den *mismatch* und eine GATC-Erkennungssequenz, das andere DNA-Stück hat eine andere Länge und die Sequenz besitzt keinen *mismatch*. Es wurden zwei unterschiedlich lange DNA-Substrate verwendet, die jeweils an einem 5'-Ende

eine, über Primer eingeführte, Biotinylierung tragen. Bei der Zugabe von Streptavidin findet die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin statt. Streptavidin besitzt zwar vier Bindungsstellen für Biotin, aber aufgrund der sterischen Anordnung binden überwiegend nur zwei biotinylierte DNAs an ein Streptavidin-Molekül. Gebunden werden entweder zwei lange DNAs, zwei der kurzen oder das gewünschte Produkt, ein kurzes und ein langes DNA-Stück (Abbildung 3-39). Um herauszufinden, welche Konzentrationsverhältnisse von DNA zu Streptavidin eingesetzt werden müssen, um die beste Ausbeute des Produktes, zwei unterschiedlich lange DNA-Moleküle überbrückt mit einem Streptavidin, zu erhalten, wurden mehrere Bindungsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von Streptavidin durchgeführt. Die kurze DNA wurde zuerst mit Streptavidin für 30 min bei RT inkubiert, damit möglichst kein freies Streptavidin mehr in der Lösung war, anschließend wurde die zweite DNA dazu gegeben. In allen Ansätzen befanden sich zusätzlich zu dem gewünschten DNA-Produkt noch zwei gleiche DNAs, gekoppelt über ein Streptavidin oder eine DNA mit einem Molekül Streptavidin.



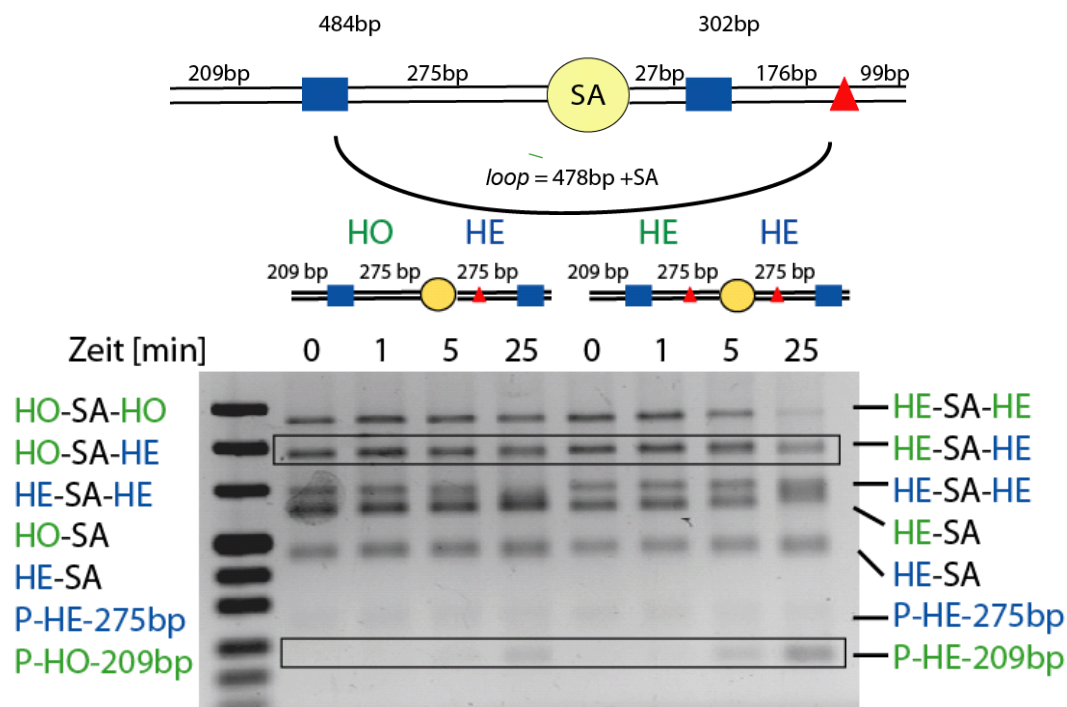
**Abb. 3-39: DNA-Streptavidin-Bindungsexperiment**

Die Proben enthalten zwei unterschiedlich lange DNAs (484 bp und 302 bp), die jeweils an ihrem 5'-Ende eine Biotinmodifikation tragen. Es wurden jeweils 15 nM pro DNA, 1x Puffer gelb und verschiedene Konzentrationen von Streptavidin eingesetzt.

M, Marker (pUC 8 Mix Marker); SA, Streptavidin; Polyacrylamidgel (5 %) mit Ethidiumbromid gefärbt

Das erste Substrat setzt sich zusammen aus einer 484 bp langen DNA ohne eine Basenfehlpaarung mit einer GATC-Erkennungssequenz (HO) sowie einem 302 bp langen

Substrat mit Basenfehlpaarung (HE) und einer zweiten internen Kontroll-GATC-Erkennungssequenz, an der die direkte Aktivierung von MutH, nicht über die Blockade, stattfinden kann. Allerdings wird die Spaltaktivität in diesem Fall, aus Gründen der Geometrie des 302 bp langen DNA-Substrates, eher gering sein, was auf den sehr kurzen Abstand D1 (= 27 bp) zurückzuführen ist (siehe 3.2.). Der Abstand zwischen *mismatch* und der Erkennungssequenz hinter der Blockade beträgt 374 bp plus die Größe des Streptavidinmoleküls (siehe Abbildung 3-40). Zum direkten Vergleich wurde eine Kinetik mit einem Substrat gemacht, auf dem beide DNA-Stücke eine Basenfehlpaarung tragen (HE/HE) (rechte Kinetik), sodass die Aktivierung von MutH an beiden Erkennungssequenzen nicht über die Blockade hinweg stattfinden muss. Für das DNA-Substrat HO/HE zeigt das Entstehen des 209 bp langen Spaltproduktes (schwarz eingrahmt) die Aktivierung von MutH über die Blockade hinweg an.



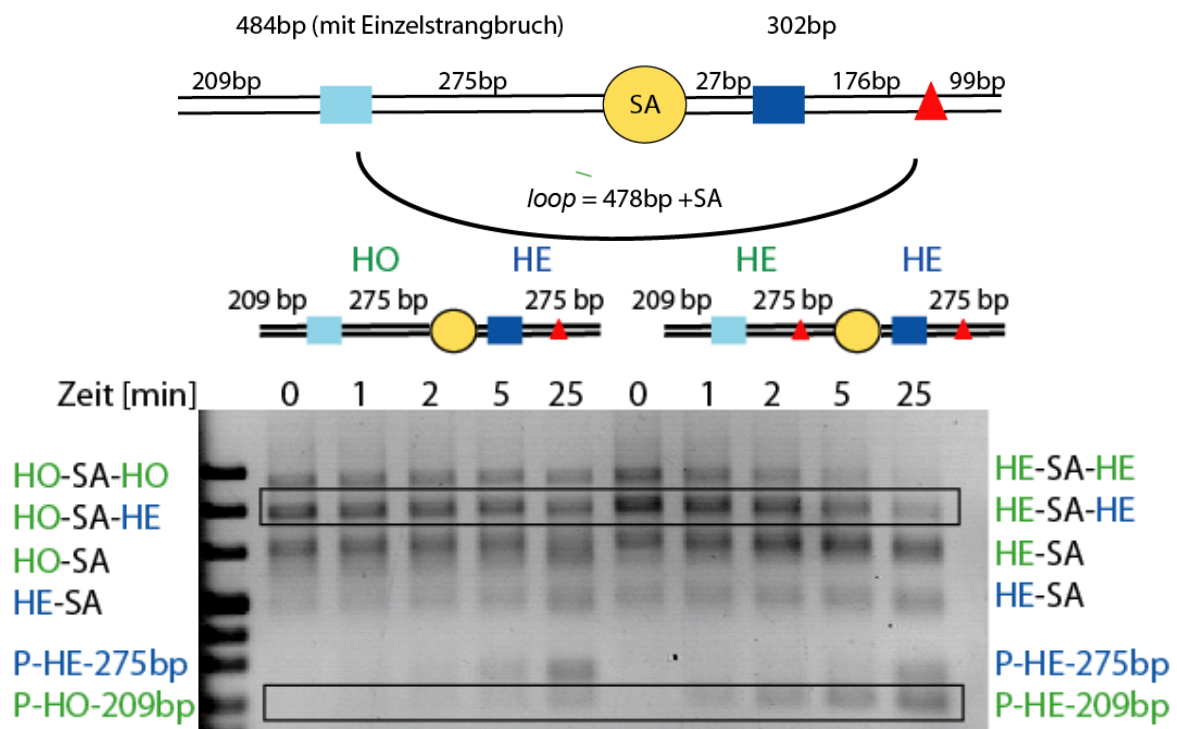
**Abb. 3-40: Zwei Spaltkinetiken der verschiedenen über Streptavidin vernetzten Substrate**

Das Gel zeigt die Spaltkinetik mit den Substraten 484 bp als Homoduplex (HO) oder Heteroduplex (HE) und der zweiten DNA, die 302 bp lang ist. Es wurden 500 nM MutS, 1  $\mu$ M MutL, 0.5  $\mu$ M MutH, 140 mM KCl, 24 nM Streptavidin (SA) und von beiden DNA-Substraten jeweils 10 nM eingesetzt. Die Reaktion wurde in 1x Puffer gelb durchgeführt. MutL und MutH wurden vor Beginn der Reaktion mit 1 mM ATP inkubiert. Nach 1, 2, 5 und 25 min wurden 10  $\mu$ l der Probe mit 2  $\mu$ l 5x AAP gestoppt. Agarosegel (2 %), 1x TPE, mit Ethidiumbromid gefärbt

Mit diesem Substrat findet keine Aktivierung über die Blockade hinweg statt. Erst nach 25 min entsteht eine schwache Bande des 209 bp langen Produktes, diese geringe Spaltung ist

auf *mismatch*-unabhängige Homoduplex-Spaltung zurückzuführen. Auf dem rechten Gel entsteht die gleiche Produktbande schon nach 5 min, was zeigt, dass die Aktivierung von MutH ohne Überbrückung der Blockade deutlich effektiver ist.

Für die folgenden Experimente wurde die Position der Basenfehlpaarung und damit die Distanz, über die die Aktivierung stattfinden muss, von 374 bp auf 478 bp verlängert. Ziel war es, die eventuelle Ausbildung eines *loops* für den MutHLS-Mechanismus noch zu verbessern. Dafür wurde die Position des Biotins verändert, wodurch sich nach Zugabe von Streptavidin die Geometrie des Substrates (Abbildung 3-41) ändert. Außerdem wurde die GATC-Erkennungssequenz hinter der Blockade (hellblau) schon durch die Nickase Nt.AlwI in einem Strang vorgespalten (siehe 3.3.), so dass schon ein zweiter *nick* durch MutH ausreichend war, um einen Doppelstrangbruch zu erzeugen (siehe 3.3.). Das gewünschte Substrat mit dem zugehörigen Spaltprodukt wurde im Gelbild markiert.



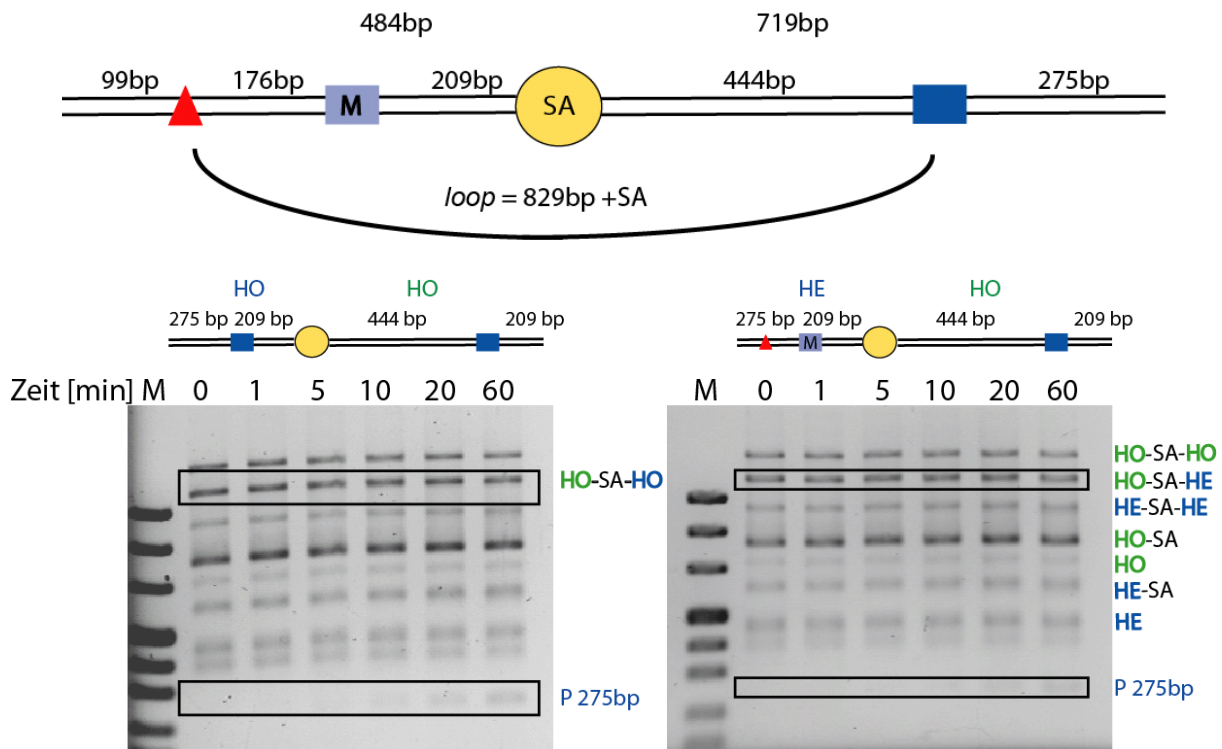
**Abb. 3-41: Zwei Spaltkinetiken mit den über Streptavidin vernetzten Substraten**

Die beiden DNA-Substrate in dieser Reaktion sind 484 bp und 302 bp lang, das 484 bp lange Substrat wurde mit der Nickase Nt.AlwI vorbehandelt. Die Reaktion wurde in 1x Puffer gelb mit 0.5  $\mu$ M MutS, 1  $\mu$ M MutL, 0.5  $\mu$ M MutH, 140 mM KCl, 1 mM ATP, jeweils 20 nM DNA und 24 nM Streptavidin (SA) durchgeführt, 10  $\mu$ l der Reaktion wurden nach den jeweiligen Zeitwerten in 2  $\mu$ l 5x AAP gestoppt.

M, Marker pUC8 Mix Marker. Agarosegel (2 %) mit Ethidiumbromid gefärbt

Auch bei diesem Substrat findet keine MutS, -L aktivierte Spaltung von MutH über die Blockade hinweg statt. Das 209 bp-Produkt entsteht erst nach 25 min und wieder kann nur Homoduplex-Spaltung detektiert werden.

Für die Ausbildung von DNA-*loops* spielt die Beweglichkeit/Elastizität der DNA eine wichtige Rolle. DNA-*loops* können in zwei Kategorien aufgeteilt werden: „short and energetic, and long or entropic“ (Saiz & Vilar, 2006). Das Streptavidinmolekül zwischen *mismatch* und GATC-Erkennungssequenz kann die Beweglichkeit der DNA und damit die Möglichkeit, einen *loop* auszubilden, erheblich beeinflussen, innerhalb einer kurzen Sequenz (entsprechend der Persistenzlänge ~150 bp) ist der Einfluss wahrscheinlich größer, als innerhalb einer sehr langen Sequenz (~ 1000 bp). Da bekannt ist, dass das MMR am besten zwischen Entfernungen von bis zu 1000 bp arbeitet, wurde für das nächste DNA-Substrat ein Abstand von etwas weniger als 1000 bp zwischen Fehlpaarung und Erkennungssequenz gewählt. Um diesen Abstand zu erreichen und keine zweite spaltbare GATC-Erkennungssequenz mehr auf der DNA zu haben, wurde die GATC-Erkennungssequenz auf dem DNA-Molekül mit der Basenfehlpaarung methyliert. Damit wird nur Spaltung detektiert, wenn MutH von MutS, -L über die Blockade hinweg aktiviert wird. Die Distanz zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz betrug 829 bp plus die Größe des Streptavidinmoleküls und die Gesamtlänge des Substrates wurde auf 1203 bp vergrößert. Diese Distanzen sollten für die Ausbildung eines *loops* optimal sein. Das Spaltprodukt hatte eine Länge von 275 bp.



**Abb. 3-42: Spaltkinetiken mit dem methylierten DNA-Substrat**

Reaktion durchgeführt in 1x Puffer gelb mit 1 mM ATP, 140 mM KCl, 0.5  $\mu$ M MutS 1  $\mu$ M MutL, 0.5  $\mu$ M MutH, 24 nM Streptavidin (SA) und jeweils 20 nM der DNA. 10  $\mu$ l der Reaktion wurden in 2  $\mu$ l 5x AAP gestoppt.

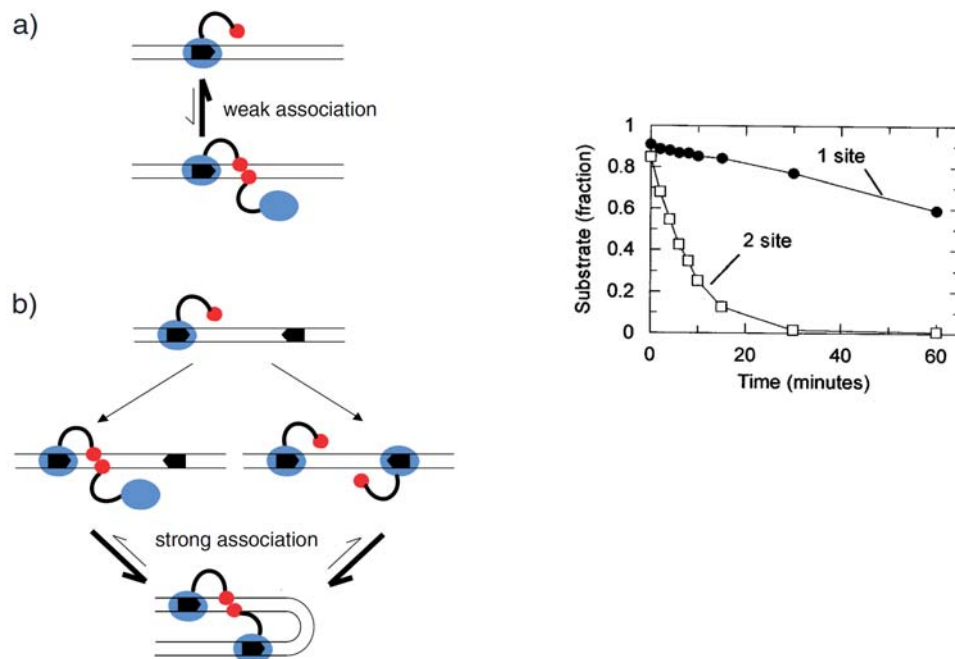
M, Marker pUC 8 Mix Marker; Agarosegel (2 %), 1x TPE, mit Ethidiumbromid gefärbt

Das rechte Gelbild in Abbildung 3-42 zeigt, dass auch nach 60 min nur sehr wenig Produkt (275 bp) vorhanden ist. Die Kontrolle auf dem linken Gelbild mit zwei verknüpften Homoduplexen zeigt die gleiche Intensität des 275 bp-Produktes. Das beweist, dass die Spaltprodukte durch mismatch-unabhängige-Spaltung von MutH entstanden sind. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Aktivierung der MutH-Endonuklease durch MutS über diese Form einer Blockade nicht möglich ist. Möglicherweise wird für die Aktivierung über eine Blockade hinweg ein kontinuierlicher DNA-Strang benötigt.

### 3.7.3. Über Streptavidin verbrückte Substrate sind für einen *looping*-Mechanismus geeignet

Können auf den Substraten aus dem vorherigen Abschnitt DNA-loops ausgebildet werden? Oder behindert die Verknüpfung der DNA-Moleküle über ein Streptavidinmolekül die für den *loop* benötigte Biegung der DNA?

Um zu zeigen, dass die DNA aus 3.7.2. ein geeignetes Substrat für eine *looping*-Reaktion sein kann, wurde ein Spaltungstest mit den Typ-II-Restriktionsenzymen FokI und NgoMIV durchgeführt.

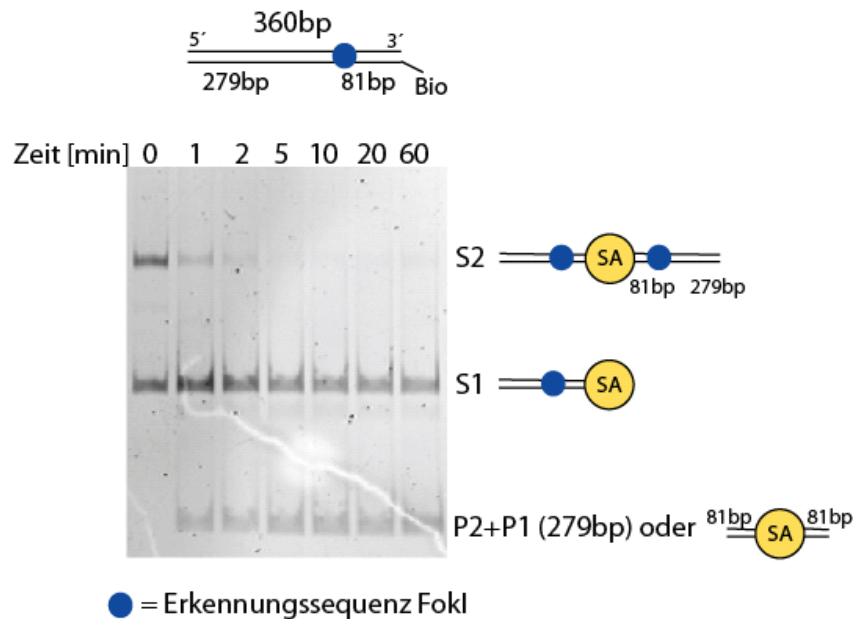


**Abb.3-43: Abbildung a) und b) aus Catto, 2006, Kurvendiagramm aus Halford, 2004**

Die Abbildungen a) und b) zeigen schematisch die Spaltung von FokI auf DNA-Substraten mit einer Erkennungssequenz (a) und mit zwei Erkennungssequenzen (b). Blaues Oval, N-terminale DNA-Bindungsdomäne von FokI; roter Zirkel, C-terminale, katalytische Dimerisierungs-Domäne; schwarz, Linker zwischen den beiden Domänen; In (a): ein Monomer von FokI bindet an die Erkennungssequenz und assoziiert nur schwach mit einem zweiten Monomer. In (b): die DNA mit einem gebundenen Monomer FokI besitzt noch eine zweite Erkennungssequenz, auf der ein zweites Monomer binden kann. Die zwei FokI-Monomere verbinden sich zu einem Dimer und die dazwischenliegende DNA wird zu einem *loop* geformt. Das rechte Kurvendiagramm zeigt die Spaltung von FokI auf einem Plasmid mit einer (gefüllte, schwarze Kreise) oder zwei Erkennungssequenzen (weiße Quadrate).

FokI ist ein Typ-II-Restriktionsenzym, welches das Substrat in *cis*, also mit zwei Erkennungssequenzen auf demselben Molekül, schneller spaltet als eines mit nur einer Erkennungssequenz (Halford *et al.*, 2004). Die Ausbildung eines *loops* der DNA zwischen den beiden Erkennungssequenzen macht dabei die Spaltung deutlich schneller (Halford, 2000).





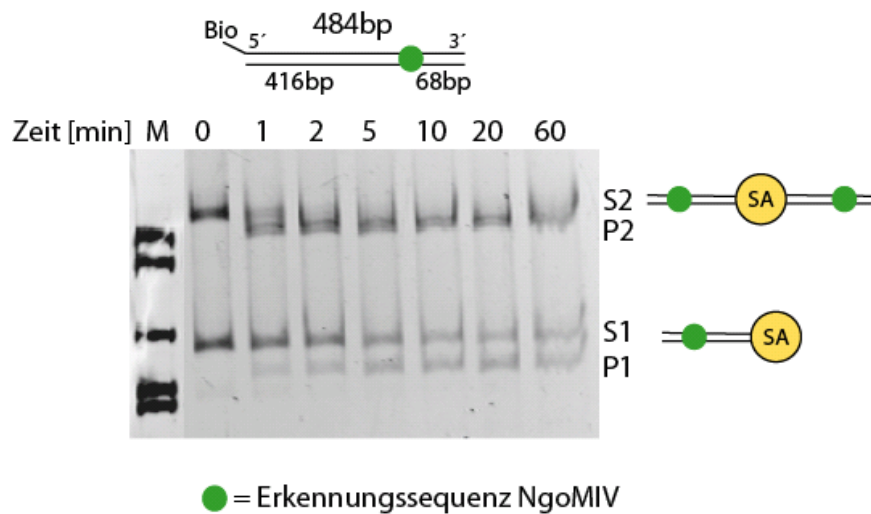
**Abb. 3-44: Spaltung eines 360 bp langen Substrates mit dem Restriktionsenzym FokI**

In der Reaktion wurden 10 nM DNA, 12 nM Streptavidin (SA), 14 mU FokI (NEB) in 1x Puffer NEBuffer 3 bei 37 °C durchgeführt und auf einem Polyacrylamidgel (6 %) analysiert. Die Proben wurden mit 2 µl 5x AAP nach den angegebenen Zeitwerten gestoppt.

S1, Substrat mit einer FokI-Erkennungssequenz; S2, Substrat mit zwei Erkennungssequenzen; P2, 279 bp langes Spaltprodukt nach Spaltung des Substrates S1; P1, 81 bp langes Spaltprodukt nach Spaltung des Substrates S2

Das für die Spaltung verwendete Substrat (360 bp) besitzt eine FokI-Spaltstelle. Mit Hilfe einer 5'-Biotinylierung an einem DNA-Ende kann bei Zugabe von Streptavidin ein Teil der DNA-Moleküle gekoppelt werden, so dass Substrate mit zwei Erkennungssequenzen entstehen. Die Konzentration von Streptavidin wurde so optimiert, dass ungefähr die Hälfte der DNA einzeln mit einem Streptavidinmolekül gebunden und die andere Hälfte aus zwei DNA-Molekülen über ein Streptavidin miteinander verbrückt vorlag. Abbildung 3-44 zeigt das Ergebnis der Spaltung. Die Substratbande (S2) verschwindet schneller und schließlich vollständig, im Gegensatz zur Substratbande (S1); das Substrat mit zwei Erkennungssequenzen wird schneller gespalten als das mit nur einer Erkennungssequenz. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die über Streptavidin verknüpfte DNA gut für einen *looping*-Mechanismus geeignet ist, obwohl die *loop*-Größe in diesem Fall nur 162 bp plus das Streptavidinmolekül umfasst. Die gleiche Kontrolle wurde mit dem Typ-II-Restriktionsenzym NgoMIV durchgeführt (Katiliene *et al.*, 2003). Das Substrat hatte eine Länge von 484 bp, im Komplex mit Streptavidin umfasst die Geometrie eines möglichen *loops* 832 bp plus das Streptavidinmolekül. Abbildung 3-45 zeigt das Ergebnis der Spaltungen. Innerhalb der ersten Minute wurden bereits 60 % des Substrates mit zwei NgoMIV-Erkennungssequenzen gespalten, nach 2 Minuten bereits 95 %. Durch Spaltung mit

einer NgoMIV-Erkennungssequenz entstanden nach 1 min erst 10 % des Spaltproduktes und nach 60 min wurden erst 60 % des Substrates gespalten.



**Abb. 3-45: Spaltung mit NgoMIV**

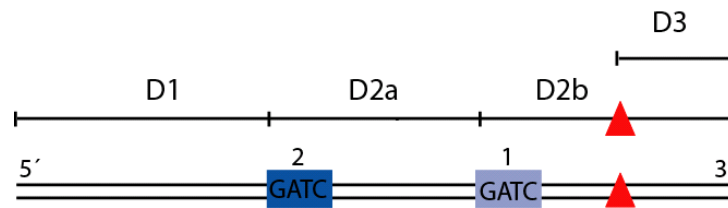
Die Reaktion wurde mit 10 nM DNA, 12 nM Streptavidin (SA), NgoMIV (1.3 *units*) in 1x NEBuffer 3 bei 37 °C durchgeführt, nach den Zeitpunkten 1, 2, 5, 10, 20, 60 min 10µl in 2 µl AAP gestoppt und auf ein Polyacrylamidgel (6 %) aufgetragen. S1, Substrat mit nur einer Erkennungssequenz für NgoMIV; S2, Substrat mit zwei Erkennungssequenzen für NgoMIV; P1, Produkt nach der Spaltung von S1; P2, Produkt nach der Spaltung von S2 an beiden Erkennungssequenzen; M, Marker pUC8 Mix Marker

Auch die Ergebnisse mit dem Restriktionsenzym NgoMIV deuten darauf hin, dass die verwendeten DNA-Substrate für einen *looping*-Mechanismus gut geeignet sind.

### 3.8. Ein aktiviertes MutS „scannt“ die DNA nicht systematisch nach GATC-Erkennungssequenzen ab

Das *sliding clamp*-Modell schlägt vor, dass MutS nach der Erkennung der Basenfehlpaarung diese zusammen mit MutL verlässt und entlang der DNA-Helix bis zur GATC-Erkennungssequenz diffundiert, dort findet die Aktivierung der Endonuklease MutH statt. Bei einem solchen Mechanismus hätte MutS während der Bewegung in Richtung einer GATC-Erkennungssequenz kontinuierlichen Kontakt zur DNA. Wenn auf der DNA mehrere GATC-Erkennungssequenzen lokalisiert sind, dann sollte die Aktivierung an der Erkennungssequenz stattfinden, die sich am nächsten an der Basenfehlpaarung befindet. Erfolgt die Aktivierung von MutH mit Hilfe eines *looping*-Mechanismus, dann spielen verschiedenen Faktoren wie die Art des Substrates (linear oder zirkulär), der Abstand der Fehlpaarung zur GATC-Erkennungssequenz und die Gesamtlänge des Substrates eine Rolle. In den folgenden Experimenten wurden lineare DNA-Substrate mit jeweils zwei GATC-Erkennungssequenzen hergestellt und die Spaltgeschwindigkeit an den einzelnen Erkennungssequenzen mit Hilfe

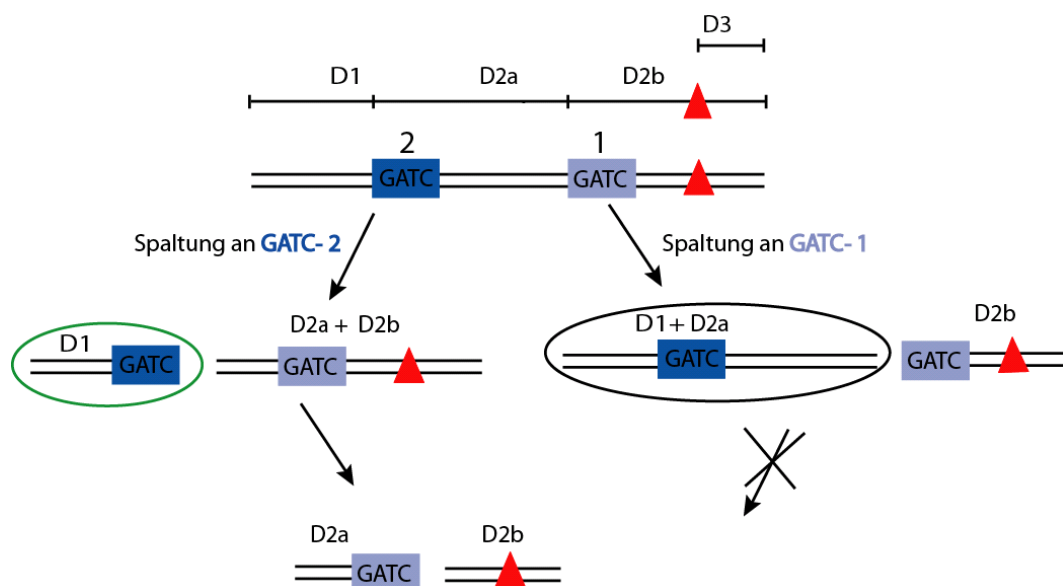
von Kinetiken analysiert. Die zusätzlichen GATC-Erkennungssequenzen wurden über zielgerichtete Mutagenese eingeführt (Thomas, 2000). Die Positionen der neu eingeführten GATC-Erkennungssequenzen befanden sich 20 bp, 40 bp und 80 bp von der Basenfehlpaarung entfernt. Da flankierende Sequenzen einen Einfluss auf die Spaltaktivität von MutH haben können, wurden BamHI-Sequenzen (GGATCC) verwendet. Um zu testen, ob die Position der Sequenz, bezogen auf die Gesamtlänge einer DNA, auch Effekte auf die Spaltaktivität an der jeweiligen GATC-Erkennungssequenz zeigt, wurden verschieden lange DNA-Substrate verwendet (484 bp, 406 bp und 302 bp). Wenn von einem einfachen *looping*-Mechanismus ausgegangen wird, bei dem eine zweite Bindung eventuell mittels eines „Greifens“ nach der DNA hinter der GATC-Erkennungssequenz durch MutL oder MutS stattfindet, sollte die Länge der DNA nach der GATC-Erkennungssequenz bis zum DNA-Ende einen Einfluss auf die Spaltaktivität haben. DNAs die länger sind als ihre Persistenzlänge ( $\approx 150$  bp) können sich spontan biegen und brauchen dafür relativ wenig Kraft. Kürzere DNAs liegen eher linear vor und ihre Biegung erfordert mehr Kraft (Cloutier & Widom, 2005). Bewegt sich MutS bidirektional von der Basenfehlpaarung weg, dann könnte auch die Länge der DNA-Sequenz hinter der Basenfehlpaarung einen Einfluss auf die Spaltaktivität an den verschiedenen GATC-Erkennungssequenzen haben. Es wurde in vorangegangenen Experimenten bereits gezeigt, dass der Abstand D1 bei Substraten mit einer GATC-Erkennungssequenz einen sehr großen Einfluss auf die Spaltaktivität hat. Verkürzt man hingegen den Abstand D3, ist die Inhibition auf die Spaltung von MutH wesentlich geringer, aber eine Inhibition ist auch hier zu beobachten (siehe 3.2.). Bisher konnte allerdings nicht geklärt werden, was genau ein zu nahes DNA-Ende bewirkt und warum es den Mechanismus der Aktivierung stört. Deshalb wurden die Längen von der GATC-Erkennungssequenz bis zum DNA Ende (D1) und die Länge von der Basenfehlpaarung zum Ende (D3) variiert. Der Vorteil von Substraten mit zwei GATC-Erkennungssequenzen ist, dass immer die Möglichkeit des direkten Vergleichs der Spaltungsintensitäten an den verschiedenen Positionen besteht.



**Abb. 3-46: 484 bp langes *mismatch*-Substrat mit zwei GATC-Erkennungssequenzen und Kennzeichnung der einzelnen Abschnitte**

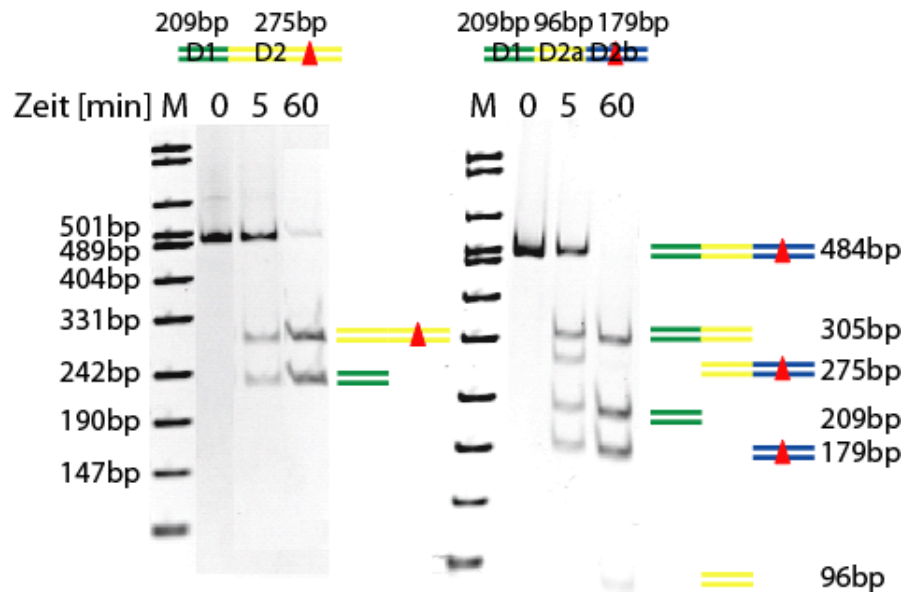
D1, Abstand zwischen der zweiten GATC-Erkennungssequenz und der Basenfehlpaarung; D2a, Abstand zwischen der ersten und zweiten GATC-Erkennungssequenz; D2b, Abstand zwischen der ersten GATC-Erkennungssequenz und dem 3'-Ende des oberen Stranges; D3, Abstand von der Basenfehlpaarung bis zum 3'-Ende des oberen Stranges.

Durch das Einfügen einer zweiten GATC-Erkennungssequenz in dem Substrat wird die Anzahl der Spaltprodukte erhöht. Die Auswertung wird damit komplexer. Das Spaltprodukt (D2a + D1) ist ein Indikator für die Spaltung an der ersten GATC-Erkennungssequenz (hellblau), dieses Spaltprodukt kann nicht weiter gespalten werden, da es keine Basenfehlpaarung trägt, wodurch es eine interne Homoduplex-Kontrolle darstellt. Das Spaltprodukt (D1) ist ein Indikator für die Spaltung an der zweiten GATC-Erkennungssequenz (dunkelblau). Bei der Auswertung wurden die Intensitäten dieser beiden Banden verglichen (siehe Abbildung 3-47).



**Abb. 3-47: Spaltschema für Kinetiken mit zwei GATC-Erkennungssequenzen**

Abbildung 3-48 zeigt die Spaltung einer *mismatch*-DNA mit einer GATC-Erkennungssequenz und die Spaltung einer *mismatch*-DNA mit zwei GATC-Erkennungssequenzen, die Kinetiken wurden vergleichend nebeneinander abgebildet.



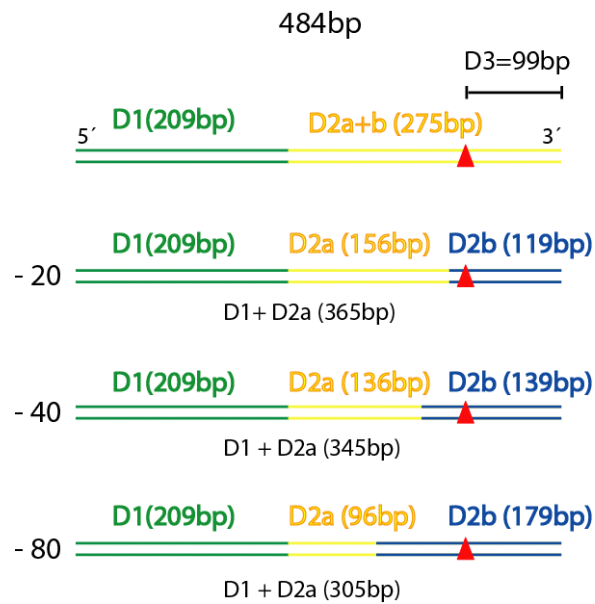
**Abb. 3-48: MutS, -L induzierte Spaltung von MutH**

Links, 484 bp langes Substrat mit einer GATC-Erkennungssequenz; rechts, 484 bp langes Substrat mit zwei GATC-Erkennungssequenzen (176 bp und 80 bp von der Basenfehlpaarung entfernt)

Auf den ersten Blick sind die Intensitäten der, nach Spaltung an zwei Erkennungssequenzen entstandenen, Produkte gleich. Für eine exakte Analyse wurde im Folgenden die Spaltung von MutH systematisch mit verschiedenen Substratvariationen untersucht.

### **3.8.1. 484 bp langes Substrat mit zweiter GATC-Erkennungssequenz - 80, 40 oder 20 bp nach der Basenfehlpaarung**

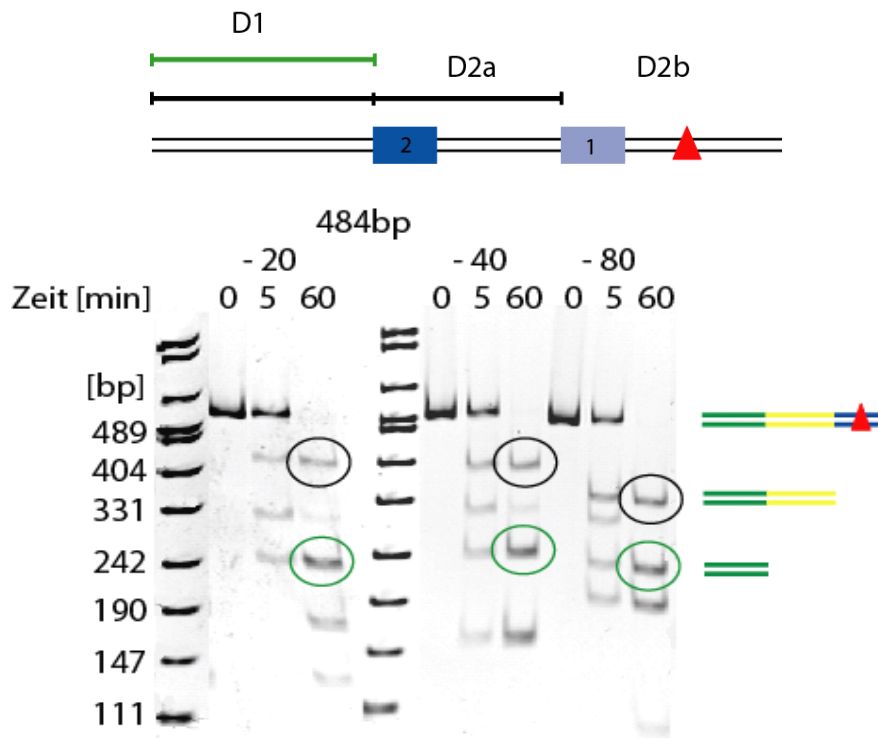
Bei allen für die folgenden Versuche verwendeten DNA-Substraten blieb die Position einer der beiden GATC-Erkennungssequenzen immer gleich (176 bp vom G/T-mismatch), während die zweite Position variiert wurde (Abstand 80 bp, 40 bp oder 20 bp von der Basenfehlpaarung). Die Längen der einzelnen Abstände sind in Abbildung 3-49 dargestellt.



**Abb. 3-49: Geometrien der 484 bp langen DNA-Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen**

Grün, gelb, blau, nach der Spaltung entstehenden DNA-Fragmente; rot, Basenfehlpaarung; D3, Abstand der Basenfehlpaarung vom 3'-DNA-Ende (99 bp)

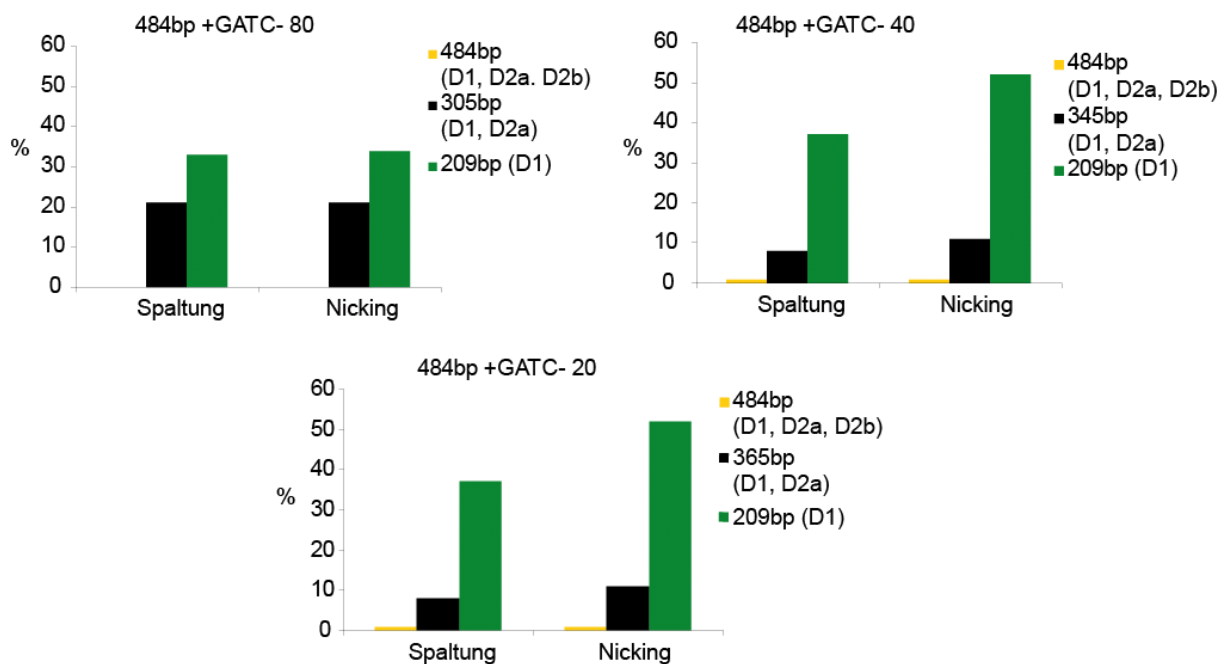
Abbildung 3-50 zeigt die Ergebnisse der Spaltkinetiken. Die beiden Produkte, die für die Auswertung verglichen wurden, sind jeweils mit Schwarz, Spaltung an der GATC-Erkennungssequenz (1), oder mit Grün, Spaltung an der GATC-Erkennungssequenz (2), gekennzeichnet (siehe Abbildung 3-47).



**Abb. 3-50: MutHLS-Spaltkinetiken mit drei verschiedenen Substraten, die jeweils zwei GATC-Erkennungssequenzen enthalten.**

MutS 0.5 nM, MutL 1  $\mu$ M, MutH 0.5 nM, 150 mM KCl, 1 mM ATP in 1x Puffer gelb bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit 10  $\mu$ l in 2  $\mu$ l 5x AAP gestoppt. Polyacrylamidgel (6 %), mit Ethidiumbromid gefärbt

Maßgeblich für den Vergleich der Spaltgeschwindigkeiten an den beiden GATC-Erkennungssequenzen ist das Verhältnis der Spaltprodukte D1 und (D1+D2a). Die Intensitäten dieser Spaltprodukte wurden auf ihre spezifische Länge genormt und die prozentualen Intensitäten in Balkendiagrammen dargestellt (siehe Abbildung 3-51). Um zu sehen, ob eine reine *nicking*-Reaktion von MutH einen Unterschied zur Doppelstrangspaltung macht, wurden die gleichen Experimente zusätzlich mit schon in einem Strang gespaltenen Substraten durchgeführt. Die Substrate zerfallen direkt, wenn MutH an der jeweiligen GATC-Erkennungssequenz den zweiten *nick* setzt (siehe 3.3.). Die Diagramme aus Abbildung 3-51 zeigen allerdings keine Unterschiede im Spaltungsmuster von MutH. Bei allen Spaltungen entsteht immer bevorzugt das 209 bp lange Produkt (grün). Ob Einzel- oder Doppelstrangspaltung, die Spaltpräferenz von MutHLS fokussiert sich immer mehr auf die zweite GATC-Erkennungssequenz, je näher die erste Erkennungssequenz an die Basenfehlpaarung gebracht wird.



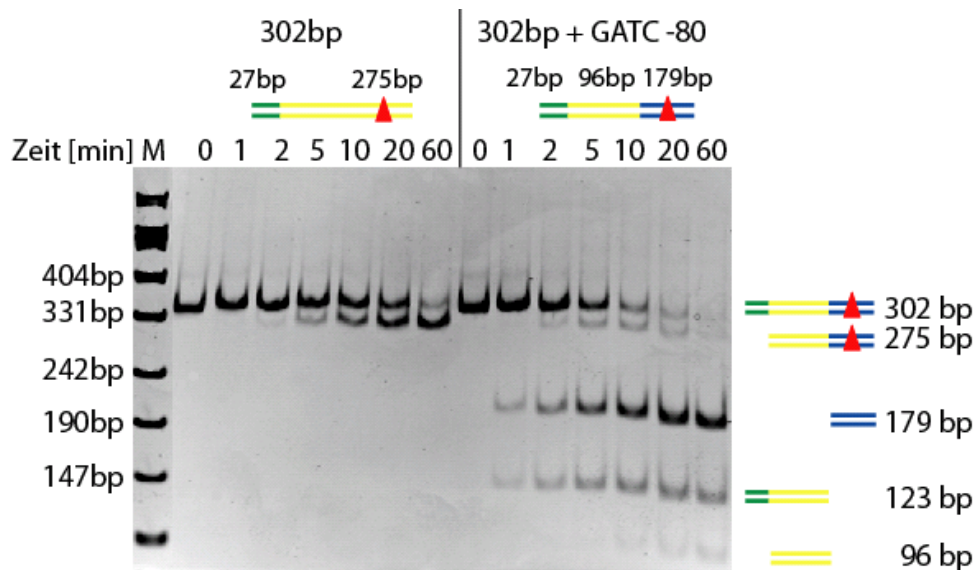
**Abb. 3-51: Intensität der markierten Gelbanden aus Abbildung 3-49 in Prozent**

Orange Balken, Substrat (484 bp); grüne Balken, 209 bp langes Produkt; schwarze Balken, Produkte 305 bp, 345 bp oder 365 bp lang. Die Intensität der Banden wurde mit dem Programm Totallab bestimmt und die Werte wurden auf die jeweiligen DNA Längen abgeglichen.

### 3.8.2. Verkürzen von D1 zu einem 302 bp langen Substrat

Aus vorherigen Versuchen (siehe 3.2.) ist bekannt, dass ein 302 bp langes DNA-Substrat mit einer GATC-Erkennungssequenz, die 27 bp vom 5'-Ende des oberen Stranges positioniert ist, nur noch mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k = 0.004 \text{ s}^{-1}$  gespalten wird, während die Geschwindigkeitskonstante bei einem Abstand zum Ende von 209 bp fast zwanzigmal höher war ( $k = 0.073 \text{ s}^{-1}$ ). In die Sequenz des 302 bp langen Substrates wurde eine zweite GATC-Erkennungssequenz eingeführt, um so die Spaltung an zwei Erkennungssequenzen vergleichend messen zu können. Die Position der neuen Erkennungssequenz wurde zur Mitte der DNA hin verschoben, sodass der Abstand zum Ende ( $D1 = 123 \text{ bp}$ ) ausreichend für eine gute Spaltaktivität war. Der Abstand dieser Erkennungssequenz zum *mismatch* betrug 80 bp.





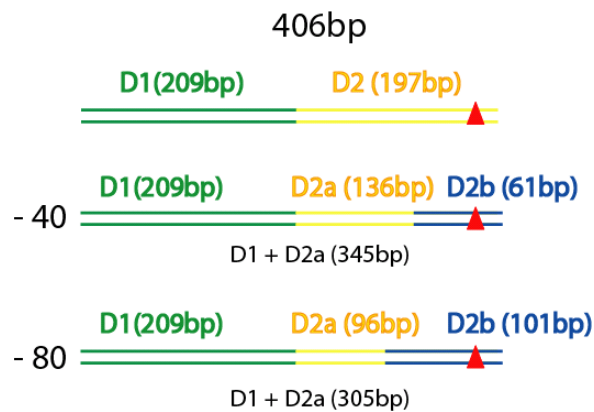
**Abb. 3-52: Spaltaktivität mit 302 bp langer Heteroduplex-DNA mit einer oder zwei GATC-Erkennungssequenzen**

Die Reaktion wurde mit 500 nM MutS, 1  $\mu$ M MutL, 0.5 nM MutH, 1 mM ATP und mit 150 mM KCl, in 1x Puffer gelb bei 37 °C durchgeführt. Jeweils 10  $\mu$ l der Probe wurden zu den oben aufgeführten Zeitpunkten mit 2  $\mu$ l AAP gestoppt. Polyacrylamidgel (6 %) mit Ethidiumbromid gefärbt

Die Geschwindigkeitskonstanten für die beiden in Abbildung 3-52 dargestellten Kinetiken betragen für das 302 bp lange Substrat mit einer GATC-Erkennungssequenz  $k = 0.03 \text{ s}^{-1}$  und für das Substrat mit zwei GATC-Erkennungssequenzen  $k = 0.19 \text{ s}^{-1}$ . Das Substrat (bei gleicher Gesamtlänge und gleichem Abstand vom *mismatch* zum Ende) wird damit durch die zweite GATC-Erkennungssequenz um das ca. 7-Fache schneller gespalten. Nicht die Länge des Substrates, sondern die Position der GATC-Erkennungssequenz dominiert die Spaltgeschwindigkeit.

### 3.8.3. Verkürzen von D3 zu einem 406 bp langen Substrat

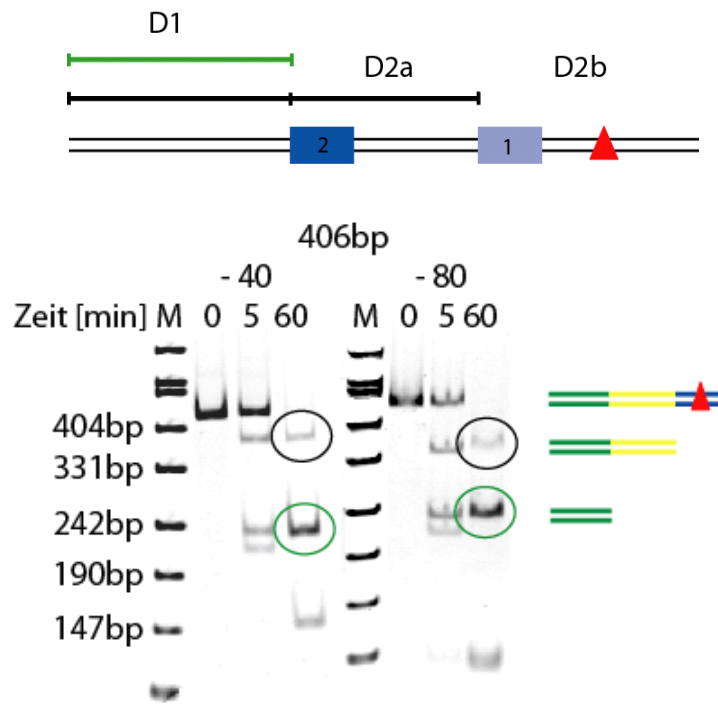
Geht man davon aus, dass sich MutS, ausgehend von einer Fehlpaarung nach der Bindung von ATP, als *sliding clamp* auf der DNA bewegen und somit von den DNA-Enden dissoziieren kann, dann ist zu vermuten, dass der Abstand der Fehlpaarung zum DNA-Ende einen Einfluss auf die Effektivität der nachfolgenden Reaktionen (hier die Aktivierung von MutH) hat. Für Substrate mit einer GATC-Erkennungssequenz ist bekannt, dass ein Verkürzen des Abstands von der Erkennungssequenz bis zum Ende der DNA (D1) wesentlich größere Auswirkung auf die Aktivierung von MutH hat als das Verkürzen des Abstands von der Fehlpaarung zum DNA-Ende (D3) (Jung, Diplomarbeit 2005). Für die folgenden Experimente wurde der Abstand D3 von 99 bp auf 21 bp verkürzt.



**Abb. 3-53: 406 bp lange DNA-Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen**

Die nach der Spaltung durch MutH entstehenden DNA-Fragmente wurden mit verschiedenen Farben dargestellt. Rot, Basenfehlpaarung (21 bp von dem DNA-Ende entfernt)

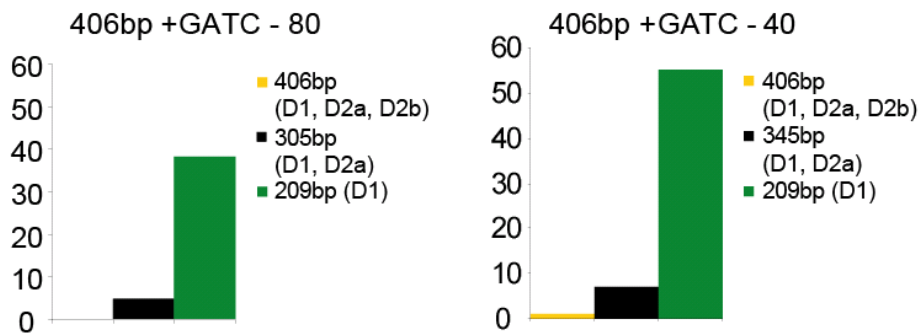
Die zusätzliche GATC-Erkennungssequenz (1) wurde 40 oder 80 bp von der Basenfehlpaarung entfernt positioniert, damit befindet sie sich 101 bp bzw. 61 bp vom 3'-Ende des oberen Stranges entfernt. In dieser Konstellation befinden sich *mismatch* und GATC-Erkennungssequenz nah am DNA-Ende, der Abstand zum 5'-Ende des oberen Stranges ist mit 305 bp bzw. 345 bp so groß, dass er keinen Einfluss auf die Aktivierung der Spaltaktivität von MutH haben sollte.



**Abb. 3-54: Spaltung der 406 bp langen Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen durch MutH**

Links aufgetragen, DNA-Substrat (-40) mit der ersten GATC-Erkennungssequenz 176 bp und mit der zweiten 40 bp von der Basenfehlpaarung entfernt; Rechts, DNA Substrat (-80) mit der ersten GATC-Erkennungssequenz 176 bp und mit der zweiten 80 bp entfernt von der Basenfehlpaarung. Die Reaktion wurde mit 500 nM MutS, 1  $\mu$ M MutL, 500 nM MutH, 1 mM ATP, 150 mM KCl in 1x Puffer gelb bei 37 °C durchgeführt. Gestoppt wurden 10  $\mu$ l der Probe mit 2  $\mu$ l 5x AAP. Polyacrylamidgel (6 %) mit Ethidiumbromid gefärbt

Die Balkendiagramme zeigen, dass das 209 bp lange Produkt bei beiden Substraten bevorzugt entsteht, was auf Spaltung an der zweiten, 176 bp von der Basenfehlpaarung entfernten GATC-Erkennungssequenz hindeutet.



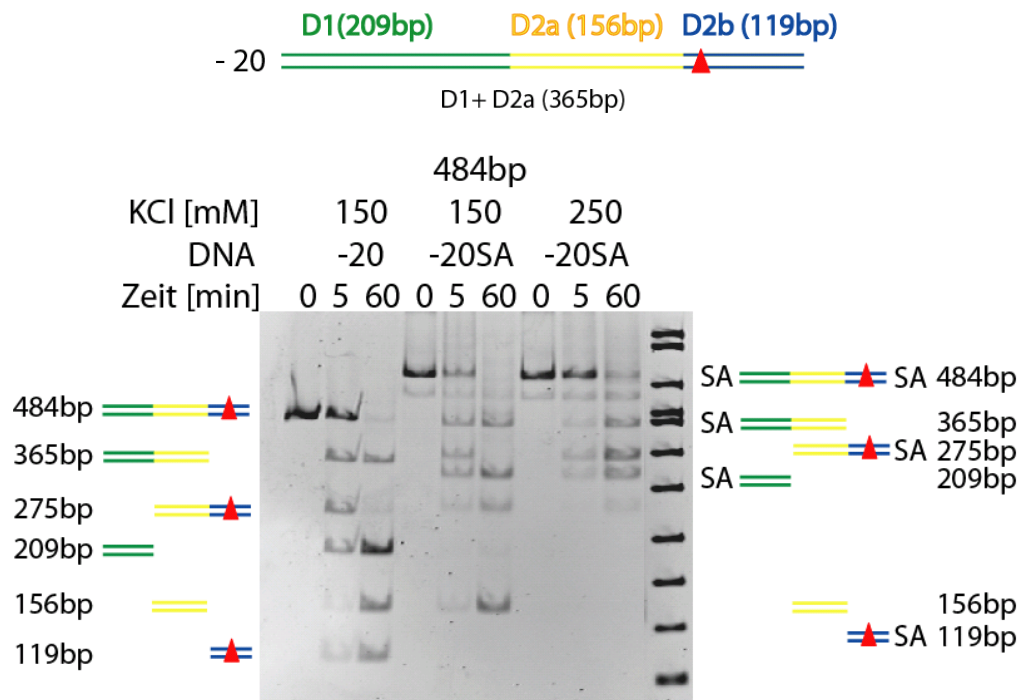
**Abb. 3-55: Intensitäten zweier Spaltprodukte aus den Kinetiken in Abbildung 3-51**

Weißer Balken, Prozent des Ausgangssubstrates; grüne Balken, Prozent für das 209 bp lange Produkt; orange Balken, Prozent für das 345 bp oder 305 bp lange Produkt nach der Spaltung durch MutHLS

Auf einem 406 bp langen Substrat mit zwei GATC-Erkennungssequenzen wird diejenige Erkennungssequenz besser gespalten, die sich näher der Mitte des Substrates befindet. Die Position der Basenfehlpaarung ist nicht ausschlaggebend für die Inhibition der Spaltung, das beweist die Referenz GATC-Erkennungssequenz.

### 3.9. Unter „single turnover“-Bedingungen spaltet das MMR nur an einer GATC-Erkennungssequenz

Die folgenden Experimente wurden unter speziellen Reaktionsbedingungen durchgeführt, um zu sehen wie häufig ein aktiver MutSLH-Komplex die DNA spalten kann. Die Bindung von MutS an die DNA wurde bei 50 mM KCl durchgeführt, anschließend wurde die KCl-Konzentration auf 250 mM erhöht. Die hohe KCl-Konzentration verhindert, dass MutS erneut binden kann. Damit die MutS Moleküle nicht von den Enden der DNA dissoziieren wurden die Enden mit Streptavidin blockiert. Auf der DNA befinden sich nur diejenigen MutS-Moleküle, die während der Reaktion bei 50 mM KCl gebunden haben.



**Abb. 3-56: Drei MutHLS-Spaltkinetiken mit einem 484 bp langen DNA-Substrat mit zwei GATC-Erkennungssequenzen**

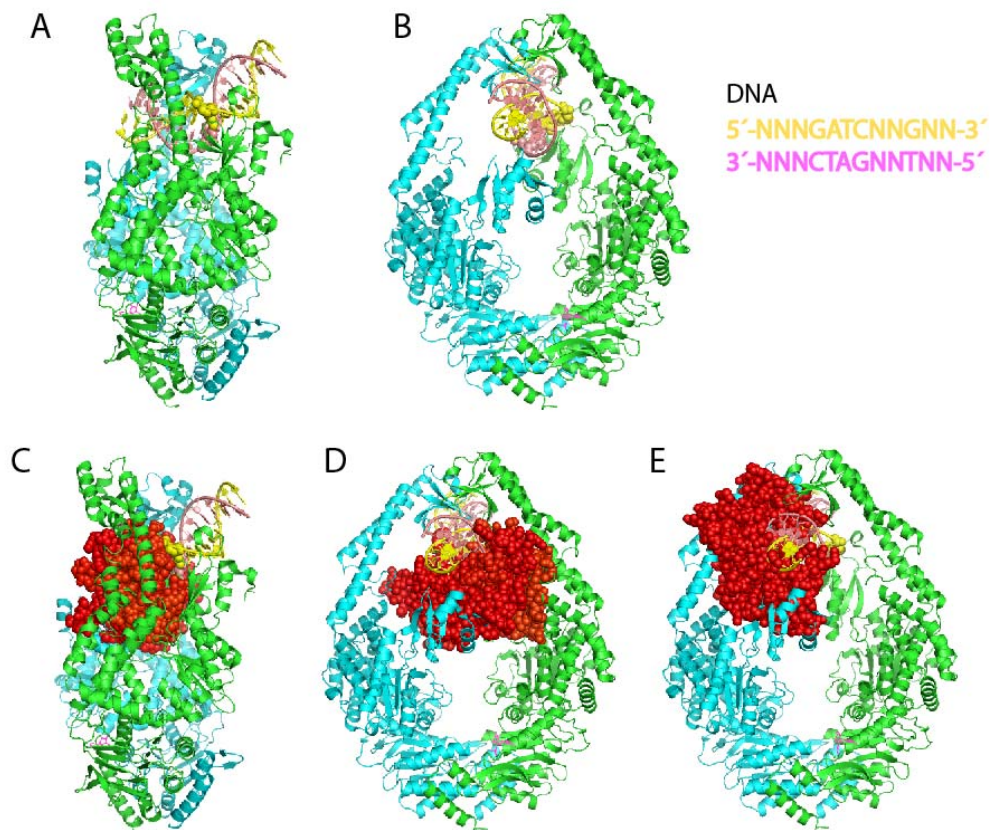
Die DNA wurde an beiden Enden biotinyliert, die Reaktion wurde einmal ohne Streptavidin (SA) bei 150 mM KCl und zweimal mit SA, bei 150 mM KCl und bei 250 mM KCl, durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 500 nM MutS, 1  $\mu$ M MutL, 500 nM MutH, 10 nM DNA und 1 mM ATP durchgeführt. Polyacrylamidgel (6 %), 1x TPE, mit Ethidiumbromid gefärbt

Interessanterweise kann das DNA-Substrat unter diesen Bedingungen nur einmal gespalten werden, weil durch die Spaltreaktion offene DNA-Enden entstehen, von denen MutS oder die Komplexe aus MutS, -L, -H von der DNA dissoziieren und nicht wieder neu binden können (3-56).

### 3.10. MutS muss nicht an der Basenfehlpaarung sein, während MutH an der GATC-Erkennungssequenz spaltet

Die Experimente mit dem *roadblock* zeigten zwar eine Inhibition der Aktivierung von MutH, allerdings weist die vorhandene Restaktivität darauf hin, dass MutS nicht in direkte Nähe (z. B. als *sliding clamp*) der GATC-Erkennungssequenz gelangen muss. Mehrere Modelle erklären die durch die *roadblocks* verursachte Inhibition, Modelle, in denen MutS noch am *mismatch* gebunden bleibt, während eventuell MutL entlang der DNA Komplexe bildet (Polymerisations-Modell), die durch die *roadblocks* gestört werden. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob MutS während der Aktivierung an der Basenfehlpaarung gebunden bleibt oder ob es diese verlässt? Bleibt MutS

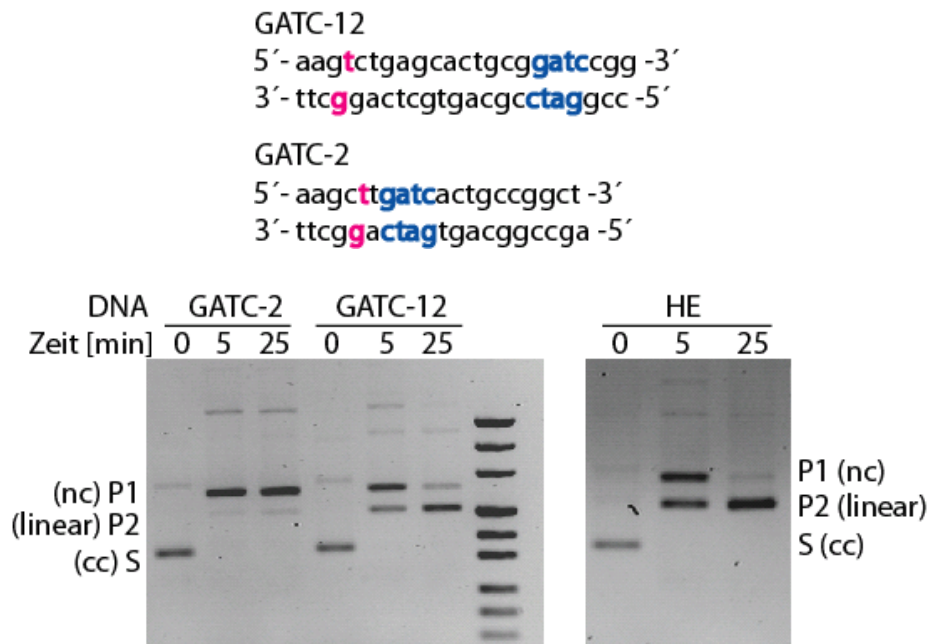
während der Aktivierung an der Basenfehlpaarung sitzen, dann sollte ein Bereich von ca. 12-15 bp auf beiden Seiten neben der Basenfehlpaarung von dem gebundenen Protein besetzt sein (siehe Abbildung 3-57). Liegt die GATC-Erkennungssequenz innerhalb dieses Bereiches, sollte sie für MutH nicht zugänglich sein.



**Abb. 3-57: A-B: MutS im Komplex mit *mismatch*-DNA; C-E: MutS und MutH im Komplex mit *mismatch*-DNA**

A, Seitenansicht von MutS; B, A um 90° gedreht. C, MutS-DNA-Komplex mit MutH bei Spaltung des unteren DNA-Strangs (Seitenansicht); D, C um 90° gedreht; E, MutS-DNA-Komplex mit MutH, bei Spaltung des oberen DNA-Strangs. Rot, MutH; gelb, oberer DNA-Strang trägt das G der G/T-Basenfehlpaarung; rosa, unterer DNA-Strang trägt das T der G/T-Basenfehlpaarung

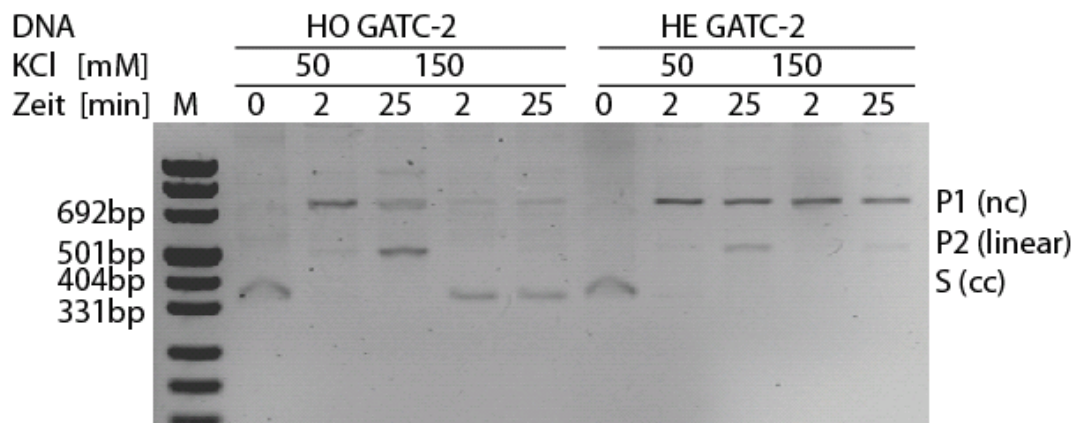
Anhand dieser These wurde ein zirkuläres DNA-Substrat konzipiert, innerhalb dessen Sequenz die GATC-Erkennungssequenz und die Basenfehlpaarung nur 2 bzw. 12 bp auseinander liegen. Als Kontrolle diente ein drittes zirkuläres Substrat, bei welchem die kürzere Entfernung zwischen der GATC-Erkennungssequenz und der Basenfehlpaarung 220 bp war.



**Abb. 3-58: MutHLS-Spaltkinetiken mit zirkulären DNA-Substraten, auf denen die GATC-Erkennungssequenz an verschiedenen Positionen lokalisiert ist**

Die Reaktion wurde mit 400 nM MutS, 1 µM MutL, 500 nM MutH, 1 mM ATP, 150 mM KCl in 1x Puffer gelb bei 37 °C durchgeführt. 10 µl der Probe wurden nach den Zeitpunkten 5 und 25 min mit 2 µl 5x AAP gestoppt. Die drei verschiedenen geschlossen zirkulären DNA-Substrate (cc) haben alle eine Länge von 505 bp. Es entstehen zwei Produkte, der schon in einem Strang durch MutH gesplante Zirkel (nc) und das 505 bp lange lineare Produkt (linear), nachdem die Spaltung des zweiten DNA-Strangs erfolgt ist. HE, Substrat indem der Abstand zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz 220 bp beträgt; GATC-2, Substrat indem das Cytosin der GATC-Erkennungssequenz zwei Basen 5' nach dem Guanin der G/T Basenfehlpaarung (siehe oben) positioniert ist; GATC-12, Substrat indem das Cytosin der GATC-Erkennungssequenz -12 Basen 5' nach dem G der G/T-Basenfehlpaarung positioniert ist; M, Marker pUC 8 Mix Marker; Mit Ethidumbromid vorgefärbtes Agarosegel (2 %)

Die Spaltkinetiken der drei Substrate wurden in Abbildung 3-59 zum Vergleich nebeneinander aufgetragen. Das Substrat (GATC-12) und das Substrat (HE) werden gleich gut gespalten, nach 60 min ist fast das gesamte Substrat linearisiert. Die Substrat-Bande der DNA (GATC-2) verschwindet nach 5 min der Spaltreaktion komplett. MutH kann an der GATC-Erkennungssequenz einen Einzelstrangbruch induzieren, obwohl sich die Basenfehlpaarung nur zwei Nukleotide davon entfernt befindet. Doppelstrangspaltung findet an dieser Erkennungssequenz nicht statt, wahrscheinlich weil MutH durch die Basenfehlpaarung, direkt an seiner Erkennungssequenz, gestört wird. In Spaltexperimenten mit 50 mM KCl (*mismatch*-unabhängige Spaltung von MutH) sollte dies überprüft werden. Die Spaltkinetiken wurden ohne MutS und, jeweils für eine Homoduplex- und eine Heteroduplex-(GATC-2)-DNA, bei 50 mM und 150 mM KCl durchgeführt.



**Abb. 3-59: MuthLS-Spaltkinetiken mit zirkulärer Homoduplex- und Heteroduplex-DNA**

Die Reaktion wurde mit 400 nM MutS, 1  $\mu$ M MutL, 500 nM MutH und 1 mM ATP in 1x Puffer gelb mit verschiedenen KCl-Konzentrationen durchgeführt. 10  $\mu$ l der Reaktion wurden mit 2  $\mu$ l 5x AAP gestoppt.

M, Marker pUC8 Mix Marker; Agarosegel (2 %), mit Ethidiumbromid vorgefärbt

Auf dem Heteroduplex (GATC-2) findet mit 50 mM KCl Einzelstrangspaltung jedoch keine Doppelstrangspaltung statt, obwohl kein MutS in der Reaktion ist. Offensichtlich stört die Basenfehlpaarung die MutH-Spaltreaktion. Auf einem Homoduplex kann MutH unter den gleichen Bedingungen beide DNA-Stränge spalten, das Substrat wird linearisiert. In der Reaktion ohne MutS mit 150 mM KCl findet keine Einzelstrangspaltung und keine Doppelstrangspaltung statt.



## 4 Diskussion

### 4.1. Versuchsaufbau optimieren

#### 4.1.1. Die *mismatch*-spezifische MutH-Aktivierungsreaktion ist salzabhängig

Verschiedene Untersuchungen am Mechanismus des MMR zeigen trotz gleicher Proteinverhältnisse unterschiedliche Ergebnisse. Ein Grund dafür könnte sein, dass in den jeweiligen Arbeiten nicht die gleichen Pufferbedingungen verwendet wurden. Die Puffer unterschieden sich in ihrer Ionenkonzentration (0-200 mM Salz) und viele Puffer enthielten nicht-physiologische Salzkonzentration ( $\leq 50$  mM) (Biswas *et al.*, 2001; Acharya *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Spezifität der *mismatch*-Erkennung als auch die ATPase-Aktivität von MutS bei Ionenkonzentrationen zwischen 100 und 160 mM am höchsten (Blackwell *et al.*, 1998; Acharya, 2003) und bei Konzentrationen unter 50 mM oder über 200 mM am niedrigsten ist. Bei Salzkonzentrationen unter  $< 100$  mM wird MutH durch MutL auch in Abwesenheit von MutS, unabhängig von einer Basenfehlpaarung, aktiviert (siehe 3.1., Abbildung 3-2). Die Untersuchung der MutH-induzierten Spaltung mit Homo- und Heteroduplexen im Vergleich zeigte, dass die *mismatch*-spezifische Spaltung von MutH bei einer Ionenkonzentration von 130-150 mM am effektivsten ist. Für alle weiterhin durchgeführten Experimente wurde dies berücksichtigt. Gerade bei Untersuchungen des Mechanismus der MutH-Aktivierung ist entscheidend, dass die Aktivierung von MutH von der Erkennung der Basenfehlpaarung abhängig ist. Durch die Unterdrückung aller *mismatch*-unabhängigen Reaktionen kann Energie gespart werden, überflüssige Reparaturprozesse werden verhindert. Außerdem erhöht jeder zusätzliche Reparaturprozess die Wahrscheinlichkeit, dass neue Fehler in die DNA-Sequenz eingebaut werden und damit zu Mutationen führen.

#### 4.1.2. Kurze DNA-Substrate mit zentraler GATC-Erkennungssequenz sind für den Mechanismus des MMR gut geeignet

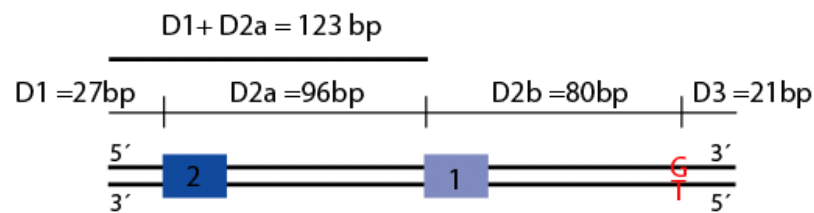


Abb.4-1: Schematische Darstellung eines 224 bp langen *mismatch*-Substrats

Blau, GATC-Erkennungssequenzen

Für die Untersuchungen der Kopplung von *mismatch*-Erkennung mit der Strangdiskriminierung sind DNA-Substrate erforderlich, die den Mechanismus der MutH-Aktivierung nicht beeinflussen und einfach sowie mit großer Ausbeute und Reinheit herzustellen sind. Dafür eignen sich Substrate, die mittels PCR-Reaktionen hergestellt werden (Thomas, 2000). Damit die Fehlerrate der PCR-Reaktion möglichst klein gehalten wird und die Analyse der Ergebnisse klare Daten liefert, sollten die Substrate so kurz wie möglich sein. Das kürzeste Substrat vorausgegangener Experimente hatte eine Gesamtlänge von 302 bp, allerdings wurde die MutH-Endonuklease-Aktivierung durch MutS auf diesem Substrat stark reduziert. Als Grund für die Inhibition wurde der Abstand D1 mit einer Länge von nur 27 bp angenommen, allerdings könnte auch die geringe Gesamtlänge der DNA für die Inhibition der MutH-Endonuklease-Aktivierung verantwortlich sein. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass der Abstand der GATC-Erkennungssequenz zum Ende der DNA (D1) großen Einfluss auf die Aktivierung von MutH hat (Smith & Modrich, 1996; Beaulieu *et al.*, 2001). Eigene Ergebnisse zeigen, dass der Abstand D1 > 84 bp sein muss, damit die MutH induzierte Spaltung stattfindet. In Anknüpfung an diese Ergebnisse wurde ein Substrat hergestellt, dessen Gesamtlänge 224 bp betrug (siehe Abbildung 4-1). In die Sequenz wurde eine zusätzliche GATC-Erkennungssequenz (hellblau) eingeführt, um die Spaltung vergleichend an zwei Erkennungssequenzen zu messen. Der Abstand der GATC-Erkennungssequenz (1) zum DNA-Ende betrug 123 bp und der Abstand der GATC-Erkennungssequenz (2) zum DNA-Ende 27 bp (siehe Abbildung 4-1). An der GATC-Erkennungssequenz (1) konnte gute Spaltaktivität von MutH detektiert werden, die GATC-Erkennungssequenz (2) wurde weiterhin nur sehr reduziert gespalten. Eine Gesamtlänge von 224 bp ist ausreichend für eine gute MutS, -L aktivierte MutH-Spaltung. Bei der Geometrie des Substrates muss allerdings beachtet werden, dass der Abstand D1 nicht zu kurz gewählt wird bzw. dass die GATC-

Erkennungssequenz möglichst in der Mitte des Substrates positioniert ist, wie die in Kapitel 3.8.2. beschriebenen Experimente zeigten.

#### 4.1.3. Kurze zirkuläre *mismatch*-Substrate

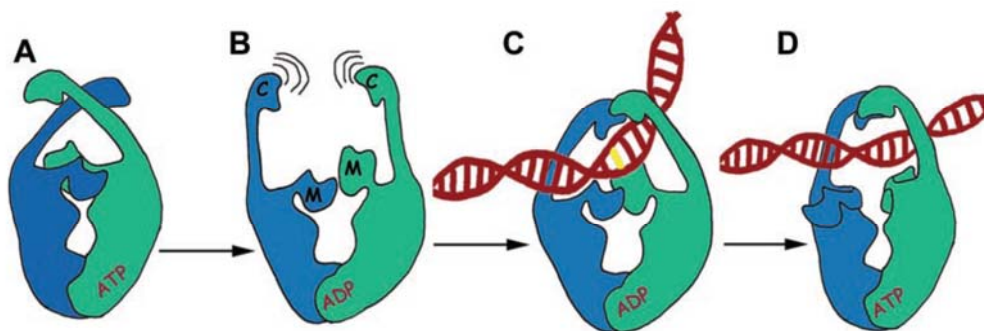
Die beste Lösung, um Effekte der DNA-Enden, zum Beispiel die verstärkte Bindung von MutS an DNA-Enden (Yang *et al.*, 2005), auf den Mechanismus des MMR zu eliminieren, ist die Verwendung von DNA ohne Enden, also zirkuläre DNA. In späteren dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, um kurze zirkuläre *mismatch*-Substrate herzustellen. Das Verfahren beruht auf einer PCR-Reaktion, die Sequenz und die Länge der DNA kann dadurch unendlich variiert werden. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Auflösung 0.1-10 nm) wurde die Qualität der Substrate analysiert und es zeigte sich, dass die Methode sehr gut geeignet ist um homogene *mismatch*-Substrate herzustellen (siehe 3.4.).

#### 4.2. MutS Dimere sind ausreichend für die Aktivierung von MutH

MutS bildet in Lösung Komplexe aus Dimeren und Tetrameren (Bjornson *et al.*, 2003; Lamers *et al.*, 2004). Die *in vivo*-Funktion des MutS-Tetramers ist noch nicht geklärt (Iyer *et al.*, 2006), allerdings ist ein Dimer für die DNA-*mismatch*-Reparatur ausreichend, während für die Funktion von MutS in der Anti-Rekombination ein Tetramer benötigt wird (Calmann *et al.*, 2005b; Calmann *et al.*, 2005a; Nowosielska *et al.*, 2008). Durch eine Punktmutation an der Position 835 im C-Terminus (53 Aminosäuren) von MutS kann verhindert werden, das MutS Tetramere bildet (Manelyte *et al.*, 2006; Mendillo *et al.*, 2007). Diese Dimer-Variante von MutS hat ähnliche Bindungsaffinitäten zu Heteroduplex-DNA wie der tetramer-bildende MutS-Wildtyp. In dieser Arbeit wurde die *in vitro*-Aktivität der cysteinfreien MutS-Variante (MutS<sup>CF</sup>) mit der cysteinfreien MutS-Variante D835R (MutS<sup>CF/D835R</sup>) in der *mismatch*-abhängigen MutH-Aktivierung verglichen. Dazu wurden Substrate mit unterschiedlicher Länge des Abstandes D1 (Abstand der GATC-Erkennungssequenz zum 5'-Ende des oberen Stranges) getestet. Die Dimer-Variante zeigte gegenüber der MutS-Tetramer-Variante keine Unterschiede in der Fähigkeit, MutH zu aktivieren, was darauf hindeutet, dass die Tetramerisierung für den Mechanismus des MMR nicht unbedingt notwendig ist. Dies stimmt mit der Aussage von Mendillo *et al.*, 2007 überein. Auf Substraten mit einer Blockade zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz zeigte die Dimer-Variante von MutS gegenüber dem Wildtyp (Tetramer) eine Inhibition der MutH-Aktivierung. Die Inhibition kann dabei eventuell mit der Annahme begründet werden, dass ein MutS-Dimer am *mismatch* bindet und ein zweites Dimer die GATC-Erkennungssequenz

erreicht. Mit Blockade würde die Aktivierung von MutH inhibiert, weil das erste *mismatch* gebundene Dimer den Kontakt zum zweiten MutS-Dimer nicht halten kann. Die Tetramerisierung würde das Protein demnach stabilisieren. Hinzu kommt die sehr nah am DNA-Ende positionierte Basenfehlpaarung, sie bewirkt ein Diffundieren von MutS von den DNA-Enden. Die KCl-Konzentration während der Reaktion hat allerdings einen großen Einfluss auf die Aktivität des Dimers. Schon bei einer KCl-Konzentration von 150 mM verliert die Dimer-Variante an Aktivität, die Tetramer-Variante hingegen nicht. Ab einer KCl-Konzentration von 200 mM KCl kann die MutS-Dimer-Variante nicht mehr aktivieren, während die Tetramer-Variante noch Aktivität zeigt. Dies könnte wiederum eine Folge der mangelnden Stabilität des Dimer gegenüber dem Tetramer sein. Bei hoher Salz-Konzentration kann durch die Tetramerisierung ein DNA-gebundenes MutS-Dimer ein zweites MutS-Dimer mit auf die DNA laden und erreicht dadurch leichter eine höhere Aktivität. Diese Fähigkeit fällt bei der reinen Dimer-Variante weg.

### 4.3. Fixieren von MutS auf der DNA



**Abb.4-2: Schematische Darstellung der Bewegung in der *clamp*-Domäne eines MutS-Dimers**

A, B: Die DNA-Bindungs-Domänen sind flexibel und werden geöffnet um DNA zu binden; C, D: Nach dem Binden der DNA werden die *clamp*-Domänen geschlossen, anschließend werden die *clamp*-Domänen durch die Bindung von ATP zueinander bewegt; die beiden *mismatch*-Domänen drehen sich nach außen, um MutS zu einer *sliding clamp* zu machen (Lamers, 2004).

MutS erkennt Fehlpaarungen in DNA-Sequenzen. Die *mismatch*-Erkennung unter Anwesenheit von ATP wirkt auf MutS wie eine Art Schalter, der die Bindung von MutL und die weiteren Schritte innerhalb der DNA-Reparatur ermöglicht. Der Mechanismus für diesen Schalter ist noch unverstanden, wahrscheinlich wird das An- und Abschalten des Proteins über Bewegungen innerhalb der Struktur von MutS erreicht. Welche Bewegungen innerhalb der Proteinstruktur genau stattfinden ist noch nicht bekannt. Der Vergleich der Proteinstrukturen von MutS mit und ohne DNA deutet auf mögliche Beweglichkeiten innerhalb der einzelnen Domänen hin (Obmolova, Ban *et al.*, 2000). Elektronenmikroskopische Aufnahmen

des humanen MutS-Proteins lieferten Bilder von unterschiedlichen Konformationen von MutS mit ADP oder ATP $\gamma$ S (Gradia, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MutS sich auf der DNA bewegen kann und bei Zugabe von ATP von einer linearen DNA dissoziiert (Menillo, 2005). Ob und wie die Diffusion von MutS in den Mechanismus der Strangdiskriminierung involviert ist, konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Auch die Funktion der ATP-Hydrolyse von MutS wird noch kontrovers diskutiert. Abbildung 4-2 zeigt ein mögliches Modell für die ATP-induzierte *sliding clamp* von MutS (Lamers, 2004). Um mehr über die Bewegung von MutS auf der DNA zu erfahren, wurde betrachtet, wie das Protein die DNA verlässt. MutS hat zwei Möglichkeiten zum Verlassen einer DNA: Es kann direkt über das Öffnen der *clamp*-Domänen von der DNA dissoziieren oder es kann nach ATP-Bindung durch eine Konformationsumwandlung als *sliding clamp* die DNA über die Enden verlassen. Durch das Blockieren der DNA-Enden mit Streptavidin kann ein Diffundieren von den Enden der DNA verhindert werden (Gradia, 1999; Blackwell *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde MutS auf einer DNA mit blockierten Enden fixiert, indem die *clamp*-Domänen des Proteins mit einem *crosslinker* vernetzt wurden. In EMSA-Experimenten konnten stabile Komplexe des MutS-Proteins mit linearer *mismatch*-DNA sichtbar gemacht werden. Trotz vernetzter *clamp*-Domäne kann das Protein mit ATP die DNA über offene Enden verlassen.

#### **4.3.1. Für die Diffusion auf der DNA benötigt MutS ausreichende Flexibilität innerhalb der *clamp*-Domäne**

Dieser Mechanismus einer *sliding clamp* setzt eine gewisse Flexibilität der *clamp*-Domänen von MutS voraus, durch den Einsatz kurzer *crosslinker* wurde diese Flexibilität eingeschränkt. Der Abstand der vernetzten Basen an der Position 483 betrug 18.2 Å. Bei Verwendung des M4M *crosslinkers*, der eine Länge von 13 Å hat, konnte mit Hilfe von EMSA-Experimenten gezeigt werden, dass dieses Protein die DNA nicht mehr verlassen kann. Die DNA-Protein-Komplexe blieben trotz Zugabe von ATP und offenen DNA-Enden stabil. Offensichtlich müssen die *clamp*-Domänen eine gewisse Beweglichkeit haben, damit die Umwandlung von MutS in eine *sliding clamp* möglich ist.

#### **4.3.3. Das an der Position 483 vernetzte MutS kann MutH Aktivieren**

Im nächsten Schritt wurde die Aktivität des an der Position 483 vernetzten MutS-Dimers (MutS<sup>H483C</sup> mit der Mutation D835R) getestet. Da dieses vernetzte Protein eine DNA ohne Enden nicht mehr verlassen kann und der *crosslink* zwischen den *clamp*-Domänen innerhalb

eines Dimers von MutS den DNA-Protein-Komplex stabilisiert, zeigte das vernetzte MutS, sogar mehr Aktivität als das nicht vernetzte. Für die Experimente wurde 505 bp lange, zirkuläre *mismatch*-DNA verwendet. Die Tatsache, dass die MutS-Dimer-Variante verglichen mit dem Wildtyp (Tetramer) anfälliger gegenüber Salz ist, wurde in den Versuchen ausgenutzt (siehe 3.5.2.). Die Bindung des Proteins an die DNA fand bei 50 mM KCl statt, mit Zugabe der anderen Proteine und ATP wurde die KCl-Konzentration auf 250 mM erhöht. Eine Kompetitor-DNA (42 bp G/T) sollte alle von der DNA diffundierten Proteinkomplexe abfangen und ein erneutes Binden verhindern. Beide MutS-Proteine, das vernetzte und das nicht vernetzte, waren trotz veränderter Versuchsbedingungen auch bei 250 mM KCl aktiv. Allerdings zeigte das an der Position 483 vernetzte Protein deutlich bessere Aktivität als das nicht vernetzte. Ein nicht vernetztes Dimer-MutS verliert seine Aktivität bei hohen Salzkonzentrationen, weil die Bindung an die DNA schwieriger wird. Die Vernetzung zweier Monomere von MutS an der Position 483 scheint die Aktivität des Proteins nicht zu stören. Das heißt erstens, dass das Protein die *clamp*-Domänen während der Aktivierung nicht weit öffnen muss und, zweitens, dass die einschränkende Bewegungsfreiheit zwischen den *clamp*-Domänen eines Dimers das Protein nicht behindert. Der Aktivitätsunterschied zwischen dem vernetzten und dem nicht vernetzten Protein deutet darauf hin, dass das Protein die *clamp*-Domänen zum Verlassen der DNA öffnen muss.

#### 4.3.4. Kompetitionsversuche mit zwei verschiedenen DNA-Substraten

Um herauszufinden, ob MutS nach der Aktivierung von MutH direkt auf einer zweiten DNA aktivieren kann, wurden Experimente mit zwei verschiedenen DNAs durchgeführt. Die eine DNA war 505 bp lang und zirkulär, die zweite war 360 bp lang und linear. Beide Reaktionen wurden mit 125 mM KCl durchgeführt, bei dieser Salz-Konzentration sollte MutS in der Lage sein, von einer DNA zu dissoziieren und erneut an eine weitere DNA zu binden. Die Ergebnisse zeigten, dass nur die zuerst gebundene DNA (in diesem Fall die zirkuläre DNA) gespalten wurde. MutS scheint demnach nicht in der Lage zu sein, nach dem Initiieren des Strangdiskriminierungssignals auf einer anderen DNA neu zu aktivieren. Anscheinend bleibt das Protein auf der DNA. Ein schnelles Umwandeln in die aktive Form und Bindung an eine weitere DNA findet demnach nicht statt.

## 4.4. Modelle ausschließen

### 4.4.1. Blockaden inhibieren bzw. stoppen die Weiterleitung der Aktivierung

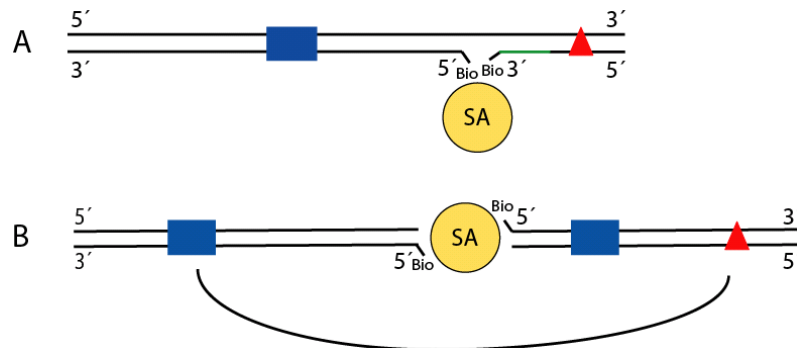


Abb.: 4-3: *Mismatch*-Substrate mit Blockade zwischen der GATC-Erkennungssequenz und der Fehlpaarung

Die Kopplung der *mismatch*-Erkennung mit der Spaltung an der GATC-Erkennungssequenz bleibt, trotz vieler Modelle, letztlich unverstanden. Drei verschiedene Modelle werden zurzeit in der Literatur diskutiert. Nach zweien davon wird bei der Aktivierung eine Signalweiterleitung entlang der DNA-Kontur, entweder mittels ATP-bindungsabhängiger Diffusion oder mit Hilfe eines Polymerisations-Mechanismus eines zweiten Proteins entlang der DNA-Helix benutzt (Pluciennik & Modrich, 2007). Es gibt Beweise für die ATP-bindungsabhängige Diffusion von MutS und MutS, -L entlang der DNA-Helix, allerdings ist die Funktion dieser Bewegung innerhalb des MMR noch nicht geklärt (Allen, 1997; Acharya, 2003). In einem dritten Modell bleibt MutS, nach der Bindung von ATP, am *mismatch* fixiert und aktiviert die MutH-Endonuklease durch das *looping* der DNA, mit dessen Hilfe MutS und GATC-Erkennungssequenz zusammengeführt werden. Elektronenmikroskopische (EM-) und *atomic force microscopy* (AFM-)Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass an die DNA gebundenes MutS *loops* ausbildet, unterstützen dieses dritte Modell (Allen *et al.*, 1997; Jia *et al.*, 2008). In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen wurden Barrieren zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz gesetzt, die ein mögliches Gleiten des MutS-Moleküls nach der *mismatch*-Erkennung, während der *mismatch*-Reparatur, verhindern. Die erste Blockade bestand aus einem gebundenen Steptavidinmolekül. Das Molekül war an einen DNA-Strang gebunden, dieser eine Strang wurde zusätzlich durch eine 4 bp große Lücke unterbrochen, der zweite DNA-Strang innerhalb des Substrates war kontinuierlich (siehe Abbildung 4-1). Die Spaltung der Endonuklease MutH wurde durch die Blockade um 60 % inhibiert, allerdings war die Aktivität der Endonuklease damit drei einhalbmal besser als auf einem Homoduplex-Substrat. Die Streptavidinblockade schließt ein Gleiten bzw.

Diffundieren von MutS ab der Basenfehlpaarung bis zur GATC-Erkennungssequenz aus. Vergleichend kann dazu die Tatsache herangezogen werden, dass Streptavidinmoleküle an DNA-Enden ein Diffundieren des MutS-Moleküls von den Enden verhindern. Demnach kann MutS die Aktivierung von MutH bewirken, ohne dass es sich in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz befindet. Dies schließt ein einfaches *sliding*-Modell aus. Ein *looping*-Mechanismus könnte durch den geringen Abstand von 176 bp zwischen Basenfehlpaarung und Erkennungssequenz gestört worden sein, was die Inhibition um 60 % erklären würde.

Das war der Grund für die Herstellung einer anderen Art von Blockade. Dazu wurden zwei verschiedene lineare DNA-Doppelstränge über ein Streptavidin-Molekül miteinander verknüpft (siehe Abbildung 4-2). Der Unterschied zu den vorherigen Substraten war zum einen die Tatsache, dass die Blockade aus einem Streptavidin-Molekül und einem Doppelstrangbruch bestand, zum anderen waren die Abstände zwischen Basenfehlpaarung und Erkennungssequenz wesentlich größer als der zuvor gewählte Abstand von 176 bp. Allerdings konnte mit diesen Substraten keine Aktivierung von MutH detektiert werden. Die Kontrollen mit den Typ-II-Restriktionsenzymen FokI und NgoMIV zeigten, dass es möglich ist, mit dieser Art eines DNA-Substrates *loops* auszubilden (Marshall *et al.*, 2007; Catto *et al.*, 2008). Die Daten schließen damit auch ein einfaches *looping*-Modell aus. Wie schon in Kapitel 3.7. beschrieben, gibt es noch weitere Arbeitsgruppen, die mit Blockaden auf der DNA einen möglichen *sliding*-Mechanismus getestet haben. Wang & Hays, 2004 untersuchten die Kopplung von *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung im humanen MMR. Sie setzten als Blockaden Stamm-*loop*-Strukturen bzw. Biotin-Streptavidin-Komplexe in zirkuläre Heteroduplex-Substrate und stellten fest, dass über die Biotin-Streptavidin-Komplexe hinweg aktiviert werden konnte. Parallel zur Entstehung dieser Arbeit veröffentlichten Pluciennik & Modrich, 2007 eine Arbeit über das MMR in *E. coli*. Die Gruppe verwendete in ihrer Arbeit als Blockade eine hydrolysedefekte Variante von EcoRI, die die Signalweiterleitung um 70-80 % inhibierte. Dass die Inaktivierung nicht zu 100 % stattfand, begründeten Pluciennik & Modrich damit, dass EcoRI zeitweise von seiner Erkennungssequenz diffundiert (residency  $t_{1/2} < 40$  min). Die Streptavidin-Biotin-Blockaden die in den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Versuchen verwendet wurden, schließen ein Diffundieren von MutS über die Blockade hinweg aus. Trotzdem kann ein Teil der MutS-Proteine die Aktivierung von MutH weiterleiten. Allerdings findet keine Aktivierung mehr statt, wenn der kontinuierliche DNA-Strang fehlt. Weiterhin konnte keine *trans*-Reaktion beobachtet werden, wie in Kapitel 3.1. deutlich wird, wo Homoduplex- und Heteroduplex-Substrat in einer Reaktion getestet wurden. Schofield, 2001 konnte eine *trans*-



Reaktion von MutS auf der DNA zeigen, allerdings wurden die Versuche mit 50 mM KCl durchgeführt, die Salzkonzentration ist zu niedrig, um MutS, -L-spezifische MutH-Aktivierung zu detektieren.

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Gruppen könnten die unterschiedlichen Geometrien der jeweiligen Substrate sein (siehe Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1: Vergleich der Ergebnisse aus Versuchen mit Blockaden**

Ergebnisse	Inhibition um 60 %, 100 %	Inhibition um 70 -80 %	Keine Inhibition
Arbeitsgruppe	Eigene Arbeit (lineare Substrate)	Plucienniek, 2007 <b>Zirkel (6640 bp)</b> <b>Blockade vor und nach dem mismatch</b>	Wang, 2004 <b>Zirkel (2200 bp)</b> <b>Blockade vor und nach dem mismatch</b>
Abstand <i>mismatch</i> u. GATC-Erkennungssequenz	<b>176 bp</b> <b>374 bp, 478 bp, 829 bp</b>	<b>1024 bp und 5416 bp</b>	<b>310 bp und 1870 bp</b>
Abstand Blockade u. GATC-Erkennungssequenz	<b>55 bp,</b> <b>275 bp, 444 bp</b>	<b>715 bp und 5271 bp</b>	<b>150 bp und 1730 bp</b>

Betrachtet man die Abstände von der Blockade zur GATC-Erkennungssequenz innerhalb der verschiedenen Arbeiten, fällt auf, dass bei Abständen > 150 bp die Aktivierung der MutH-Endonuklease am stärksten inhibiert wurde. Ein beweglicher Komplex aus MutS, -L und MutH wird durch eine Blockade gestoppt, die Größe des Komplexes bestimmt dabei die Reichweite. MutL könnte für die Reichweite der Aktivierung eine wesentliche Rolle spielen, eventuell verhält es sich wie eine Art „flexibler Greifarm“, der über die Blockade hinweg greift und dadurch MutH jenseits der Blockade auf der GATC-Sequenz platziert (siehe Abbildung 4-5).

#### 4.4.2. Ein aktiviertes MutS „scant“ die DNA nicht systematisch nach GATC-Erkennungssequenzen ab

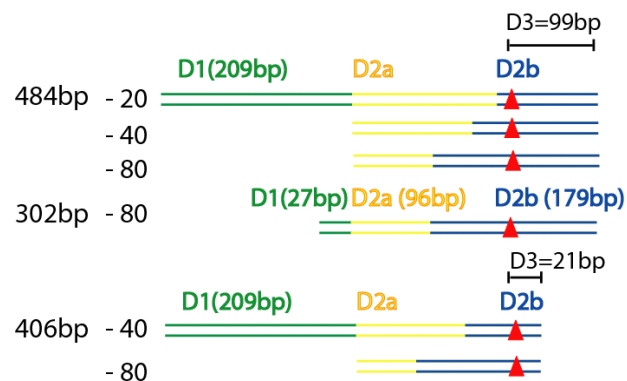


Abb. 4-4: *Mismatch*-Substrate mit zwei GATC-Erkennungssequenzen und deren einzelne Abschnitte

Mit Hilfe von Blockaden (siehe 4.4.1.) sollte ein möglicher Aktivierungsmechanismus, der entlang der Helix-Kontur stattfindet, gestoppt werden und damit das *sliding clamp*-Modell bestätigt oder bei guter Aktivierung, trotz Blockade, ein *looping*-Modell unterstützt werden. Die Daten sprechen, wenn auch nicht ganz eindeutig, eher dafür, dass eine kontinuierliche DNA-Struktur zwischen *mismatch* und GATC-Erkennungssequenz für die Weiterleitung des Aktivierungssignals benötigt wird. Bewegt sich MutS nach der Erkennung der Basenfehlpaarung entlang der Helix-Struktur in Form von linearer Diffusion, dann hat das Protein kontinuierlichen Kontakt zur DNA. Auf einem Substrat mit mehreren GATC-Erkennungssequenzen könnte die Aktivierung an der Erkennungssequenz stattfinden, die sich am nächsten an der Basenfehlpaarung befindet, vorausgesetzt, MutS stoppt an der ersten Erkennungssequenz und der Komplex aus MutS, -L und -H wurde schon gebildet oder bildet sich dann. Auf der Basis dieser These wurde die Spaltpräferenz des MutHLS-Systems auf Substraten mit zwei GATC-Erkennungssequenzen analysiert. Eine der beiden Sequenzen hatte einen konstanten Abstand zur Basenfehlpaarung von 176 bp, die zweite Erkennungssequenz wurde entweder 80, 40 oder 20 Basenpaare von der Basenfehlpaarung entfernt positioniert. Die ersten Ergebnisse mit einem 484 bp langen DNA-Substrat, auf dem die zusätzliche Erkennungssequenz 80, 40 oder 20 bp von der Basenfehlpaarung positioniert war, zeigten, dass die MutS, -L-induzierte Spaltung von MutH nicht immer bevorzugt an der nächstgelegenen Erkennungssequenz stattfindet. Eine GATC-Erkennungssequenz, die sehr nah am *mismatch* ist, wird wesentlich schlechter erkannt als die Referenzposition, 176 bp entfernt. Wird allerdings der Abstand D1 (siehe Abbildung 4-4) verkürzt (302 bp langes Substrat), ändert sich die Präferenz des Systems. Die GATC-Erkennungssequenz, die sehr nah am DNA-Ende positioniert ist, wird schlechter gespalten als die zentraler positionierte

Erkennungssequenz. Die Nähe der Erkennungssequenz zum *mismatch* wird dann zweitrangig. Die Enden scheinen einen großen Einfluss auf den Mechanismus zu haben, was sich durch einen beweglichen Komplex in Form einer MutS-*sliding clamp* oder eines beweglichen tertiären Komplexes aus MutS, -L, -H auf der DNA erklären ließe. Wenn MutS sich nach der Erkennung der Basenfehlpaarung bidirektional auf der DNA bewegt (Iyer, 2006), dann müsste der Abstand vom *mismatch* zum DNA-Ende einen Einfluss auf die Aktivierung von MutH haben. Auf Substraten mit einer GATC-Erkennungssequenz und einer Basenfehlpaarung 6 bp vom Ende konnte eine schwache Reduktion der MutH-Aktivierung beobachtet werden (siehe 3.1.). Der Abstand D3 wurde in weiteren Substraten mit zwei Erkennungssequenzen auf 21 bp verkürzt. Die zusätzlichen GATC-Erkennungssequenzen wurden 40 und 80 bp vom *mismatch* entfernt positioniert. Sowohl die 40 bp und die 80 bp entfernte Erkennungssequenz wurden deutlich schlechter gespalten als die 176 bp entfernte Referenzposition. Das macht deutlich, dass die Aktivität an den Erkennungssequenzen nahe des *mismatch* nicht primär abhängig von der Position der Basenfehlpaarung (D3), sondern von der Entfernung der GATC-Erkennungssequenz zum DNA-Ende ist. Dadurch lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass MutS sich nach der Erkennung der Basenfehlpaarung auf der DNA bewegt. Selbst wenn MutS von den Enden diffundiert, kann es direkt danach wieder neu binden und würde so trotzdem MutH aktivieren. Die Ergebnisse zeigen, dass das aktivierte MutS die DNA nicht kontinuierlich nach einer GATC-Erkennungssequenz scannt. Allerdings zeigt sich auch, dass an einer GATC-Erkennungssequenz, die nur 20 bp von der Fehlpaarung entfernt ist, gespalten werden kann. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass eine GATC-Erkennungssequenz möglichst in der Mitte eines linearen Substrates sein sollte. Ein beweglicher Komplex aus MutS, -L und -H, der bei seinem Diffundieren von der DNA am Ende dissoziiert scheint die vorhanden Daten daher am plausibelsten zu erklären.

#### **4.4.3. Unter „single turnover“-Bedingungen spaltet das MMR nur an einer GATC-Erkennungssequenz**

Mit Hilfe von variierenden KCl-Konzentrationen, 50 mM während der DNA-Bindung von MutS und 250 mM anschließend, während der Zugabe von MutL, -H und ATP, wurden Bedingungen geschaffen, unter denen sich der MutS-DNA-Komplex für die *mismatch*-Reparatur nicht erneut bilden kann. Die Aktivierung von MutH wurde mit einem Substrat mit zwei GATC-Erkennungssequenzen, dessen Enden mit Streptavidin blockiert waren, durchgeführt. Das Streptavidin an den DNA-Enden sollte verhindern, dass die gebundenen, ATP-aktivierten MutS-Moleküle von den DNA-Enden diffundieren. Der aktive Komplex aus

MutS, -L und -H hatte damit die Möglichkeit, entweder an einer oder aber auch an beiden Erkennungssequenzen zu spalten. Ein zweites Spalten ist nur möglich, wenn der Komplex aus MutS, -L und -H nach der ersten Spaltung als stabiler Komplex erhalten bleibt. Die Ergebnisse zeigten, dass nur die Spaltung an einer der beiden GATC-Erkennungssequenzen stattfindet. Nach der ersten Spaltung bilden sich offene DNA-Enden, von denen die Komplexe oder MutS diffundiert und anschließend, wegen der hohen KCl-Konzentrationen, nicht erneut binden kann. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Komplex entweder beweglich oder aber transienter Natur ist. Ein stationärer, stabiler Komplex am *mismatch* erscheint daher unwahrscheinlich.

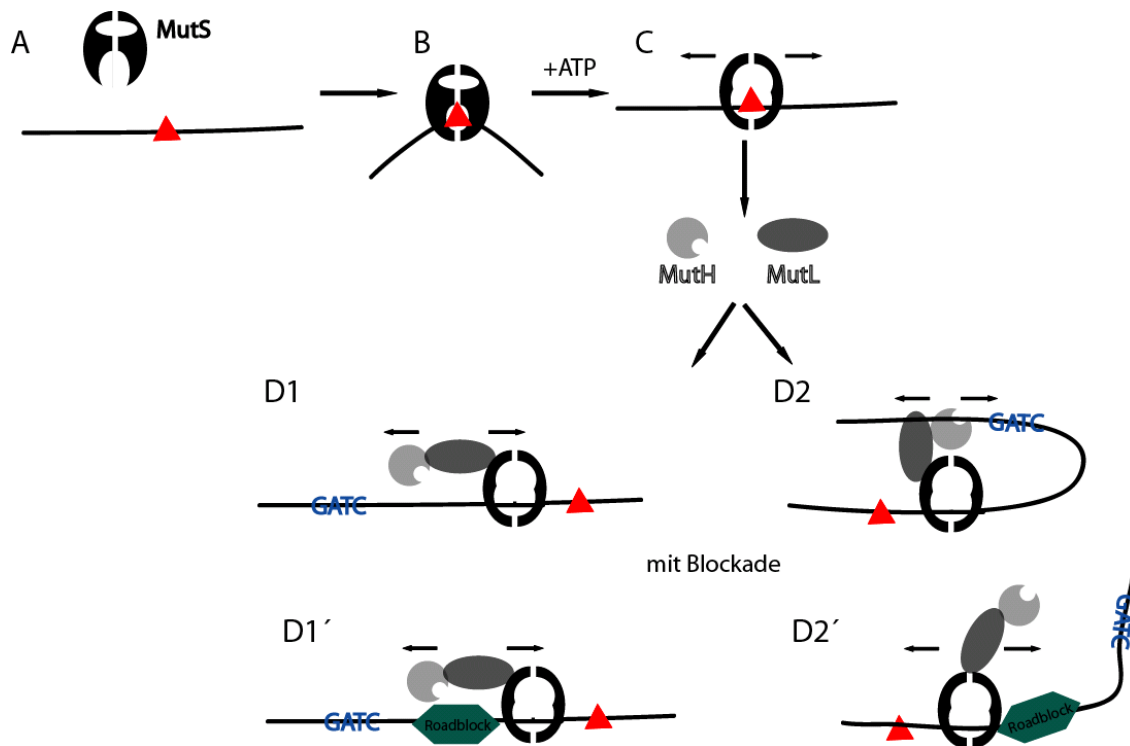
#### 4.4.4. Nach Erkennung der Fehlpaarung bewegt MutS sich von dieser weg

Die Ergebnisse aus den vorherigen Abschnitten weisen alle auf mobile Komponenten hin, in jedem Fall MutS, aber wahrscheinlich auch der tertiäre Komplex aus MutS, -L und -H auf der DNA. Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung eines neuen Aktivierungs-Modells ist die Klärung, ob MutS während der Weiterleitung des Aktivierungssignals an der Basenfehlpaarung bleibt oder diese verlässt. Bei der Bindung an eine Basenfehlpaarung besetzt das bakterielle MutS ca. 20 bp von der DNA, wie *footprint*-Experimente zeigen. Mit MutL und ATP vergrößert sich dieser Bereich auf ca. 100 bp (Iyer, 2006; Grilley *et al.*, 1989). Allen *et al.*, 1997 konnte zeigen, dass ein *mismatch*-gebundenes MutS eine 11 bp vom *mismatch* entfernte Schnittstelle der Endonuklease NheI schützt. Kurze Abstände zwischen Basenfehlpaarung und GATC-Erkennungssequenz (5, 12, 31 bp) waren außerdem schon in *in vitro*-Studien getestet worden und zeigten einen Anstieg der *mismatch*-Reparatur (Lu, 1987; Bruni *et al.*, 1988). In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden für den Abstand zwischen der Basenfehlpaarung und der GATC-Erkennungssequenz zwei verschiedene Längen gewählt: 2 und 12 bp. Die Experimente wurden mit zirkulären 505 bp langen *mismatch*-Substraten durchgeführt. Sie zeigten in beiden Fällen (Abstand 2 bp, 12 bp) eine Aktivierung von MutH. An der zwei Basenpaare entfernten GATC-Erkennungssequenz fand keine Doppelstrangspaltung, sondern nur noch Einzelstrangspaltung statt. MutS-unabhängige Spaltung von MutH bei 50 mM KCl zeigte allerdings, dass MutH auch ohne MutS, an einer GATC-Erkennungssequenz mit einem zwei Basen entfernten *mismatch*, nur noch einen Einzelstrangbruch initiieren, aber nicht mehr spalten kann. Festzuhalten ist, dass MutH auch aktiviert wird, wenn die Basenfehlpaarung nur zwei Basen von der GATC-Erkennungssequenz entfernt lokalisiert ist. Das heißt, MutS kann sich nach der Erkennung der Basenfehlpaarung von dieser wegbewegen.

## 4.5. Schlussfolgerung

Der Mechanismus der MutH-Aktivierung scheint komplexer zu sein als dass er durch eines der drei, bisher in der Literatur beschriebenen Modelle (*sliding*, *looping*, Polymerisation), erklärbar wäre. Es konnte bestätigt werden, dass MutS in der Lage ist sich auf der DNA zu bewegen. Offensichtlich bewegt sich das nach der *mismatch*-Erkennung aktivierte MutS von diesem weg und diffundiert entlang der DNA. Nur so lässt sich erklären, dass MutH, MutS-abhängig, in der Nähe der Fehlpaarung spalten kann. Wie genau sich der Komplex aus MutS, -L und -H ausbildet, ist nicht bekannt, allerdings stören nahe DNA-Enden, bezogen auf die GATC-Erkennungssequenz, die Aktivierung von MutH. Da die Methode zur Herstellung zirkulärer *mismatch*-Substrate mittlerweile etabliert und die Qualität der Substrate überprüft wurde, stehen für zukünftige Experimente Substrate ohne Enden zur Verfügung. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit gegen ein passives, dem Mechanismus der Restriktionsendonukleasen angelehntes *looping*-Modell sprechen, kann eine 3-D-Komponente während des Mechanismus nicht ganz ausgeschlossen werden. Kurze definierte DNA-*bending* oder *looping*-Strukturen zeigen andere Eigenschaften als Substrate für ein passives *looping*-Strukturen, welche die natürliche Beweglichkeit der DNA-Helix beeinflussen (Streptavidin, einzelsträngiger Bereich, SSB) könnten die Bildung dieser definierten DNA-*bending*-/*looping*-Strukturen in stärkerem Maß stören als die der großen passiv gebildeten *loops*. Zudem würde eine Unterbrechung der Signalweiterleitung durch einfache Blockaden auf der DNA sich im lebenden System als äußerst nachteilig erweisen, da „nackte“ DNA fast nicht vorkommt (Kolodner, 2007).

Deshalb wird das Modell aus Abbildung 4-5 vorgeschlagen. Es zeigt einen beweglichen Komplex aus MutS, -L und -H, der zusätzlich zur Fortbewegung durch Diffusion noch die Möglichkeit hat, durch den Raum zu agieren. Ermöglicht wird dies entweder nur durch den Umfang des Komplexes aus MutS, -L und -H oder mit einer zusätzlichen Biegung der DNA.



**Abb. 4-5: Modell der Kopplung von der *mismatch*-Erkennung mit der Strangdiskriminierung**

A: MutS bindet an die DNA; B: Nach der Erkennung der Fehlpaarung wird die DNA gebogen; C: Mit ATP findet die Umwandlung von MutS in eine *sliding clamp* statt; MutS bewegt sich von der Fehlpaarung weg; D1: Der aktive Komplex aus MutS, -L und -H bildet sich und MutH kann an der GATC-Erkennungssequenz spalten; D2: Die DNA wird für die Spaltung gebogen; D1': Die Blockade stoppt den beweglichen Komplex; D2': Durch die Blockade wird die DNA-Biegung erschwert

## 5 Literatur

- Acharya, S., P. L. Foster, et al. (2003). "The coordinated functions of the E. coli MutS and MutL proteins in mismatch repair." *Mol Cell* **12**(1): 233-46.
- Alani, E., J. Y. Lee, et al. (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**(18): 16088-94.
- Allen, D. J., A. Makhov, et al. (1997). "MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism." *Embo J* **16**(14): 4467-76.
- Au, K. G., K. Welsh, et al. (1992). "Initiation of methyl-directed mismatch repair." *J Biol Chem* **267**(17): 12142-8.
- 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,
- Beaulieu, M., Larson, G. P., Geller, L., Flanagan, S. D. & Krontiris, T. G. (2001). "PCR candidate region mismatch scanning: adaptation to quantitative, high-throughput genotyping." *Nucleic Acids Res* **29**, 1114-24.
- Ban, C., M. Junop, et al. (1999). "Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair." *Cell* **97**(1): 85-97.
- Ban, C. and W. Yang (1998). "Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis." *Cell* **95**(4): 541-52.
- Ban, C. and W. Yang (1998). "Structural basis for MutH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases." *The EMBO journal* **17**(5): 1526-34.
- Biswas, I., G. Obmolova, et al. (2001). "Disruption of the helix-u-turn-helix motif of MutS protein: loss of subunit dimerization, mismatch binding and ATP hydrolysis." *J Mol Biol* **305**(4): 805-16.
- Bjornson, K. P. and P. Modrich (2003). "Differential and simultaneous adenosine di- and triphosphate binding by MutS." *J Biol Chem* **278**(20): 18557-62.
- Bjornson, K. P., L. J. Blackwell, et al. (2003). "Assembly and molecular activities of the MutS tetramer." *J Biol Chem* **278**(36): 34667-73.
- Blackwell, L. J., Martik, D., Bjornson, K. P., Bjornson, E. S. & Modrich, P. (1998). "Nucleotide-promoted release of hMutS from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism." *J Biol Chem* **273**, 32055-62
- Blackwell, L. J., K. P. Bjornson, et al. (2001). "Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis." *J Biol Chem* **13**: 13.

- Bruni R, Martin D. (1988). "D(GATC) sequences influence *Escherichia coli* mismatch repair in a distance-dependent manner from positions both upstream and downstream of the mismatch." *Nucl Acids Res* 16 (11): 4875-4890.
- Calmann, M. A., A. Nowosielska, et al. (2005a). "The MutS C terminus is essential for mismatch repair activity in vivo." *J Bacteriol* 187(18): 6577-9.
- Calmann, M. A., A. Nowosielska, et al. (2005b). "Separation of mutation avoidance and antirecombination functions in an *Escherichia coli* mutS mutant." *Nucleic Acids Res* 33(4): 1193-200.
- Catto L. E., Ganguly S. et al. (2006). "Protein assembly and DNA looping by the FokI restriction endonuclease." *Nucleic Acids Res* 34 (6): 1711-1720.
- Catto L. E., Bellamy S.R. et al. (2008). "Dynamics and consequences of DNA looping by the FokI restriction endonuclease." *Nucleic Acids Res* 36 (6): 2073-2083.
- Cloutier T. E. & Widom J. (2005). "DNA twisting flexibility and the formation of sharply looped protein-DNA complexes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (10): 3645-3650.
- 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
- Freitag, S., Le Trong, I., Klumb, L., Stayton, P. S. & Stenkamp, R. E. (1997). "Structural studies of the streptavidin binding loop." *Protein Science* 6: 1157-66
- Feng, G. & Winkler, M. E. (1995). "Single-step purifications of His<sub>6</sub>-MutH, His<sub>6</sub>-MutL and His<sub>6</sub>-MutS repair proteins of *Escherichia coli* K-12." *BioTechniques* 19, 956-65
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, et al. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, D.C, ASM Press.
- Friedhoff, P., E. Thomas, et al. (2003). "Tyr212: a key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MutH." *J Mol Biol* 325(2): 285-97.
- Giron-Monzon, L., L. Manelyte, et al. (2004). "Mapping protein-protein interactions between MutL and MutH by cross-linking." *J Biol Chem* 279(47): 49338-45.
- Gradia, S., S. Acharya, et al. (1997). "The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch." *Cell* 91(7): 995-1005.
- Gradia, S., D. Subramanian, et al. (1999). "hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA." *Mol Cell* 3(2): 255-61.
- Grilley, M., Welsh, K. M. et al. (1989). "Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product." *J Biol Chem* 264(2): 1000-1004.



- Guarne, A., S. Ramon-Maiques, et al. (2004). "Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair." Embo J **23**(21): 4134-45.
- Halford, S. E., Gowers D. M. (2000). "Two are better than one." Nat. Struct. Biol., 7:705-707.
- Halford, S. E., Welsh, A. J. and Szczelkun, M. D. (2004). "Enzyme-mediated DNA looping." Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33, 1-24.
- 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
- Heo, S. D., Cho, M. (2007). "Steady-state ATPase activity of E. coli MutS modulated by its dissociation from heteroduplex DNA." Biochem Biophys Res Commun **364**(2): 264-269.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-74.
- Holmberg, A., Blomstergren A. et al. (2005). "The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures." Electrophoresis **26**(3): 501-510.
- Iyer, R. R., A. Pluciennik, et al. (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." Chem Rev **106**(2): 302-23.
- Jia Y., Bi L. et al. (2008). "Alpha-shaped DNA loops induced by MutS." Biochem Biophys Res Commun **372**(4): 618-622.
- Junop, M. S., G. Obmolova, et al. (2001). "Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair." Mol Cell **7**(1): 1-12.
- Junop, M. S., W. Yang, et al. (2003). "In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination." DNA Repair (Amst) **2**(4): 387-405.
- Lahue, R. S., K. G. Au, et al. (1989). "DNA mismatch correction in a defined system." Science **245**(4914): 160-164.
- Katiliene Z, Katilius E. et al. (2003). "Single molecule detection of DNA looping by NgoMIV restriction endonuclease." Biophys. J. **84** (6): 4053-4061.
- Kirsch, R. D. and E. Joly (1998). "An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes." Nucleic Acids Res. **26**(7): 1848-1850.

- Kolodner, R. D., Mendillo M. L., Putnam, C. D. (2007). "Coupling distant sites in DNA during DNA mismatch repair." Proc Natl Acad Sci. USA **104** (32): 12953-12954.
- Kosinski, J., I. Steindorf, et al. (2005). "Analysis of the quaternary structure of the MutL C-terminal domain." J Mol Biol **351**(4): 895-909.
- Kunkel, T. A. and D. A. Erie (2005). "DNA Mismatch Repair." Annu Rev Biochem **74**: 681-710.
- Lahue, R. S., K. G. Au, et al. (1989). "DNA mismatch correction in a defined system." Science **245**(4914): 160-4.
- Lamers, M. H., D. Georgijevic, et al. (2004). "ATP increases the affinity between MutS ATPase domains. Implications for ATP hydrolysis and conformational changes." J Biol Chem **279**(42): 43879-85.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, et al. (2000a). "The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch." Nature **407**(6805): 711-717.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, et al. (2000b). "The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch." Nature **407**(6805): 711-7.
- Lamers, M. H., H. H. Winterwerp, et al. (2003). "The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair." Embo J **22**(3): 746-56.
- Lee, J. Y., J. Chang, et al. (2005). "MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage." Mol Cell **20**(1): 155-66.
- Lohman, T. M. & Ferrari, M. E. (1994). "Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities" Annu Rev Biochem **63**: 527-70
- Loo, T. W. and D. M. Clarke (2001). "Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers." Journal of Biological Chemistry **276** (40): 36877-36880.
- Lu A. L. (1987). "Influence of GATC Sequences on *Escherichia coli* DNA Mismatch Repair In Vitro." Journal of Bacteriology **169** (3): 1254-1259.
- Manelyte, L., C. Urbanke, et al. (2006). "Structural and functional analysis of the MutS C-terminal tetramerization domain." Nucleic Acids Res **34** (18): 5270-9.
- Malkov, V. A., I. Biswas, et al. (1997). "Photocross-linking of the NH<sub>2</sub>-terminal region of Taq MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA." J Biol Chem **272** (38): 23811-7.
- Marshall, J. J., Gowers, D. M., Halford, S. E. (2007). "Restriction endonucleases that bridge and excise two recognition sites from DNA" J Mol Biol **367**(2): 419-31.

- Mendillo, M. L., D. J. Mazur, et al. (2005). "Analysis of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 complexes with DNA using a reversible DNA end-blocking system." *J Biol Chem* **280**(23): 22245-57.
- Mendillo, M. L., C. D. Putnam, et al. (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**(22): 16345-54.
- Modrich, P. and R. Lahue (1996). "Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology." *Annu Rev Biochem* **65**: 101-133.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction" *Methods Enzymol* **155**, 335-50
- Natrajan, G., M. H. Lamers, et al. (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**(16): 4814-21.
- Nowosielska, A. and M. G. Marinus (2008). "DNA mismatch repair-induced double-strand breaks." *DNA Repair (Amst)* **7**(1): 48-56.
- Obmolova, G., C. Ban, et al. (2000a). "Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA." *Nature* **407**(6805): 703-710.
- Obmolova, G., C. Ban, et al. (2000b). "Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA." *Nature* **407**(6805): 703-10.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein" *Protein Science*, **4**, 2411-23
- Pluciennik, A., Modrich, P. (2007). "Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair" *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:12709-12713
- Sacho E. J., Kadyrov F. A. et al. (2008). "Direct visualisation of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha" *Moll Cell* **29** (1): 112-121.
- Saiz L. & Vilar J. M. (2006). "DNA looping: the consequences and its control" *Struct. Biol.* **16** (3): 344-350.
- Schofield, M. J. and P. Hsieh (2003). "DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function." *Annu Rev Microbiol* **57**: 579-608.
- Sixma, T. K. (2001). DNA mismatch repair: "MutS structures bound to mismatches" *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 47-52.
- 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.

- Tessmer, I., Y. Yang, et al. (2008). "Mechanism of MutS searching for DNA mismatches and signaling repair." J Biol Chem.
- Thomas, E., A. Pingoud, et al. (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**(9): 1459-62.
- Viswanathan, M. and S. T. Lovett (1998). "Single-strand DNA-specific exonucleases in Escherichia coli. Roles in repair and mutation avoidance." Genetics **149**(1): 7-16.
- Wang, H. & Hays, J. B. (2003). "Mismatch repair in human nuclear extracts: effects of internal DNA-hairpin structures between mismatches and excision-initiation nicks on mismatch correction and mismatch-provoked excision." J Biol Chem **278**, 28686-93
- Wang, H. & Hays, J. B. (2004). "Signaling from DNA mispairs to mismatch-repair excision sites despite intervening blockades." EMBO J **23**, 2126-33
- Warren, J. J., T. J. Pohlhaus, et al. (2007). "Structure of the human MutS $\alpha$  DNA lesion recognition complex." Mol Cell **26**(4): 579-92.
- Welsh, K. M., A. L. Lu, et al. (1987). "Isolation and characterization of the Escherichia coli mutH gene product." J Biol Chem **262**(32): 15624-15629.
- Wu, T. H. & Marinus M. G. (1999). "Deletion Mutation Analysis of the *mutS* Gene in *Escherichia coli*." J Biol Chem **274** (9): 5948-5952.
- Yang, W. (2000). "Structure and function of mismatch repair proteins". Mutat Res **460**, 245-56.
- Yang, Y, Sass L. E. et al. (2005). "Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules: MutS-DNA interactions." Nucleic acids research **33** (13): 4322-34
- Yang, W. (2008). "Structure and mechanism for DNA lesion recognition." Cell Res **18**(1): 184-97.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro- (10 <sup>6</sup> )
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Alanin
AA	Acrylamid
AAP	Agaroseauftragspuffer
Abb.	Abbildung
<i>add</i>	auffüllen auf
Amp	Ampicilin
APS	Amoniumperoxosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
D	Aspartat
d	desoxy-
Da	Dalton
dd	didesoxy
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1, 4-Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
g	Gramm
H	Histidin

---

h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-I-thiogalaktopyranosid
k	Kilo- ( $10^3$ )
K	Lysin
Kan	Kanamycin
L	Leucin
l	Liter
LAP	Laemmligel-Auftragspuffer
LB	Luria-Bertani-
m	Milli
M	molar
min	Minute
N	Asparagin
n	nano- ( $10^{-9}$ )
NaAC	Natriumacetat
NEM	<u>N</u> - <u>E</u> thyl <u>m</u> aleimid
Ni-NTA	Nickel- <i>nitrilo-tri-acetic Acid</i>
OD <sup>xnm</sup>	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>
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SA	Streptavidin
sc	<i>supercoiled</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>

---

sec	Sekunde
STE	NaCl/Tris/EDTA-Puffer
t	Zeit
T	Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N',- Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>transformation-storage-solution</i>
u	<i>units</i>
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Als Dezimalzeichen wird in dieser Arbeit ein Punkt verwendet.