

**Untersuchungen am
methylgerichteten *mismatch*-Reparatursystem
MutHLS von *E. coli* zur Identifizierung der
Verbindung zwischen *mismatch*-Erkennung und
Strangdiskriminierung**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologen
Evangelos Thomas

angefertigt am Institut für Biochemie
des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen
unter Anleitung von Prof. Dr. Alfred M. Pingoud

Gießen, 2005

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), amerik. Soziologe u. Ökonom

„οἶδα οὐκ εἶδος...“
„Ich weiß, dass ich nichts weiß...“

Sokrates (469-399 v. Chr.), griech. Philosoph

Die vorliegende Arbeit im Studiengang Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde am Institut für Biochemie des Fachbereichs Biologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Alfred M. Pingoud in der Zeit von Januar 2001 bis April 2004 durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Alfred M. Pingoud
Institut für Biochemie, Fachbereich Biologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Korreferent: Prof. Dr. Ewald Beck
Institut für Biochemie, Fachbereich Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig 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.

Darmstadt, im Oktober 2005

(Evangelos Thomas)

Danksagungen

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Alfred M. Pingoud für die Aufnahme in das Institut für Biochemie danken und dafür, dass er stets freundlich und hilfsbereit auf mich zugeht und mich zu Höchstleistungen antrieb.

Herrn Prof. Dr. Ewald Beck danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, das er trotz vollen Terminkalenders auf sich genommen hat, sowie für die netteste aller bestrittenen Diplomprüfungen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Peter Friedhoff, der mir bei meinem Kampf mit dem MutHLS-System immer mit Rat und Tat zur Seite stand und auch aus jedem meiner Fehlschläge noch etwas Positives gewinnen konnte.

Unserer TA Ina Steindorf, für ihren stetigen Einsatz für unser Team und ihre stets heitere Art.

Many thanks to my lab-colleges Lois, Majec, Iwonna and Laura for their friendship, the fun and for improving my language skills.

Ein großer Dank gebührt auch Frau Dr. Vera Pingoud und Frau Dr. Kristin Eisenschmidt für Ihre hervorragende Unterstützung bei den „road block“-Experimenten und die fruchtbaren Diskussionen.

Frau Dr. Andrea Hermann und Herrn Dr. Marc Brackerts danke ich für ihren Aufwand und Mühen die Sie bei der Korrektur dieser Arbeit hatten und natürlich für Ihre Freundschaft.

Nicht vergessen werden sollen meine übrigen Biologen Sabine, Steffi, Gregor, Dirk, Christoph und Shawn für die tollen Jahre des gemeinsamen Studierens und für ihre Freundschaft, die trotz der Distanz zwischen uns nicht klein zu kriegen ist.

Bei allen sonstigen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima während meiner Diplom- und Promotionsarbeit bedanken.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως το χρωστώ στους αγαπημένους μου γονείς, οι οποίοι με τη συνεχή υποστήριξη τους και την πίστη τους σε μένα, μου έδωσαν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω το επαγγελμα των ονείρων μου.

Publikationen

- 1.) Friedhoff P., **Thomas E.** und Pingoud A., (2003)
“Tyr212: a key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MutH.”
J Mol Biol. 2003 Jan 10;325(2):285-97.
- 2.) **Thomas E.**, Pingoud A. und Friedhoff P., (2002)
“An efficient method for the preparation of long heteroduplex DNA as substrate for mismatch repair by the Escherichia coli MuthLS system.”
Biol Chem. 2002 Sep;383(9):1459-62.
- 3.) Friedhoff P., Sheybani B., **Thomas E.**, Merz C. und Pingoud A., (2002)
“Haemophilus influenzae and Vibrio cholerae genes for MutH are able to fully complement a MutH defect in Escherichia coli.”
FEMS Microbiol Lett. 2002 Feb 19;208(1):123-8.

Poster Präsentation

- 1.) **Thomas E., (2001)**
”An efficient method for the preparation of long heteroduplex DNA containing defined mismatch base pairs using λ -Exonuklease”
PW5-012; 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies
30.06-05.07.2001

Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon^{x \text{ nm}}$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
μ	Mikro- (10^{-6})
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
AAP	Agaroseauftragspuffer
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ci	Curie
cm	Zentimeter
d	desoxy-
d.h.	das heißt
ds	doppelsträngig (<i>double strand</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1, 4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
k	Kilo- (10^3)
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LAP	Laemmligel-Auftragspuffer
LB	Luria-Bertani-
m	milli- (10^{-3})
M	molar
min	Minute(n), `
MMR	methyl-gerichtete <i>mismatch</i> -Reparatur
n	nano- (10^{-9})
NTP	Nukleosidtriphosphat
$OD^{x \text{ nm}}$	optische Dichte bei x nm Lichtwellenlänge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
phos	phosphoryliert
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
ss	einzelsträngig (<i>single strand</i>)
t	Zeit
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
U	units (Enzymaktivität)

UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumenteile
W	Watt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Nicht in diesem Verzeichnis aufgeführte Chemikalien werden unter Verwendung der geltenden IUPAC Nomenklatur benannt bzw. abgekürzt. Im internationalen wissenschaftlichen Sprachgebrauch verwendete englische Fachbegriffe sind durch Kursivdruck gekennzeichnet.

Als Dezimaltrennzeichen wird in dieser Arbeit ein Komma verwendet.

Zum Teil werden Oligodesoxyribonukleotide in dieser Arbeit auch als „Oligonukleotide“ bezeichnet.

1	EINLEITUNG -----	1
1.1	Übersicht über die postreplikative mismatch-Reparatur -----	1
1.2	Ursachen für Basenfehlpaarungen in der DNA -----	1
1.3	Mechanismen der postreplikativen mismatch-Reparatur -----	3
1.3.1	Bedeutung von MutS bei der mismatch-Erkennung -----	3
1.3.2	Strangdiskriminierung -----	7
1.3.3	Die Rolle von MutL -----	8
1.3.4	Reparaturprozesse nach der Strangdiskriminierung -----	8
1.4	Kontroverse Aspekte des MutHLS-System -----	9
2	ZIELSETZUNG -----	14
3	ERGEBNISSE -----	18
3.1	Verwendung langer mismatch-Substrate im MutHLS-System -----	18
3.1.1	Untersuchung des MutL-MutH Interaktion -----	18
3.1.2	Identifikation der „methylierungssensitiven“ Aminosäureresten von MutH -----	19
3.2	Kritische Versuchsparameter des MutHLS-Systems -----	21
3.2.1	Einfluss von KCl auf die MutHLS-Reaktion -----	21
3.2.2	Einfluss der KCl-Konzentration auf die MutHL-Reaktion -----	23
3.2.3	Längenabhängigkeit des Substrats auf die MutHLS-Reaktion -----	24
3.2.4	Cis- gegenüber trans-Aktivierung -----	26
3.2.5	Vergleich der cis- und trans-Aktivierung bei verkürzten mismatch-Substraten -----	28
3.3	MutS-DNA-Crosslink -----	31
3.3.1	Planung eines mismatch-Substrat für ein photocrosslinking -----	31
3.3.2	Herstellung des crosslink-Substrats -----	32
3.3.3	Einfluss eines nicks im mismatch-Substrats auf die MutHLS-Reaktion -----	34
3.3.4	DNA-Bindung von MutS -----	35
3.3.5	Kontrolle der Oligoduplexbildung -----	35
3.3.6	Optimierung der crosslink-Ausbeute mit Oligoduplex-Substraten -----	37
3.3.7	Verwendung von Oligonukleotiden mit multiplen 5'-Ioduridinen -----	38
3.3.8	Vergleich der crosslink-Ausbeute bei Verwendung eines Hetero- bzw. Homoduplex -----	39
3.4	Variabler Abstand zwischen mismatch und d(GATC) -----	41
3.4.1	Mismatch-Substrat-Herstellung mit zwei d(GATC)-Sequenzen -----	41
3.4.2	MutHLS-Reaktion auf mismatch-Substraten mit variablen Abständen zur d(GATC)-Sequenz -----	42
3.4.3	Mögliche Erklärung der 10 bp entfernten Spaltung durch MutHLS -----	45
3.4.4	Vergleich der Spaltung an der 10 bp entfernten d(GATC)-Sequenz bei einem Homo- und Heteroduplex in Kompetition -----	46
3.5	Roadblock auf der DNA -----	48
3.5.1	Mögliche Strategien für die Bildung einer Blockade zwischen mismatch und d(GATC)-Sequenz -----	48
3.5.2	Planung eines mismatch-Substrats mit einer TFO-Erkennungssequenz -----	49
3.5.3	Überprüfung der Stabilität der Tripelhelix-Bildung -----	50
3.5.3	MutHLS-Assay auf einem mismatch-Substrat mit angelagerter Tripelhelix -----	51
3.5.4	Stabilität der Tripelhelix während der MutHLS-Reaktion -----	53
3.5.5	Überprüfung des Substrats auf zusätzliche unspezifische mismatches -----	54
3.5.6	Roadblock durch ein inaktives Restriktionsenzym -----	57
3.5.7	Bindungsaktivität von SsoII K182A -----	57
3.5.8	Einfluss der SsoII-Bindung auf die MutHLS-Reaktion -----	58
4	DISKUSSION -----	60
4.1	Übersicht über die postreplikative mismatch-Reparatur -----	60
4.2	Vorteile eines definierten mismatch-Substrates -----	61
4.3	Verknüpfung von MutS am mismatch -----	62
4.4	Untersuchungen zum looping-Modell -----	65
4.5	Ausschluss des sliding clamp-Modell -----	69
4.6	Formulierung eines neues Modell -----	71
5	MATERIAL UND METHODEN -----	74
5.1	Material -----	74
5.1.1	Chemikalien -----	74
5.1.2	Radiochemikalien -----	74
5.1.3	Enzyme -----	75
5.1.4	Sonstige Enzyme -----	76
5.2	Mikrobiologische Arbeiten -----	76
5.2.1	Bakterienstämme -----	76
	JM109 -----	76
	HMS174(λDE3) -----	77
5.2.2	Plasmide -----	77
	pET15b-XhoI und -HindIII -----	77
5.2.3	Glycerinkulturen -----	78

5.3	<i>Proteinaufreinigung MutHLS</i> -----	78
5.3.1	Zellen ernten-----	78
5.3.2	Zellaufschluss -----	79
5.3.3	Aufreinigung mit Ni-NTA-Säulchen-----	79
5.3.4	Aufreinigung mittels Gelfiltrationssäule-----	79
5.3.5	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration -----	80
5.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i> -----	80
5.4.1	Plasmid-DNA-Präparationen -----	80
5.4.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren -----	80
5.4.3	Gelelektrophoretische Analysen -----	81
5.4.3.1	Agarose-Gelelektrophorese -----	81
5.4.3.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese -----	81
5.4.3.3	Denaturierende Harnstoff-PAGE-----	81
5.4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese -----	82
5.4.3.5	Kapillarelektrophorese-----	82
5.4.3.6	Protein-Längenmarker -----	83
5.4.3.7	DNA-Längen-Marker -----	83
5.4.4	PCR-Reaktion-----	83
5.4.4.1	Standard-PCR -----	84
5.4.4.2	PCR-Produkte für die <i>mismatch</i> -Substrate-----	84
5.4.4.3	PCR-Produkte für die Crosslink-Substraten -----	85
5.4.4.4	Zielgerichtete Mutagenese -----	85
5.4.4.4	Plasmid-Aufreinigung durch Ethanol-Fällung-----	88
5.5	<i>Substratherstellung</i> -----	88
5.5.1	Herstellung der <i>mismatch</i> -Substrate-----	88
5.5.2	Methylierung -----	90
5.5.3	Herstellung der Crosslink-Substrate-----	90
5.5.4	Präparation der Oligoduplices-----	91
5.6	<i>MutHLS-Versuche</i> -----	91
5.6.1	Standard-MutHLS-Assay -----	91
5.6.2	Probenaufbereitung der MuthLS-Ansätze -----	92
5.6.3	Standard-MutHL-Assay-----	92
5.6.4	MutHLS-Assay mit vorgespaltene <i>mismatch</i> -Substraten -----	93
5.6.5	UV-Bestrahlung-----	93
5.7	<i>Blockade zwischen mismatch und d(GATC)-Sequenz</i> -----	93
5.7.1	Erzeugung der Tripelhelix -----	93
5.7.2	<i>SsoII-shift</i> -----	94
6	ZUSAMMENFASSUNG -----	95
7	LITERATURVERZEICHNIS -----	96

1 Einleitung

1.1 Überblick über die postreplikative *mismatch*-Reparatur

Die DNA *mismatch* Reparatur (MMR) entwickelte sich schon sehr früh während der Entstehung der Organismen und existiert seitdem mit hoher Konservierung in fast allen Lebensformen, angefangen bei den Prokaryonten bis hin zu höher entwickelten Eukaryonten.

Die Hauptaufgabe des MMR-Systems ist die Beseitigung von Basenfehlpaarungen (*mismatches*) in der DNA, z.B. G-T, oder kurze Insertionen und Deletionen (*Insertion / Deletion Loops*; IDL) (Modrich, 1996). Alle diese auftretenden *mismatches* haben gemeinsam, dass sie ohne Reparatur eine Fehlinformation in einem der DNA-Stränge entstehen lassen, die nach einer Replikation und Zellteilung als Mutation im Tochtergenom genetisch fixiert wird.

Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass Defekte im MMR System mit verschiedenen Formen von Krebs korrelieren, unter anderem mit dem erblich-bedingten nicht-polypösen Dickdarm-Karzinom (HNPCC) (Jiricny, 2003).

Bei Bakterien ist bei Fehlern im Reparatursystem eine stark erhöhte Mutationsrate zu beobachten, die sich in einem Mutatorphenotyp sichtbar wird. Diese stark erhöhte Mutationsrate führt zu Wachstumsnachteilen oder erhöhten Letalität und ist somit nachteilig für ein Bakterium (Funchain, 2000). Gleichzeitig unterstützt die dadurch bedingte Gendiversität aber auch die Anpassung einer Bakterienpopulation an veränderte Umweltbedingungen, wie z.B. Nahrungsmangel oder Antibiotika, verbunden mit der Ausbildung von Resistenzen. Bei einigen pathogenen *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen konnte nachgewiesen werden, dass ein Mutatorphenotyp die Anpassung an die Wirtsumgebung unterstützt (LeClerc, 1996), was somit als ein evolutionärer Vorteil verstanden werden kann.

Bei Organismen mit niedrigerer Fortpflanzungsrate verschlechtern Mutationen meist die Lebensbedingungen, so dass hier durch die Entwicklung und Konservierung der verschiedenen DNA-Reparatursysteme eine möglichst geringe Mutationsrate aufrechterhalten wird.

1.2 Ursachen für Basenfehlpaarungen in der DNA

Häufigste Ursache für das Auftreten eines *mismatch* sind Einbaufehler während der DNA-Replikation. Die Replikation ist für gewöhnlich ein äußerst akkurater Vorgang der DNA-

Synthese. Trotz der Einbaurate von durchschnittlich 1000 Nukleotiden pro Minute, kommt es nur zu einem fehlerhaften Einbau auf 10^5 eingebauten Nukleotiden während einer Zellteilung (Kunkel, 1992). Diese Präzision wird zum einen durch die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaare (A-T und G-C) im aktiven Zentrum der DNA-Polymerase erreicht. Die thermodynamische Stabilität der zwei (A-T) oder drei (G-C) gebildeten Wasserstoffbrücken zwischen dem einzubauenden Nukleosidtriphosphat und der ersten nicht-gepaarten Base der DNA, begünstigen dabei den Einbau des korrekten Nukleotids (Jiricny, 1998). Wird trotzdem ein falsches Nukleotid eingesetzt, ist das weitere Vorgehen der Polymerase-Reaktion ineffizient und die Synthese kommt an dieser Position zum Erliegen. In der Folge wird die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wirksam, die durch Spaltung der Phosphodiesterbindung das falsch eingebaute Nukleotid entfernt. Diese Art des Korrekturlesens (*proofreading*) ist hauptsächlich für die geringen Fehlerraten bei der Replikation verantwortlich (Kunkel, 1992). In seltenen Fällen kann es aber vorkommen, dass ein *mismatch* von der *proofreading*-Aktivität der DNA-Polymerase nicht erkannt wird. Dies ereignet sich am häufigsten bei der Basenpaarung G-T, weil dieses *wobble*-Basenpaar durch zwei Wasserstoffbindungen stabilisiert wird und die DNA-Struktur dabei nur geringfügig verändert ist (Hunter, 1987). Andere Basenfehlpaarungen treten prozentual gesehen seltener auf.

Eine weitere Möglichkeit zur *mismatch*-Entstehung findet sich beim Auftreten mehrerer identischer Basen oder Basenabfolgen, wie es etwa bei der Mikrosatelliten-DNA von Eukaryonten die Regel ist. Hier kann es bei der Polymerase-Reaktion zu einem Verrutschen des Leserasters kommen (*slippage*), welches dann zu einer Insertion bzw. Deletion von Nukleotiden in einem der Stränge führt (Jiricny, 2000). Dies wird als Hauptursache für die Ausbildung von IDLs angesehen. Eine Auswahl verschiedener *mismatch*-Typen, ihre Entstehung und ihre Folgen bei nicht erfolgter Reparatur sind in Abbildung 1-1 dargestellt. Andere Ursachen für die *mismatch*-Entstehung sind Rekombinationsereignisse. Ein geringer Teil der „Fehler“ entsteht z.B. bei *crossing over* Ereignissen von nicht vollständig homologen DNA-Abschnitten, wie es häufig bei Eukaryonten mit heterozygoten Allelen oder mit *multicopy genes* vorkommt (Modrich, 1997).

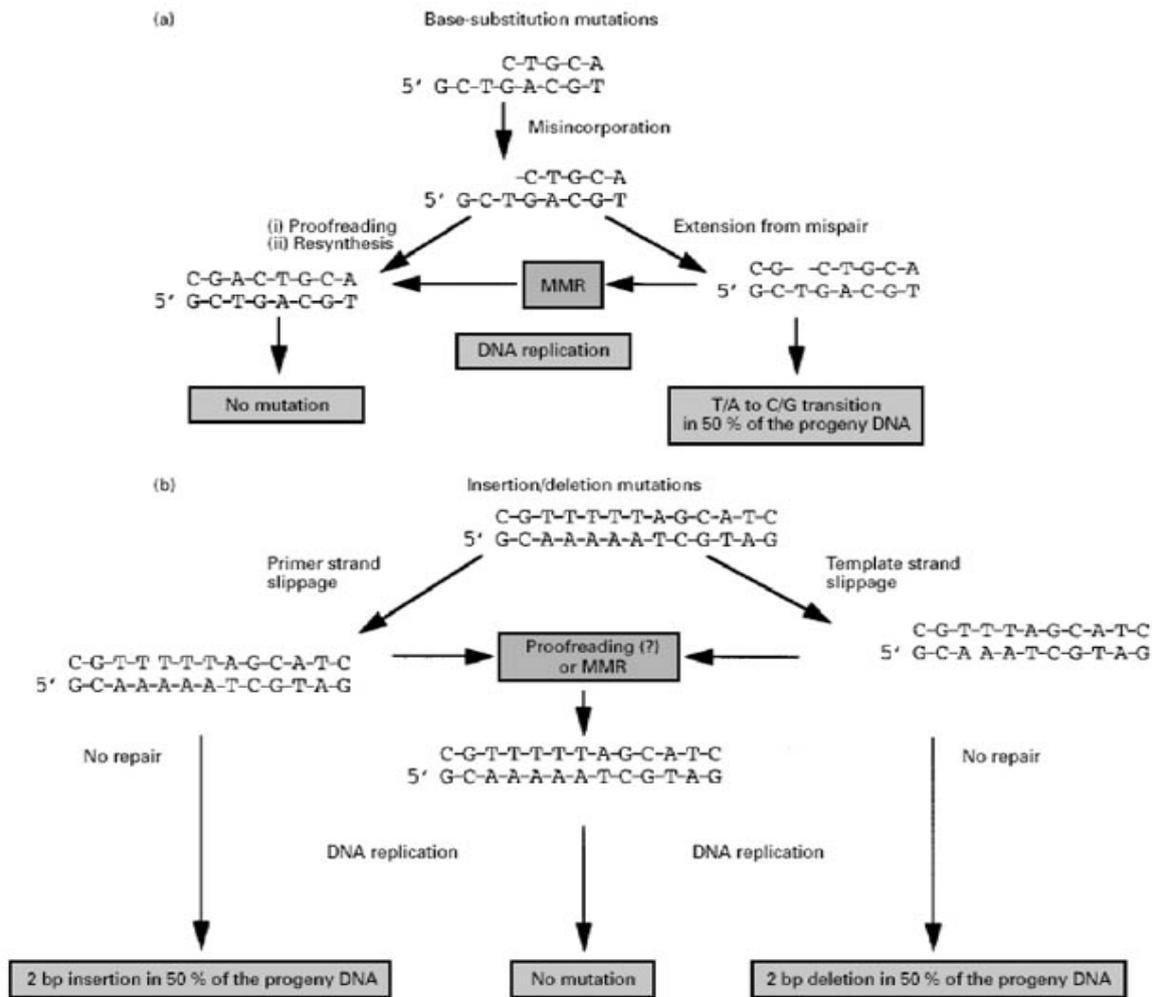


Abbildung 1-1: Mutationsvermeidung durch postreplikative mismatch-Reparatur

Eine Basenfehlpaarung (a) oder ein IDL (b) kann nach einer DNA-Replikation ausgebildet werden. Ohne Reparatur kommt es in der folgenden Replikationsrunde zur Etablierung einer Punktmutation (a) oder einer Leserasterverschiebung (b) in einem der Tochterstränge (Marra, 1999).

MMR Proteine sind außerdem an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt, die durch UV-Strahlung, reaktive Sauerstoff-Spezies oder alkylierende Substanzen entstehen. Dabei interagieren sie mit Komponenten anderer DNA-Reparatursysteme wie z.B. die *Nucleotide Excision Repair* (NER) oder *Base Excision Repair* (BER) (Buermeyer, 1999).

In Zahlen ausgedrückt ist ein funktionsfähiges MMR System in der Lage die Mutationsrate der DNA um das 1000-fache zu reduzieren (Harfe, 2000)

1.3 Mechanismen der postreplikativen mismatch-Reparatur

1.3.1 Bedeutung von MutS bei der mismatch-Erkennung

Der erste Schritt der mismatch-Reparatur ist die Erkennung und Bindung der Fehlpaarung durch das Enzym MutS oder eines MutS-Homologs. Bei diesem Enzym ist die C-terminale

Region stark konserviert. Hier ist das katalytische Zentrum für die ATPase-Aktivität lokalisiert. Die Struktur der ATPase-Domäne besitzt große Homologie zu den Strukturen der ABC Transporter Superfamilie, zu der unter anderem auch das an der NER beteiligte Enzym UvrA gehört (Obmolova, 2000). Die ATP-Bindung, nicht aber die ATP-Hydrolyse, ist für die *mismatch*-Bindung von MutS wichtig (Iaccarino, 1998). Bei der Bindung des *mismatch* spielt der Aminosäurerest von Phe36 bei MutS von *E. coli* oder des entsprechende Äquivalents von *T. aquaticus* eine essentielle Rolle (Malkov, 1997). Durch die Veröffentlichung der Ko-Kristallstrukturen des Eco-MutS (Lamers, 2000) und Taq-MutS (Obmolova, 2000) konnten genauere Einblicke in den Prozess der *mismatch*-Erkennung gefunden werden (siehe Abb. 1-2). MutS bindet an DNA mit einem *mismatch* als Homodimer und nimmt dabei eine Form an, die an betende Hände erinnert; „*The praying hands of fidelity*“ (Jiricny, 2000). Die DNA liegt in dieser Struktur zwischen den „Fingern“ und den „Daumen“ eingebettet. An dem eigentlichen Bindungsvorgang des *mismatch* ist aber nur einer der beiden Monomere involviert. Dieser interagiert mit der hier verwendeten G-T-Fehlpaarung innerhalb der kleinen Furche der DNA. Dabei kommt es zu einem Kontakt des essentiellen Phenylalanin 36 mit dem Thymin des *mismatch*. Die DNA ist an dieser Position stark geknickt (ca. 60°), was den Rückschluss zulässt, dass das Biegen der DNA eine wichtige Rolle für die *mismatch*-Erkennung spielen könnte.

Beim *mismatch*-bindenden Monomer ist die ATPase-Domäne mit ADP besetzt im Gegensatz zu dem zweiten Monomer. Funktionell gesehen handelt es sich bei MutS daher um ein Heterodimer.

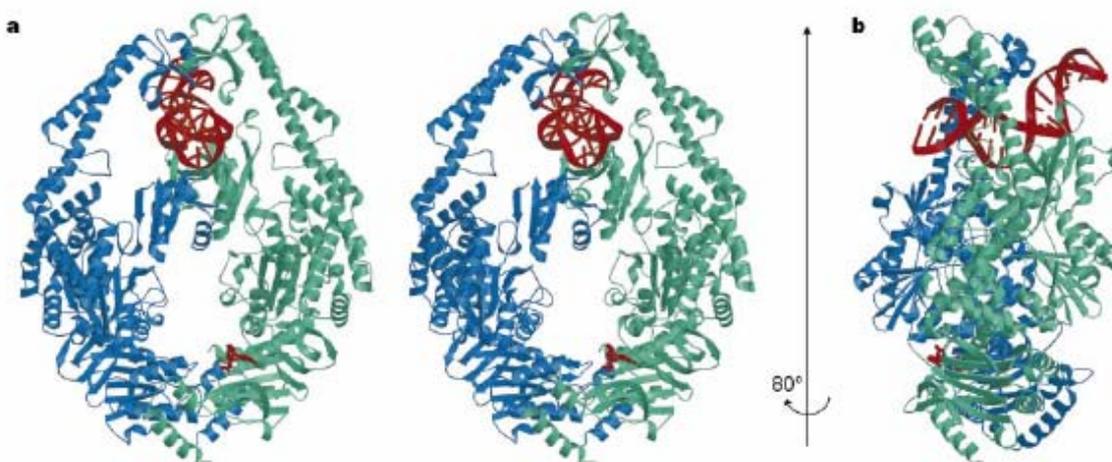


Abbildung 1-2: Ko-Kristallstruktur von MutS-DNA

a) Stereo-Ansicht frontal; b) Seitenansicht, um 80° gedreht; DNA und ADP sind rot, das den *mismatch*-bindende Monomer hellgrün und das zweite blau gefärbt. (Lamers, 2000)

Die Hauptfunktion von MutS ist die Erkennung der verschiedenen *mismatch*-Arten. Dabei hat die Art der Fehlpaarung Einfluss auf die Effizienz der Erkennung und damit letztlich auf die Reparatur. MutS aus *E. coli* z.B. erkennt 11 von 12 Nicht-Watson-Crick-Fehlpaarungen (siehe Abb. 1-3), sowie IDLs mit bis zu vier ungepaarten Basen (Jiricny, 1998).

<i>mismatch</i>	Relative Reparaturrate (in %)
G-T	100
A-C	54
A-A	74
G-G	66
A-G	61
T-C	62
T-T	68
C-C	<5

Abbildung 1-3: Reparatureffizienz verschiedener *mismatches* in *E. coli*

Abhängigkeit der MMR bei *E. coli* vom Typ der Basenfehlpaarung. Es sind 8 der 12 Möglichen dargestellt. Die relative Reparaturrate aller dargestellten Basenfehlpaarungen wurde in Bezug auf die Rate des am effektivsten reparierten *mismatch* (GT) berechnet (modifiziert nach Friedberg, 1995).

Der Sequenzkontext, in dem der *mismatch* auftritt, spielt für die Effizienz der Erkennung eine Rolle (Modrich, 1991), genauso wie die Topologie des DNA-Substrates. Lineare DNA ist z.B. ein schlechteres Substrat für die Reparatur als *supercoiled* DNA (Au, 1992).

Die bei Eukaryonten vorkommenden MutS-Homologe sind im Gegensatz zum universell agierenden MutS von *E. coli* auf das Erkennen bestimmter Basenfehlpaarungen spezialisiert. Die aktiven Enzyme lagern sich zu verschiedenen Heterodimeren zusammen, die je nach Zusammensetzung unterschiedliche *mismatch*-Typen oder IDLs binden können. Einige Heterodimere übernehmen eine unterstützende Funktion beim *crossing over* während der Meiose. Von anderen ist die Funktion noch nicht geklärt (siehe Abb. 1-4).

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Funktion des homologen Eukaryonten Proteins
MutS	MSH1	?	DNA-Reparatur in Mitochondrien
"	MSH2	MSH2 ^a	Reparatur von <i>mismatches</i> und IDLs mit MSH6 oder MSH3
"	MSH3	MSH3	IDL-Reparatur mit MSH2
"	MSH4	MSH4	wirksam bei Meiose mit MLH1
"	MSH5	MSH5	wirksam bei Meiose mit MLH1
"	MSH6	MSH6 ^a	Reparatur von <i>mismatches</i> und IDLs mit MSH2
MutL	MLH1	MLH1 ^a	<i>mismatch</i> -Reparatur
"	PMS1	PMS2 ^a	<i>mismatch</i> -Reparatur mit MLH1
"	MLH2	PMS1 ^a	Funktion nicht klar aber Interaktion mit MLH1
"	MLH3	MLH3	wahrscheinlich IDL-Reparatur mit MLH1
MutH	?	?	?

Abbildung 1-4: „Mut“-Homologe in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens*

Gegenübergestellt sind die bisher gefundenen zum MutHLS-System von *E. coli* homologen Enzyme der Bäckerhefe und des Menschen mit ihrer bekannten Funktion (modifiziert nach Buermeyer, 1998). ^a= wurde mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht; ? = bisher keine homologen Proteine nachgewiesen

1.3.2 Strangdiskriminierung

Beim Auftreten eines *mismatch* wird das MMR-System mit einem schwerwiegenden Problem konfrontiert. Die Basen eines *mismatch* unterscheiden sich in keinster Weise von den regulär eingebauten Basen. Die Aufgabe für die Reparaturenzyme besteht zunächst darin, den *mismatch* als solchen zu identifizieren und dann den neusynthetisierten und fehlerhaften Tochterstrang vom alten und korrekten Mutterstrang zu unterscheiden. Diese Strangdiskriminierung wird bei einigen Prokaryonten wie z.B. *E. coli* durch den Methylierungs-Status der DNA erreicht. Bei vielen Prokaryonten ist die DNA spezifisch an einer bestimmten Basensequenz methyliert, was als Schutz vor den eigenen Restriktionsenzymen dient. Weiterhin wird die Methylierung bei der Replikation als Kontrollmechanismus für schon replizierte Bereiche verwendet (Bakker, 1989). Dieser letzte Aspekt wird bei *E. coli* durch die *dam*-Methylierung erreicht. Bei diesem gram-negativen Bakterium werden alle Adenine in der Sequenz d(GATC) von der DNA-Adenosin-N⁶-Methyltransferase, kurz *dam*, durch eine Methylgruppe modifiziert. Während einer Replikation wird die vollmethylierte DNA-Helix zwischen den entstehenden Tochtermolekülen aufgeteilt und es entstehen zwei hemimethylierte Doppelstränge. Ein hemimethylierter Startpunkt der Replikation, der so genannte *ori* (*origin of replication*), wird von der Replikationsmaschinerie nicht mehr aktiviert, was einen sofortigen Start einer neuen Replikationsgabel verhindert. Die Remethylierung des Strangs erfolgt kurz nach der Beendigung der Replikation. Innerhalb des Zeitfensters des Replikationsendes und der Methylierung können Reparaturenzyme eindeutig zwischen dem alten, methylierten und dem neuen, nicht-methylierten DNA-Strang unterscheiden. Die eigentliche Strangdiskriminierung erfolgt durch die Endonuklease MutH, indem der nicht-methylierte Strang selektiv an d(GATC) gespalten wird (*nick*).

Das postreplikative *mismatch*-Reparatur-System bei Eukaryonten ist wesentlich komplexer aufgebaut als bei den Prokaryonten, da hier verschiedene *mismatch*-Typen durch unterschiedliche MutS-Heterodimere detektiert werden (siehe Abb. 1-4). Allerdings oder gerade deswegen ist das eukaryote MMR-System weit weniger gut charakterisiert. Seine wichtige Bedeutung zeigt sich jedoch dadurch, dass z.B. Mutationen in den humanen Homologen von MutS und MutL zu einer dramatisch erhöhten Instabilität von Mikrosatellitensequenzen führen und damit Ursachen für bestimmte Tumore sind, wie z.B. dem erblich-bedingten nicht-polypösen Dickdarm-Karzinom (HNPCC, auch als Lynch-Syndrom bezeichnet) (Modrich, 1994). Bei den Eukaryonten kann die Strangdiskriminierung

anders als bei *E. coli* nicht über die Methylierung definiert werden, da diese auf Grund ihrer Funktion sowohl im Zellzyklus als auch Gewebespezifisch variabel ist.

Bei den meisten Eukaryonten wird die Methylierung hauptsächlich für die Genregulation und bei höheren Eukaryonten für die Embryogenese verwendet. Daher verteilt sich die Methylierung der DNA nach einem gewebs- und entwicklungsspezifischen Muster. Man vermutet, dass die Strangdiskriminierung hier durch enge Kopplung der Replikation mit der *mismatch*-Reparatur erfolgt (Jiricny, 1998). Solch ein Mechanismus unterstützt auch die Beobachtung, dass einige Bakterien und Eukaryonten auch ohne DNA-Methylierung trotzdem über eine effektive postreplikative *mismatch*-Reparatur verfügen.

1.3.3 Die Rolle von MutL

Eine wichtige Komponente der postreplikativen *mismatch*-Reparatur ist das ebenfalls mit einer ATPase-Domäne ausgestattete Enzym MutL beziehungsweise seine Homologe (Ban, 1998). Die Funktion dieses Enzyms in den verschiedenen Organismen ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass MutL die Rolle des sog. "*molecular matchmakers*" übernimmt, also ein Protein das unter ATP-Hydrolyse die Konformation anderer DNA-bindender Proteine verändert und damit deren Aktivität stimuliert (Sancar, 1993). Im MMR-System kann MutL mit dem MutS-*mismatch*-Komplex in einer ATP-verbrauchenden Reaktion interagieren und damit die Effizienz der *mismatch*-Bindung erhöhen (Lamers, 2000). Bei *E. coli* konnte gezeigt werden, dass MutL auch für die Aktivierung der an der Strangdiskriminierung beteiligten Endonuklease MutH verantwortlich ist (Lahue, 1989). Eine ähnliche Wirkungsweise bei Eukaryonten ist noch nicht gefunden worden, da hier nach heutigem Stand der Forschung kein MutH-Homolog existiert. Eine weitere wichtige Aufgabe von MutL ist die Beteiligung an der Rekrutierung von Helikasen und Exonukleasen an der durch MutH eingeschnittenen Stelle (Mechanic, 2000).

1.3.4 Reparaturprozesse nach der Strangdiskriminierung

Einige wichtige Details des *mismatch*-Reparatursystems von *E. coli* wurden mittlerweile experimentell genauer charakterisiert. Eine große Hilfe war dabei die Präparation der drei Basiskomponenten MutH, L, und S in rekombinanter Form in *E. coli* (Feng, 1995), die es ermöglichte, die molekularen Mechanismen des MutHLS-Systems *in vitro* zu verfolgen. So ließen sich auch die enzymatischen Reaktionen, die nach der Strangdiskriminierung ablaufen, nachvollziehen. Die Strangdiskriminierung beginnt mit der Spaltung durch MutH in dem

nicht-methylierten Strang an der 5'-Position einer d(GATC)-*Sequenz* (*nicking*). Dieses *nicking* kann sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung vom *mismatch* erfolgen, in einer Distanz von bis zu 1 kb (Lahue, 1987; Cooper, 1993) und dient als Eintrittsstelle für die Helikase UvrD, die anschließend den DNA-Doppelstrang in Richtung Basenfehlpaarung entwindet (siehe Abb. 1-5). Während der frei werdende einzelsträngige DNA-Bereich des Mutterstranges durch SSB-Proteine (*single strand binding-protein*) stabilisiert wird, verdaut eine Exonuklease den losen Einzelstrang bis zum *mismatch*. Dabei kommen in Abhängigkeit von der Richtung des Verdau unterschiedliche Exonukleasen zum Einsatz.

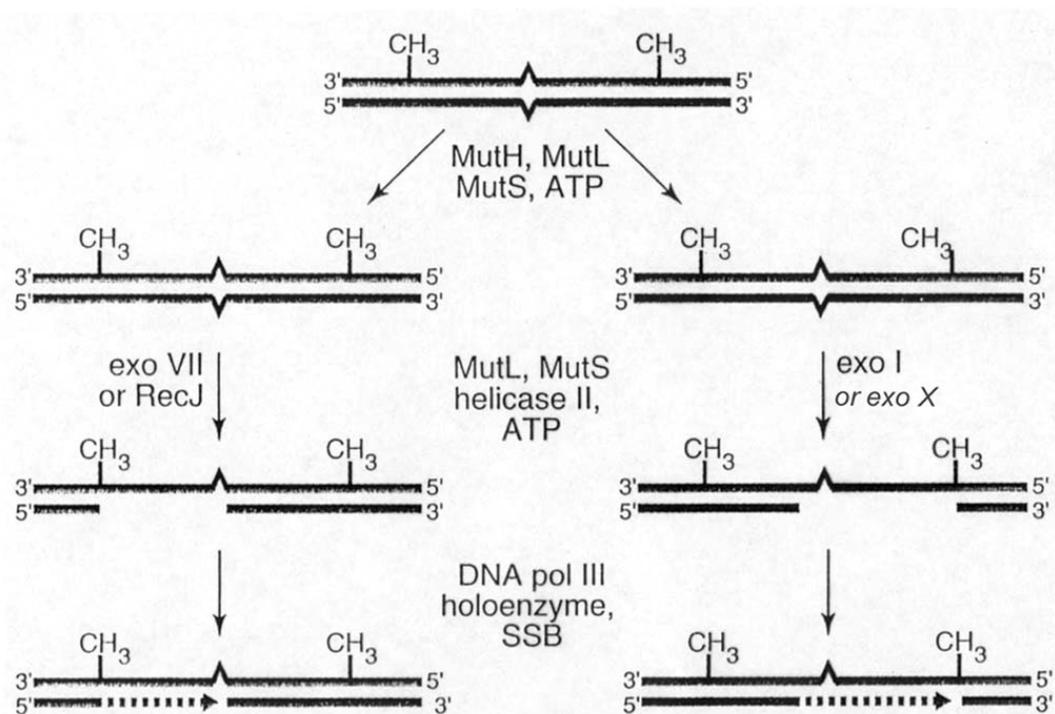


Abbildung 1-5: Bidirektionale Reparatur eines *mismatch* auf hemimethylierter DNA

Darstellung der Reparatur mit allen an der MMR von *E. coli* beteiligten Enzymen. Die Exzision erfolgt in 5'-3'- (linke Seite) bzw. in 3'-5'-Richtung (rechte Seite) (Grilley, 1993).

Der entfernte DNA-Bereich wird danach durch DNA-Polymerase III repliziert und der verbleibende Strangbruch durch Ligase geschlossen. Im Anschluss an die Reparatur methyliert die *dam*-Methylase die hemimethylierten d(GATC)-*Sequenzs* am N⁶ der Base Adenin (Bakker, 1989) und der Reparaturprozess ist abgeschlossen.

1.4 Kontroverse Aspekte des MutHLS-System

In einigen Aspekten des MutHLS-Systems besteht immer noch Klärungsbedarf. So ist z.B. immer noch unklar, ob und in welcher Weise der Initiationskomplex MutHLS nach dem

Setzen des *nick* von der DNA dissoziiert. Doch konnte nachgewiesen werden, dass MutS und L an dem Anlagern der Helikase II, sowie der Exonuklease ExoVII (5'→3') bzw. ExoI (3'→5') an die DNA beteiligt sind (Viswanathan, 1999).

Die genaue Stöchiometrie des Initiationskomplexes MutHLS sowie die Reihenfolge des Eintretens der Proteine in diesen Komplex (*complex assembly*) sind derzeit noch ungeklärt.

Die MutS-Bindung am *mismatch* erfolgt als Dimer, wie durch die Ko-Kristallstruktur nachgewiesen werden konnte (Lamers, 2000). Unter physiologischen Bedingungen liegt MutS aber auch als Tetramer vor, wie sich durch Ultrazentrifugations-Versuche zeigen lies (Bjornson, 2003). Die Funktion dieser Tetramerisierung konnte jedoch noch nicht eindeutig bestimmt werden. Eine Verhinderung der Tetramer-Bildung durch Aminosäureaustausch führte aber zu einer reduzierten *mismatch*-Bindung, so dass ein Einfluss dieser MutS-Eigenschaft auf die Reparatur nicht auszuschließen ist.

Eine Interaktion zwischen MutS und MutL an dem *mismatch* konnte in mehreren Versuchen nachgewiesen werden, nicht jedoch die tatsächliche Stöchiometrie am *mismatch* (Spampinato, 2000; Schofield, 2001). Fest steht jedoch, dass dabei unter ATP-Hydrolyse ein ternärer Komplex entsteht, der relativ fest auf der DNA gebunden ist. Durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass MutL als Dimer an der DNA bindet (Ban, 1998). Alle bisher veröffentlichten Resultate für MutH gingen von einem Monomer aus (Schofield, 2001; Wu, 2002), was in Übereinstimmung mit anderen *nick*-erzeugenden Endonukleasen stand (Besnier, 2001).

Über die weitere Prozessierung des *mismatch* gibt es kontroverse Ergebnisse. So wird heftig diskutiert, ob MutS nach der Einleitung des Reparaturprozesses am *mismatch* verbleibt oder diesen verlässt. Ein weiterer Diskussionspunkt, der ebenfalls mit MutS zusammenhängt, ist die Frage, wie die Kopplung zwischen der *mismatch*-Erkennung durch MutSL und der Strangdiskriminierung durch MutH zustande kommt. Eine Fragestellungen, die in Anbetracht des großen Abstand zwischen *mismatch* und d(GATC)-Sequenz (< 1 kb) verschiedene Lösungswege zulässt.

Derzeit werden dazu vier verschiedene Modelle diskutiert (siehe Abb. 1-6).

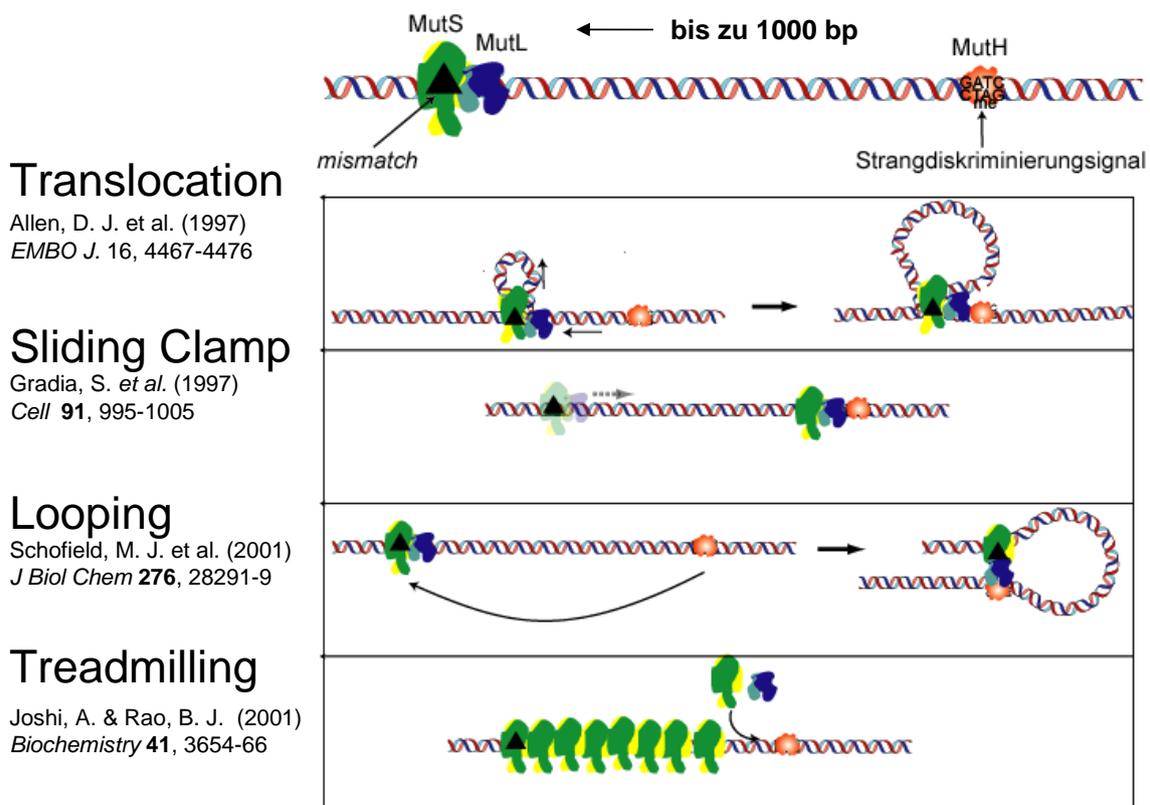


Abbildung 1-6: Schema verschiedener Strangdiskriminierungsmodelle

Die vier derzeit diskutierten Modelle zur Strangdiskriminierung. Die DNA wird entweder durch den MutHL-Komplex gefädelt (*translocation*), der Komplex gleitet auf der DNA (*sliding clamp*) zu MutH, die DNA wird zum MutHL-Komplex gebogen (*looping*) oder der Kontakt zu MutH wird über eine Polymerisation auf der DNA erreicht (*treadmilling*).

Eines der ersten veröffentlichten Modelle geht von einer ATP-getriebenen Translokation von MutS auf der DNA aus (Allen, 1997). Die DNA wird dabei bidirektional durch ein MutS-Dimer „gefädelt“, so dass sich eine als α -loop bezeichnete Struktur ausbildet. Der *mismatch* wird bei diesem Modell losgelassen und befindet sich in der Mitte der ausgebildeten Schleife (siehe Abb. 1-7).



Abbildung 1-7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines MutS-vermittelten α -loops von einem G-T-Heteroduplex

Elektronenmikroskopische Aufnahme nach Fixierung mit 0,6 % Glutaraldehyd und Isolierung durch Gelfiltration (reverse Kontrast-Aufnahme). Dargestellt ist das Ergebnis der ATP-abhängigen Translokation der DNA durch ein MutS-Dimer. Für die MutS-Bindung wurde ein G-T-*mismatch* verwendet (aus Allen, 1997).

Unter Berücksichtigung neuerer Daten wurde diese Schlussfolgerung etwas abgewandelt, indem nun ein Translokations-Mechanismus vorgeschlagen wurde, bei dem der *mismatch* während des gesamten Prozesses gebunden bleibt (Blackwell, 1998). Ein Monomer des MutS-Dimers ermöglicht das Durchfädeln der DNA, während das zweite diese blockiert. Dadurch kommt es zu einer gerichteten Translokation bis zum Erreichen einer d(GATC)-Sequenz unter Beibehaltung des *mismatch*-Kontakts.

Ein alternatives Modell, der so genannte "*sliding clamp*"-Mechanismus, wurde von Fishel vorgeschlagen und geht von einer linearen Bewegung von MutSL auf der DNA aus (Gradia, 1997; Fishel, 1998; Acharya, 2003). Bei diesem Modell ändert, ein nur lose an die DNA gebundenes MutS seine Konformation hin zu einer geschlossenen Ringstruktur. Dies geschieht ausschließlich an einem *mismatch* unter ADP-ATP-Austausch und führt zu einer gleitenden Bewegung der „Klemme“ weg vom *mismatch* („*sliding clamp*“). MutL interagiert ausschließlich mit einem solchermaßen aktivierten MutS, so dass die Spezifität der Reaktion gewährleistet bleibt. Zusammen kann dieser Komplex MutH aktivieren, welches dann das Strangdiskriminierungssignal setzt.

Beim dritten vorgeschlagenen Modell wird die Kopplung zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung über einen *looping*- oder Transaktivierungsmechanismus erreicht (Schofield, 2001). Die Befürworter dieses Modells gehen davon aus, dass MutS kurz nach Erkennung eines *mismatch* einen Komplex mit MutL eingeht, welcher dann entfernt liegende DNA-Bereiche nach MutH an einer d(GATC)-Sequenz absucht. Diese Bereiche kommen

durch Biegen und Schleifenbildung (*looping*) der DNA in die räumliche Nähe des MutSL-Komplex. Gestützt wird diese Theorie durch Versuche, die zeigen, dass die Spaltung der DNA durch die MutHLS-Reaktion, unabhängig davon ob der *mismatch* und die d(GATC)-Sequenz auf einem DNA-Molekül (*cis*) oder auf zwei getrennten (*trans*) liegen, mit identischer Effizienz erfolgen kann. Der MutSL-Komplex verbleibt während der Reaktion in räumlicher Nähe des *mismatch*, was gleichzeitig eine Erklärung für den zielgerichteten Verdau der Exonuklease ist, die den fehlerhaften Strang immer auf den *mismatch* zu entfernen und relativ kurz nach der Basenfehlpaarung ihren Verdau beendet (Acharya, 2003).

Ein anderes Modell (Joshi, 2002) geht von einem so genannten „*treadmilling*“-Mechanismus (*treadmill* = Laufband) aus. Dabei lagern sich mehrere MutS-Dimere von einem *mismatch* ausgehend an der DNA an. Die Polymerisation von MutS erfolgt bidirektional bis zum Erreichen einer d(GATC)-Sequenz. Das MutS am Ende bildet unter ATP-Hydrolyse einen ternären Komplex mit MutL, welcher dann die Spaltung durch MutH induzieren kann. Der Vorteil dieses Mechanismus ist, dass er alle bisher beobachteten Resultate erklärt, wie Bidirektionalität, ATP-Hydrolyse und die zielgerichtete Exonuklease-Reaktion. Ein Schwachpunkt besteht allerdings darin, dass für diese Art von Mechanismus sehr viel mehr MutS nötig wäre als in einer Zelle vorkommt (Feng, 1996). Eine Reichweite des Reparaturprozesses von 1000 Basenpaaren vom *mismatch* ist damit nur sehr schwer vorstellbar.

Obwohl für jedes dieser Modelle eine Reihe stützender Ergebnisse in der Literatur zu finden sind, ist es schwierig daraus eine allgemein gültige Aussage über den Prozess der *mismatch* Reparatur zu treffen. Für ein besseres Verständnis bedarf es daher weitergehender Untersuchungen.

2 Zielsetzung

Während meiner Diplomarbeit konnte ich eine neue Methode zur Herstellung langer definierter *mismatch*-Substrate entwickeln (siehe 5.5.1), wobei die erzeugten Substrate radioaktiv markiert wurden um somit eine Verfolgung der durch MutHLS induzierten Spaltung (*nicking*) mit Hilfe eines denaturierenden Gels zu gewährleisten.

Mit dieser Methode ist die Herstellung der einzelnen *mismatch*-Substrate in relativ kurzer Zeit möglich und mit ihnen konnten einige wichtige Aspekte des MutHLS-Systems untersucht werden. Unter anderem konnte ich die Kontaktstellen zwischen MutH und MutL während der Strangdiskriminierung genauer identifizieren.

Es zeigte sich, dass die verschiedenen MutHLS Untersuchungsmethoden relativ störanfällig sind, da viele Parameter, wie die DNA-Konzentration oder die Enzymaktivität, das Ergebnis beeinflussen. Eine Minimierung dieses Problems, konnte aber durch die Verwendung von fluorophormarkierte DNA-Produkten erreicht werden (siehe Abb. 2-1).

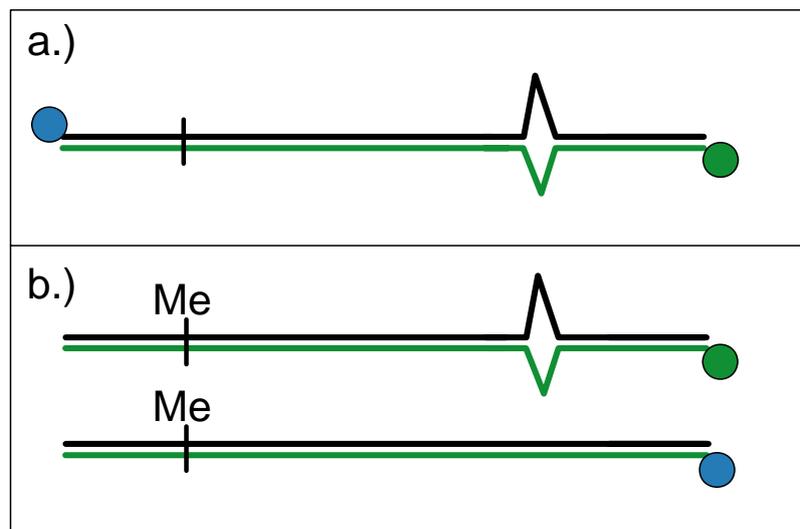


Abbildung 2-1: Anwendungsmöglichkeit fluorophormarkierter Substrate

a.) Unabhängige Detektion der Spaltung in beiden Strängen eines *mismatch*-Substrats.

b.) Verfolgung der Spaltung eines *mismatch*-Substrats in Gegenwart eines Homoduplex (kompetitiv)

Schwarzer Querbalken = d(GATC), Grüne und Blaue Kreise = Endmarkierung mit verschiedenen Fluorophoren

Durch die Markierung der Substrate mit unterschiedlichen Fluorophoren, ist eine Detektion der Spaltung des *mismatch*-Substrats in Konkurrenz mit einem Homoduplex ohne Fehlpaarung möglich. Dadurch kann die Spezifität der MutHLS-Reaktion erhöht werden. Diese Art der Markierung bringt auch den zusätzlichen Vorteil mit sich, dass sich nun beide

Stränge eines Substrats unterschiedlich mit zwei verschiedenen Fluorophoren markieren lassen. Dadurch kann die Spaltung in den beiden Strängen getrennt beobachtet werden, was bei der Untersuchung verschiedener MutH-Mutanten wichtig war und die Identifikation der Aminosäurereste des „Methylierungssensor“ von MutH ermöglichte.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war eine systematische Untersuchung des MutHLS Reparatursystems von *E. coli* mit besonderem Fokus auf die Abläufe zwischen der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung. Dabei sollte eine Untersuchung der zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur kontrovers diskutierten Modelle stattfinden um mögliche Schwachpunkte oder Fehlinterpretationen experimentell nachzuweisen. Durch gezielte Veränderungen der Versuchsparameter und mit Verwendung eines langen *mismatch*-Substrats (< 500 bp), sollte der wahrscheinlichste Mechanismus eingegrenzt werden.

Die folgenden, sich ausschließenden Grundannahmen, galt es zu testen:

Entweder

MutS bleibt nach Erkennung eines *mismatch* bis zur Aktivierung der Strangdiskriminierung am *mismatch* gebunden. Die Kopplung von *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung erfolgt über einen *looping*-, Translokations- oder *treadmilling*-Mechanismus (Allen, 1997; Schofield, 2001; Joshi, 2001).

Oder

MutS muss sich von einem erkannten *mismatch* ablösen, damit es die nachfolgenden Reaktionen induzieren kann (Gradia, 1997).

Die Verbindung zu MutHL an einer entfernt liegenden d(GATC)-Sequenz wird über einen *sliding clamp* Mechanismus erreicht.

Eine Strategie zur Beantwortung der ersten Annahme war der Versuch, ein aktiviertes MutS Enzym über einen *crosslink* an einem *mismatch* zu fixieren und die Induktion der nachfolgenden MutHL-Reaktion nachzuweisen (siehe Abb. 2-2a). Ein positives Ergebnis bei diesem Ansatz, wäre ein direkter Nachweis, dass ein Verbleiben von MutS am *mismatch* ausreicht um die Strangdiskriminierung zu ermöglichen.

Die zweite Strategie sollte darin bestehen, durch Verwendung eines speziellen Substrates, einen *looping*- oder Translokations-Mechanismus zu erschweren oder vollständig zu

unterbinden (siehe Abb 2-2b). Dazu wurde ein Substrat hergestellt, welches zwei d(GATC)-Sequenzen enthält, wobei die Distanz der nahe am *mismatch* gelegene Sequenz, über zielgerichtete Mutagenese variiert wurde. Durch die Verkürzung der Distanz zwischen der d(GATC)-Sequenz und dem *mismatch* sollte die kritische Entfernung definiert werden, bei der bedingt durch die sterische Hinderung der DNA-Struktur eine Spaltung an der d(GATC)-Sequenz stark eingeschränkt wäre. Solch eine Inhibition würde nur bei einem *looping*- oder Translokations-Mechanismus eintreten. Dagegen wäre bei einem zu Grunde liegenden *sliding clamp* Mechanismus eine solche Behinderung unter keinen Umständen zu beobachten. Hier sollten alle d(GATC)-Sequenzen, unabhängig von ihrer Entfernung zum *mismatch*, zu spalten sein, wobei die näher gelegenen schneller erreicht würden.

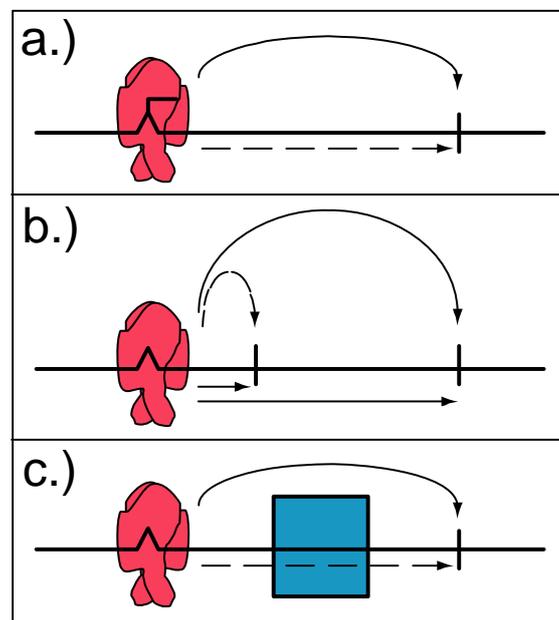


Abbildung 2-2: Experimentelle Vorgehensweise zur Bestimmung der Kopplung zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung

a.) MutS-DNA-Crosslink. b.) *mismatch*-Substrat mit kleinen und großem Abstand zur d(GATC)-Sequenz.

c.) Blockade zwischen *mismatch* und d(GATC)-Sequenz.

Vertikale Striche = d(GATC), Rot = MutS, Blau = Blockade, Gekrümmte Pfeile stehen für MutH-Aktivierung durch den Raum (*trans*), horizontale Pfeile für eine Aktivierung durch ein Entlanggleiten auf dem DNA-Strang (*cis*). Durchgezogene Linie zeigen mögliche, gestrichelte Pfeile unmögliche oder inhibierte Spaltung an.

Außerdem wurde der Versuch unternommen, einen potentiellen *sliding clamp* Mechanismus nachzuweisen. Dazu wurden verschiedene Methoden untersucht, um eine Blockade auf der DNA zwischen *mismatch* und d(GATC)-Sequenz zu etablieren (siehe Abb. 2-2c). Eine d(GATC)-Sequenz hinter solch einem „roadblock“, wäre durch eine *sliding clamp* nicht zu erreichen, anders als z.B. bei einem *looping*-Mechanismus, was wiederum als direkter Nachweis für einen solchen Mechanismus gelten würde. Die Bildung dieser Blockade sollte

durch Ausbildung einer so genannten „Tripelhelix“-Struktur durchgeführt werden oder durch spezifische Bindung eines Restriktionsenzym.

3 Ergebnisse

3.1 Verwendung langer *mismatch*-Substrate im MutHLS-System

3.1.1 Untersuchung des MutL-MutH Interaktion

Eine Fragestellung, mit der sich unsere Arbeitsgruppe befasst, ist die Identifikation der Protein-Protein-Interaktion der MutHLS-Enzyme. Dazu wurde eine Serie von Komplementationsversuche durchgeführt, bei der das *E. coli* MutH durch die homologen Enzyme aus *Vibrio cholerae* und *Hamophilus influenzae* (60 und 56% Sequenzähnlichkeit) ersetzt und die relative Aktivität verglichen wurde. Der Hintergrund für diese Versuche war die Identifikation der Aminosäurereste, die an der Interaktion der beiden Enzyme beteiligt sind. Erste *in vivo* Experimente hatten bereits gezeigt, dass die homologen Enzyme von *V. cholerae* und *H. influenza* in der Lage waren als Ersatz für *E. coli* MutH in einem MutH defizienten *E. coli* Stamm zu dienen, mit einem „Wirkungsgrad“ vergleichbar dem Wildtyp (Friedhoff, 2002).

Durch weiterführende *in vitro* Experimente, konnte nun gezeigt werden, dass die MutH-Homologen sich in der MutHLS-Reaktion durch MutS und MutL aktivieren lassen (siehe Abb. 3-1). Durch den Einsatz eines radioaktiv markierten *mismatch*-Substrats war es möglich, eine grobe Eingrenzung der an der Interaktion zwischen MutL und MutH beteiligten Aminosäurenresten zu erhalten.

Die verschiedenen MutH-Enzyme wurden dazu mit MutS und MutL und einem radioaktiven *mismatch*-Substrat inkubiert und die Effizienz der Spaltung der DNA miteinander verglichen.

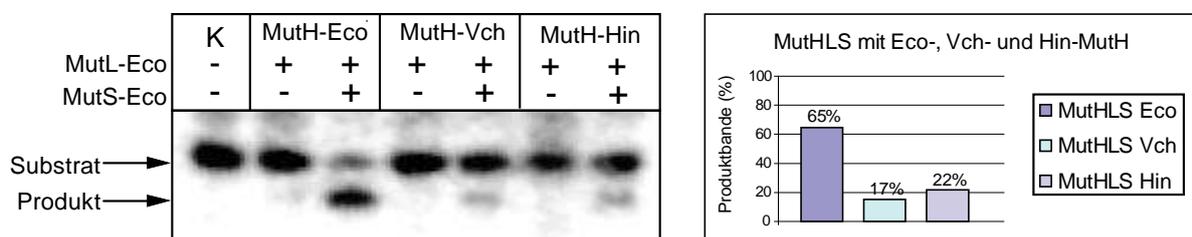


Abbildung 3-1: MutHLS-Reaktion mit MutH von *E. coli*, *V.cholerae*, *H.influenzae*

10 nM, hemimethyliertes und radioaktiv markiertes *mismatch*-Substrat wurden mit 2 µM MutS in Gegenwart von 1,25 mM ATP und 100 mM KCl vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 µM MutL und 100 nM MutH (*E. coli*, *V. cholerae* bzw. *H. influenza*) wurde die Spaltreaktion gestartet. Nach Inkubation von 10 min bei 37 °C, wurde die Reaktion mit FA-Puffer abgestoppt und die Proben auf ein 6%iges Harnstoffgel aufgetragen. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte mittels Instant Imager. Als Referenzwert wurde die Spaltung des entsprechenden MutHLS-Ansatzes verwendet. Es zeigte sich, dass sich alle MutH-Varianten durch MutS und MutL aktivieren ließen.

Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass die MutH-Homologen in der Lage sind das *E. coli* MutH zu ersetzen, obwohl nur 56-60 % Sequenzhomologie besteht. Die Spezifität der Spaltreaktion wird deutlich, da nur in Gegenwart von MutS und MutL eine Spaltung erfolgt, jedoch nicht bei Abwesenheit von MutS.

3.1.2 Identifikation der „methylierungssensitiven“ Aminosäureresten von MutH

Eine weitere Fragestellung, die mit Hilfe eines fluorophormarkierten *mismatch*-Substrats beantwortet wurde, war die Identifikation der Aminosäureresten von MutH, die an der Erkennung des Methylierungsstatus der d(GATC)-Erkennungssequenz beteiligt sind.

Für die Strangdiskriminierung ist die Erkennung und Unterscheidung des Methylierungsstatus einer hemimethylierten d(GATC)-*Sequenz* ausschlaggebend. Bisher war nicht bekannt welche Aminosäurereste den „Methylierungssensor“ von MutH bilden.

Nach Vergleich der Kristallstrukturen von MutH mit den Ko-Kristallstrukturen verschiedener Restriktionsenzyme sowie multiple Sequenzalignments zwischen MutH und nah verwandten Proteinen, wurden mögliche Aminosäuren identifiziert, die an dieser Funktion beteiligt sind (Friedhoff, 2003). Ihr Einfluss konnte sowohl *in vivo* durch Komplementationsversuche nachgewiesen werden, als auch *in vitro* durch die hier folgenden Experimente mit MutHL und drei fluorophormarkierten *mismatch*-Substraten.

Für dieses Experiment wurden drei DNA-Substrate mit unterschiedlichem Methylierungsstatus (un-, hemi- und vollmethyliert; siehe Abb. 3-2) verwendet, die aber bis

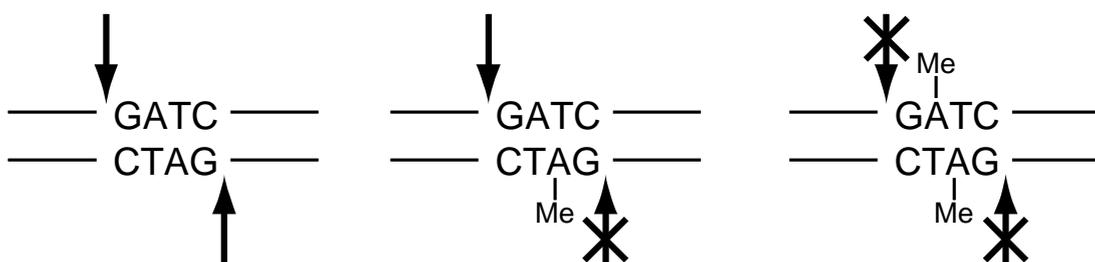


Abbildung 3-2: Schema des Methylierungsstatus der drei verwendeten *mismatch*-Substrate

Pfeile symbolisieren eine mögliche oder behinderte (durchgekreuzte Pfeile) Spaltung des Substrats an einer d(GATC)-Erkennungssequenz mit unterschiedlichem Methylierungsstatus durch MutH Wildtyp.

auf die Methylierung identisch waren. Auf diesen Substraten wurde die Effizienz der Spaltung von verschiedenen MutH-Mutanten in einer durch MutL induzierten Reaktion gemessen (siehe Abb. 3-3).

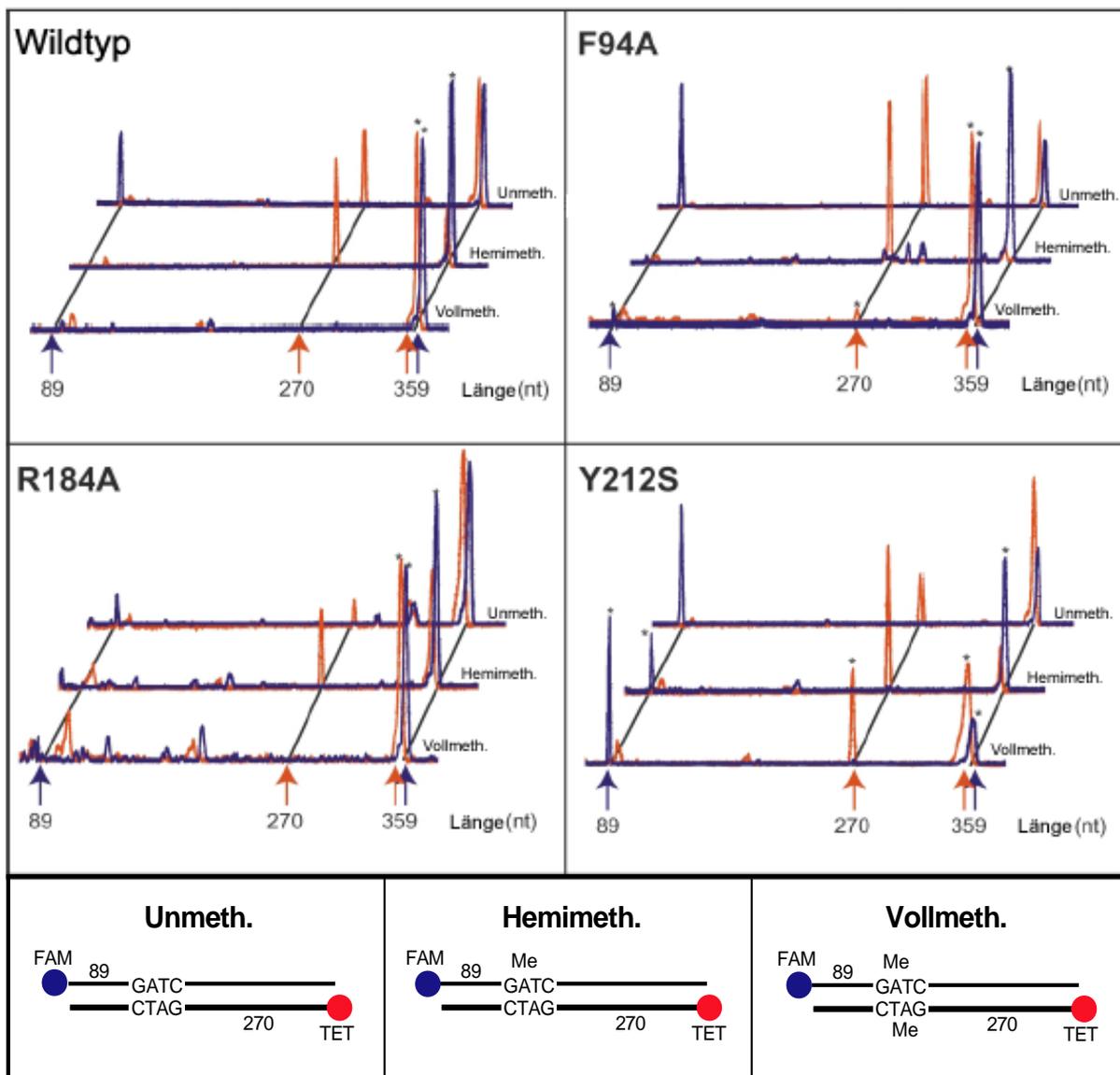


Abbildung 3-3: MutL-stimulierte Spaltung un-, hemi- und vollmethylierter DNA durch verschiedene MutH-Varianten

Die verwendeten 359 bp lange *mismatch*-Substrate, trugen eine FAM-Markierung (blau) im oberen Strang und eine TET-Markierung (rot) im unteren. Jeweils 10 nM eines Substrats wurden mit MutH Wildtyp (50 nM), der Mutante F94A (25 nM), Y212S (100 nM) oder R184A (500 nM) in Gegenwart von MutL (500 nM) bei 37 °C für 5 min inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. Die Signale von Substrat und Produkt des unteren Strangs sind durch rote Pfeile markiert, die des oberen durch blaue. Man beachte, dass hauptsächlich die Variante Y212S in der Lage ist, methylierte d(GATC)- Erkennungsstellen zu spalten, im geringeren Maße auch die Variante F94A (modifiziert aus Friedhoff, 2003).

Der Vergleich der verschiedenen Spaltreaktionen zeigte, dass der Wildtyp von MutH und die Varianten F94A und R184A keine Präferenz für einen der Stränge beim unmethylierten Substrat haben. Bei Betrachtung der Spaltung des hemimethylierten Substrats war eine deutliche Präferenz für den unmethylierten Strang zu erkennen. Eine Spaltung an einer methylierten Sequenz war nicht zu detektieren oder im Falle der Variante F94A nur sehr schwach ausgeprägt. Dagegen spaltete die Variante Y212S alle drei Substrate mit

vergleichbarer Präferenz unabhängig von ihrem jeweiligen Methylierungsstatus. Diese Variante hatte ihre Fähigkeit verloren, zwischen methylierter und unmethylierter DNA zu unterscheiden. Das ausgetauschte Tyrosin war somit essentiell für die Erkennung des methylierten Adenins.

Dieser Versuch ist ein gutes Beispiel für die Vorteile fluorophormarkierter Substrate, die die gleichzeitige Detektion der Reaktion an verschiedenen, aber gleichlangen DNA-Produkten erlauben, in diesem Fall die getrennte Spaltung an beiden Strängen eines DNA-Moleküls.

3.2 Kritische Versuchsparemeter des MutHLS-Systems

3.2.1 Einfluss von KCl auf die MutHLS-Reaktion

Beim Vergleich der verschiedenen derzeit diskutierten Modelle der Kopplung zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung fällt auf, dass die zu dieser Thematik forschenden Arbeitsgruppen bei ihren Experimenten trotz vergleichbarer Enzymverhältnisse unterschiedliche Ergebnisse erzielten. Die durchgeführten Versuche unterschieden sich allerdings durch die Verwendung verschiedener Puffer mit teilweise deutlich voneinander abweichender Ionenstärke, die in Bereichen zwischen 0 und 150 mM Salzkonzentration schwankte. Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass ein Maximum der Reparatureffizienz bei einer KCl-Konzentration von 150 mM liegt (Blackwell, 1998). Bei dieser Versuchsreihe wurde allerdings ein humanes MutS-Homolog (hMutS α) verwendet. Daher ist eine direkte Übertragung auf das MutHLS-System von *E. coli* nicht möglich. Ohne experimentelle Daten konnte eine ähnliche Wirkung aber auch nicht ausgeschlossen werden, so dass in der folgenden Versuchsreihe der Einfluss der Salzkonzentration auf die Spezifität der *mismatch*-induzierten Reaktion untersucht wurde.

Bei diesem Versuch wurde die MutHLS-Reaktion auf einem 359 bp langem *mismatch*-Substrat (G - T) und einem genauso langem Homoduplex (A - T) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Salzbedingungen untersucht und verschiedene Zeitwerte im Rahmen einer Kinetik gemessen (Abb. 3-4).

Dabei konnte beobachtet werden, dass die Spezifität der MutHLS-Reaktion im hohen Maße von der KCl-Konzentration abhing. In Abwesenheit von KCl wurde bei beiden Substraten jeweils die schnellste Spaltgeschwindigkeit erreicht (siehe 3-4b.). Dies war allerdings verbunden mit einer Reduktion der Spezifität, die hier nur einen 2,6-fachen Unterschied zwischen den beiden Substraten ausmachte (siehe 3-4c.).

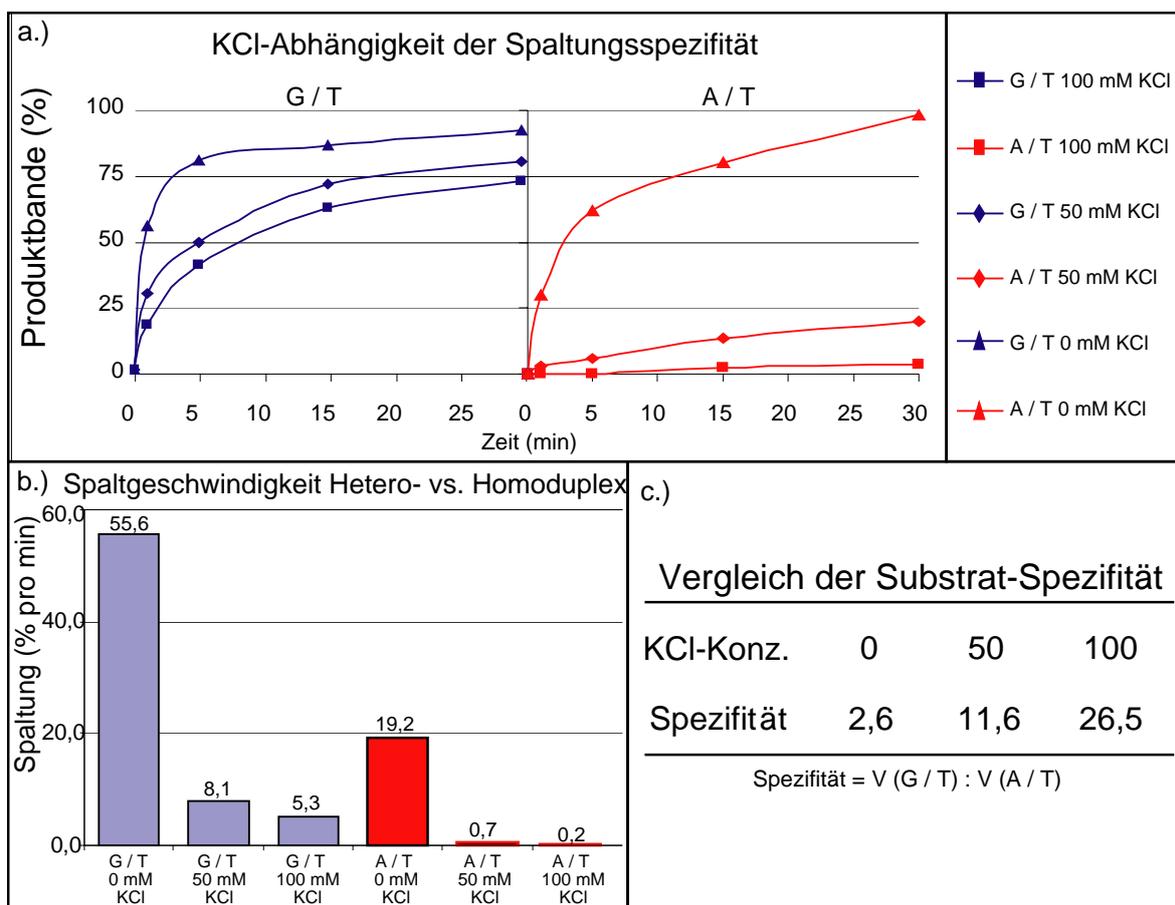


Abbildung 3-4: Einfluss der KCl-Konzentration auf die Spezifität der MutHLS-Reaktion

(a.) Für den Versuch wurden 10 nM radioaktiv markierter DNA (Hetero- bzw. Homoduplex) mit 2,5 µM MutS, 1 µM MutL mit 1,25 mM ATP vorinkubiert. Der Puffer enthielt zusätzlich KCl in den Konz. 0, 50 bzw. 100 mM. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von 50 nM MutH gestartet und bei 37 °C inkubiert. Nach 1, 5, 15 und 30 min wurde ein Aliquot entnommen und durch Zugabe von FA-Auftragspuffer abgestoppt. Die Proben wurden auf ein 6 %iges Harnstoffgel aufgetragen und nach dem Lauf mit dem InstantImager analysiert. Die entstanden Banden wurde mit Imager-Software ausgewertet. (b.) Die aus der Anfangssteigung errechnete Spaltung nach einer Minute. (c.) Die Spezifität der MutHLS-Reaktion in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration. Deutlich zu erkennen ist, dass die Substrat-Spezifität bei niedrigen Salz-Konzentrationen reduziert ist.

In Anwesenheit von KCl reduzierte sich die Spaltgeschwindigkeit. Gleichzeitig erhöhte sich die Spezifität der Reaktion, so dass der zuvor gemessen Unterschied von 2,6 zwischen Homo- und Heteroduplex auf das 11- (50 mM KCl) bzw. 26-fache (100 mM KCl) anstieg. Erklären lässt sich dieses Ergebnis dadurch, dass die Spezifität der *mismatch*-Erkennung von MutS bei niedrigen Ionenstärken nachlässt und damit auch reguläre Watson-Crick-Basenpaare den Start des Reparaturprozesses bewirken.

Möglicherweise existiert aber auch eine von MutS unabhängige MutHL-Reaktion, die unter diesen Bedingungen auftritt und eine Spaltung an einer d(GATC)-*Sequenz* durchführen kann,

ohne auf eine zuvor erfolgte *mismatch*-Erkennung angewiesen zu sein. Diese Annahme wurde durch die folgenden Versuche genauer untersucht.

3.2.2 Einfluss der KCl-Konzentration auf die MutHL-Reaktion

In einer Veröffentlichung von Ban (Ban, 1998) konnte bereits nachgewiesen werden, dass MutH bei niedrigen Salzkonzentrationen (30 mM KCl) von MutL auch in Abwesenheit von MutS aktiviert werden kann, wenn auch nur im äußerst begrenztem Ausmaß. Diese Versuche wurden allerdings auf kurzen (110 bp) Oligoduplices durchgeführt.

Bei der folgenden Untersuchung wurde daher untersucht, ob auf einem 484 bp langem *mismatch*-Substrat eine von MutS unabhängige MutHL- Reaktion stattfinden kann, die bei niedrigen KCl-Konzentrationen an d(GATC)-Sequenzen spaltet, ohne zuvor von MutS aktiviert worden zu sein.

Eine Spaltung durch MutHL wurde mit und ohne KCl auf einem hemimethylierten *mismatch*-Substrat durchgeführt und mit der Spaltung einer MutHLS-Reaktion mit KCl verglichen (Abb. 3-5).

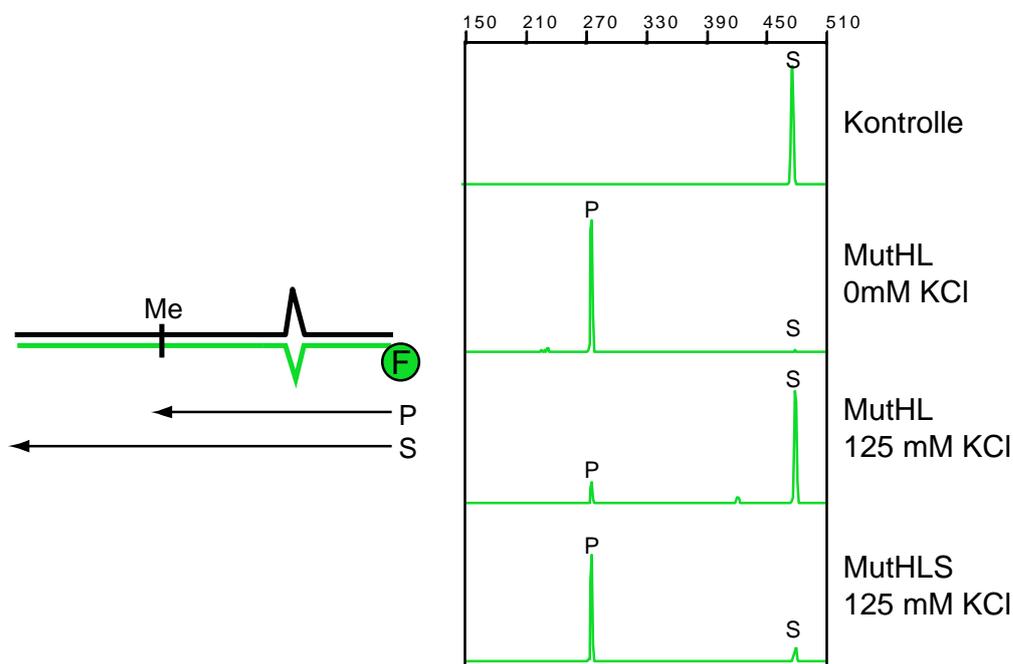


Abbildung 3-5: KCl-abhängige Spaltung durch MutHL

10 nM hemimethyliertes *mismatch*-Substrat wurden mit 50 nM MutH und 500 nM MutL in Gegenwart von 0 bzw. 125 mM KCl inkubiert. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Zum Vergleich erfolgte ein weiterer Ansatz mit 500 nM MutS und 125 mM KCl den gleichen Bedingungen. Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. S = Substrat 484 bp; P = Produkt 272 bp. Es zeigte sich, dass bei niedrigen KCl-Konzentrationen eine *mismatch*- und MutS-unabhängige MutHL-Spaltung erfolgen kann.

In der Tat konnte eine KCl-abhängige Aktivität von MutHL beobachtet werden. Ein Vergleich der beiden MutHL-Ansätze zeigte, dass nur bei Abwesenheit von KCl eine schnelle und nahezu vollständige Spaltung des Substrates erfolgt war. Die Spaltung beim Ansatz mit KCl war dagegen äußerst gering und lag bei etwa 10 %. Dieser inhibitorische Effekt der KCl-Konzentration wirkte sich aber nicht auf die Aktivierung von MutHL durch MutS aus.

In Gegenwart von MutS erfolgte eine nahezu vollständige Spaltung des Substrats.

Damit war klar, dass die Wirkung von KCl nicht auf der Reduktion der Substrat-Spezifität von MutS beruht, sondern ausschließlich die Aktivität von MutHL beeinflusst.

3.2.3 Längenabhängigkeit des Substrats auf die MutHLS-Reaktion

Ein weiterer wichtiger Parameter, den man berücksichtigen muss, wenn man das MutHLS System untersucht, ist der Einfluss der DNA-Enden auf die Spaltreaktion. Wichtig ist dabei der Abstand der d(GATC)-*Sequenz* zum Ende hin, was einen signifikanten Effekt auf die Spaltung an dieser Stelle ausübt. Dies wurde bereits in mehreren Publikationen veröffentlicht (Smith, 1996); (Beaulieu, 2001). Bei den Veröffentlichungen von Hsieh (Schofield, 2001; Junop, 2001) wurde dieser Randeffekt allerdings bei der Interpretation der erzielten Resultate nicht mit einbezogen. Dass der Einfluss des Endes nicht zu unterschätzen ist und gerade bei kurzen Substraten eine eminente Bedeutung hat, konnte in der folgenden Versuchsreihe nachgewiesen werden.

Als Substrat wurde ein *mismatch*-Substrat mit zwei d(GATC)-Sequenzen eingesetzt. Durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen XhoI bzw. NcoI konnten zwei verkürzte Substrat-Varianten erzeugt werden (siehe Abb. 3-6). Zusätzlich wurde ein *mismatch*-Substrat mit nur einer d(GATC)-Sequenz verwendet, um einen weiteren Abstand zum Rand überprüfen zu können. Die Distanz zum Ende hin, die mit dieser Versuchsreihe abgedeckt werden konnte, reichte von 69 bis 348 bp.

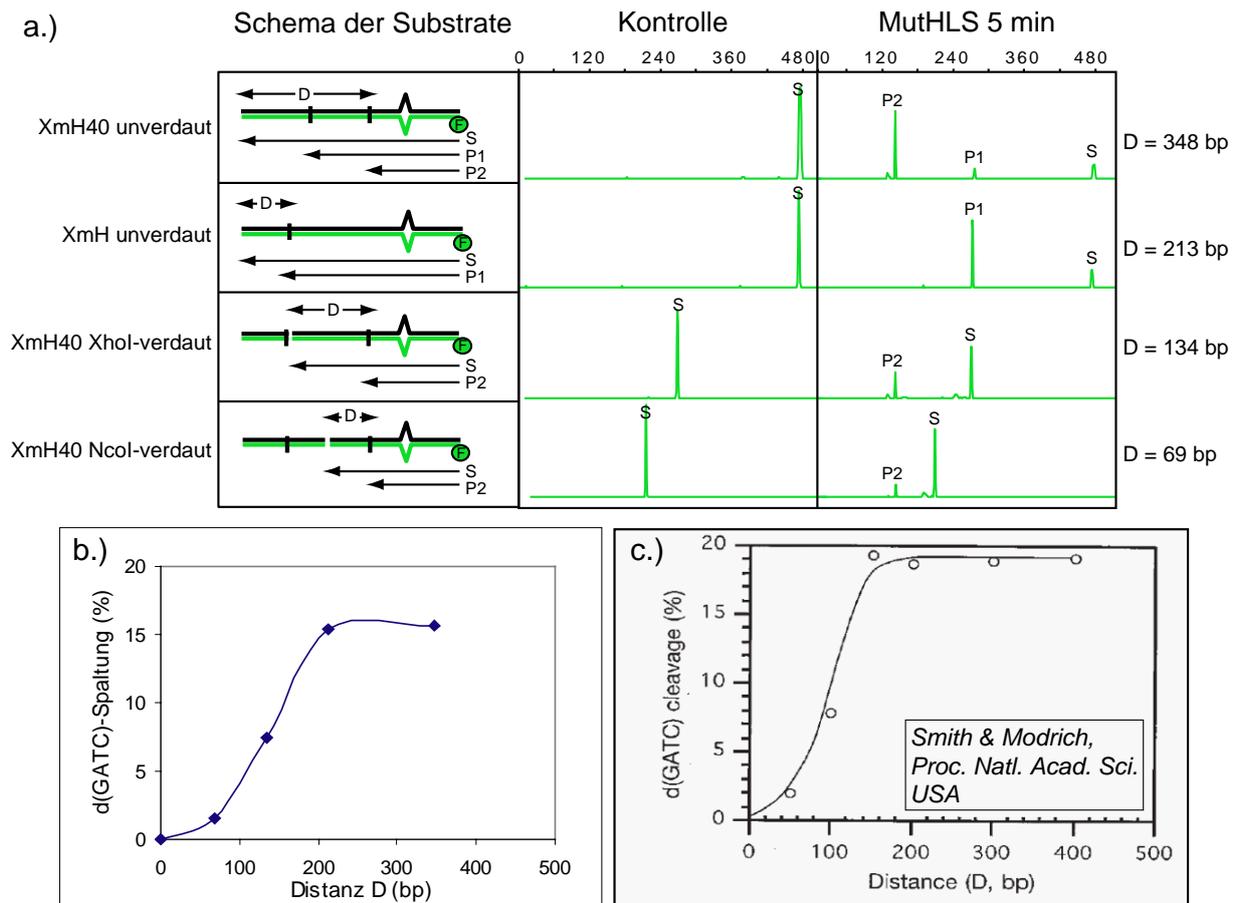


Abbildung 3-6: Einfluss des Abstands von einer d(GATC)-Sequenz zum Ende auf die Spaltung durch MutHLS

(a.) Es wurden jeweils 5 nM des hemimethylierten MM-Substrats XmH40 bzw. XmH eingesetzt. Für die Erzeugung der Varianten wurden zwei Aliquots von XmH40 zuvor für 15 min bei 37 °C mit jeweils 5 U XhoI bzw. NcoI verdaut. Die MutHLS-Reaktion wurde mit 500 nM MutS, 500 nM MutL und 50 nM MutH in Gegenwart von 125 mM KCl durchgeführt. Nach 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. S = Substrat 484 bp bzw. 270 bp (nach XhoI-Verdau) oder 205 bp (nach NcoI-Verdau); P1 = Produkt 275 bp; P2 = Produkt 136 bp (b.) Die ermittelte Spaltrate wurde gegen den Abstand vom Ende „D“ in einen Graphen aufgetragen. (c.) Als Vergleich die veröffentlichten Daten von Smith und Modrich (1996).

Es zeichnete sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Abstand der d(GATC)-Sequenz zum Rand und ihrer Spaltung ab. Je näher sich die d(GATC)-Sequenz am Rand befindet, desto geringer fiel die Spaltung an dieser Position aus. Bei Auswertung der Spaltdaten war die sich abzeichnende Längenabhängigkeit auch graphisch zu erkennen. Die ersten 100 bp Abstand zum DNA-Ende haben einen störenden Einfluss auf die MutHLS-Aktivität, der anschließend nahezu linear abnimmt, bis er bei ca. 200 bp zu vernachlässigen ist. Dieses Resultat stimmt in etwa mit den von Modrich publizierten Daten überein (vgl. 3-6b mit c). Eine Erklärung für diesen Effekt konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geliefert werden. Es gibt aber Hinweise, dass dies hauptsächlich auf die Aktivierung von

MutHL durch MutS zurückzuführen ist und nicht auf MutHL alleine (siehe unten Versuch 3.2.4). Besondere Bedeutung bekommt dieser Effekt allerdings bei der Klärung der Frage, ob die Interaktion zwischen MutS und MutHL durch den Raum (in *trans*) erfolgen kann oder die Reaktion auf einem DNA Molekül beschränkt ist (*cis*)

3.2.4 *Cis-* gegenüber *trans*-Aktivierung

Befürworter eines *looping*-Modells gehen von einer durch den Raum verlaufenden Interaktion zwischen der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung aus. MutS interagiert dabei, vom *mismatch* ausgehend, mit MutHL, an einer d(GATC)-*Sequenz*. Dabei ist es egal, ob sich die Spaltstelle und MutS auf einem einzelnen DNA Molekül befinden oder auf zwei getrennten. Diese Art der Interaktion wird als *trans*-Aktivierung bezeichnet.

Obwohl solch ein Mechanismus äußerst unpräzise wäre, da er Reparaturprozesse auch an fehlerfreien Stellen auf der DNA induzieren könnte, wurden bereits mehrere Resultate veröffentlicht, die dieses Modell unterstützen (Junop, 2001; Schofield, 2001).

Bei näherer Betrachtung der Experimente zeigte sich jedoch, dass die Versuche unter Salzbedingungen durchgeführt worden sind, bei denen auch eine *mismatch*-unabhängige MutHL-Reaktion stattfinden konnte. Außerdem waren die verwendeten Substrate relativ kurz, so dass der schon oben beschriebene Randeffect voll zum tragen kam.

Daher wurde in dem folgenden Experiment versucht diese Beobachtungen, die zum *looping*-Modell führten, auch nach Ausschluss der bereits erwähnten kritischen Versuchsparameter zu erzielen.

Falls die Hypothese von der *trans*-Aktivierung stimmt, müsste es folglich möglich sein eine *mismatch*-induzierte Spaltung auf einem Homoduplex zu erreichen, wenn sich dieser in Gegenwart eines Heteroduplex befindet. Der *mismatch* des Heteroduplex würde die Aktivierung von MutS ermöglichen, das dann sowohl auf dem Heteroduplex als auch auf dem Homoduplex die Induktion von MutHL ermöglichen sollte. Spaltung wäre im Anschluss in beiden Substraten mit ähnlicher Intensität zu beobachten.

Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Substrat-Mix, bestehend aus einem Homo- und einem Heteroduplex mit MutHLS inkubiert (siehe Abb. 3-7). Als Vergleich wurde die gleiche Reaktion nur in Gegenwart des Heteroduplex durchgeführt.

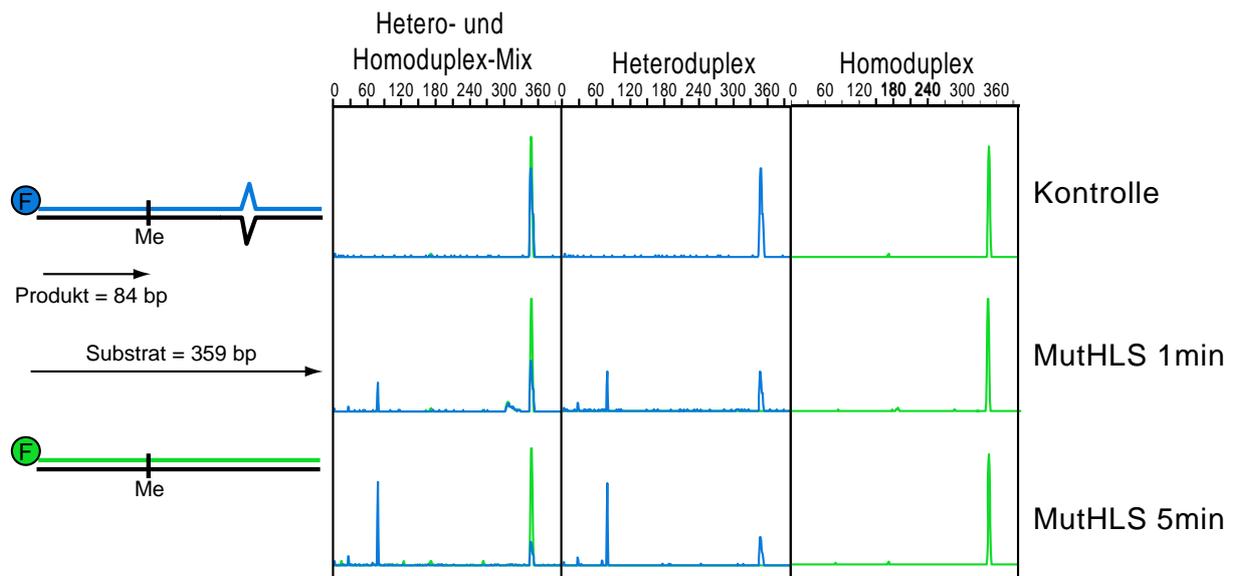


Abbildung 3-7: MutHLS-Reaktion in Konkurrenz zwischen Homo und Heteroduplex

Jeweils 5 nM der beiden unmethylierten DNA-Substrate (blau G / T und grün A / T) wurden in Gegenwart von 1 mM ATP mit 500 nM MutS vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 nM MutL und 50 nM MutH gestartet. Zu den Zeitpunkten 1 und 5 min wurde ein Aliquot entnommen und durch Zugabe von TSR-Puffer abgestoppt. Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. S = Substrat 359 bp; P = Produkt 84 bp.

Es ist deutlich zu erkennen, dass spezifisch der Heteroduplex gespalten wurde. Die Spaltung erfolgte in Gegenwart des Homoduplex genauso schnell, wie beim Ansatz ohne Kompetitor. Die Spaltung des Homoduplex erfolgt auf einem kaum nachweisbaren Niveau.

Die Spaltung des Heteroduplex (blau) war im Vergleich zum Homoduplex (grün) deutlich bevorzugt. Nach 5 min war etwa 80 % des Substrats gespalten. Zum gleichen Zeitpunkt ließ sich beim Homoduplex (grün) nur eine marginale Spaltung (< 5 %) detektieren, die auch in Abwesenheit des Heteroduplex nicht ausgeprägter war. Die MutHLS-Reaktion erfolgte demnach hauptsächlich auf einem DNA-Molekül (in *cis*) in Abhängigkeit von einem *mismatch*. Eine *trans*-Aktivierung konnte unter diesen Bedingungen zwar beobachtet werden, spielte aber nur eine untergeordnete Rolle.

Bei Betrachtung des Vergleichsansatzes ohne kompetitierenden Homoduplex, war zu erkennen, dass der Heteroduplex im Vergleich zum Konkurrenzansatz mit fast identischer Geschwindigkeit gespalten wurde. Ein störender Einfluss des Homoduplex war nicht zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die MutHLS-Reaktion unter den verwendeten Versuchsbedingungen hauptsächlich in *cis* erfolgt. Die ebenfalls zu beobachtende *trans*-Aktivierung hat einen zu vernachlässigenden Anteil an der auftretenden Spaltung des Substrats

3.2.5 Vergleich der *cis*- und *trans*-Aktivierung bei verkürzten *mismatch*-Substraten

Der Nachweis, dass die Kopplung zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung in *cis* erfolgt, konnte durch das vorangegangene Experiment erbracht werden. Diese Resultate stehen im Widerspruch mit den veröffentlichten Ergebnisse und der daraus resultierenden Schlussfolgerung von den Befürwortern eines *looping*-Modells (Junop, 2001; Schofield, 2001). Es ist aber offensichtlich, dass ihre publizierten Resultate nicht auf Grund von fehlerhafter Auswertung entstanden, sondern durch die Wahl ungünstiger Versuchsparameter, wie eine zu geringer Abstand zwischen d(GATC)-Sequenz und dem DNA-Ende.

Dass unter diesen Versuchsbedingungen tatsächlich Resultate gefunden werden konnten, die eine *trans*-Aktivierung unterstützen, wurde durch das folgende Experiment demonstriert.

Für den Versuch (siehe Abb. 3-8) wurden zwei identische *mismatch*-Substrate gemischt, bei denen eines im oberen, das andere im unteren Strang methyliert war. Auf diesen hemimethylierten Substraten befanden sich zwei d(GATC)-Sequenzen. Durch Verdau mit NcoI konnten diese Spaltstellen voneinander getrennt werden. Der Verdau erzeugte ein Fragment mit einer Spaltstelle für MutH und dem *mismatch* und ein zweites Fragment nur mit der Spaltstelle. Dadurch konnte die *cis*- und *trans*-Aktivierung der MutHLS-Reaktion gleichzeitig in Konkurrenz verfolgt werden. Zur Unterscheidung der MutS induzierten Reaktion von der *mismatch*-unabhängigen MutHL-Reaktion, wurden zusätzliche Ansätze ohne MutS mit und ohne KCl durchgeführt. Als Vergleich dienten identische Ansätze mit unverdaulichem Substrat-Mix.

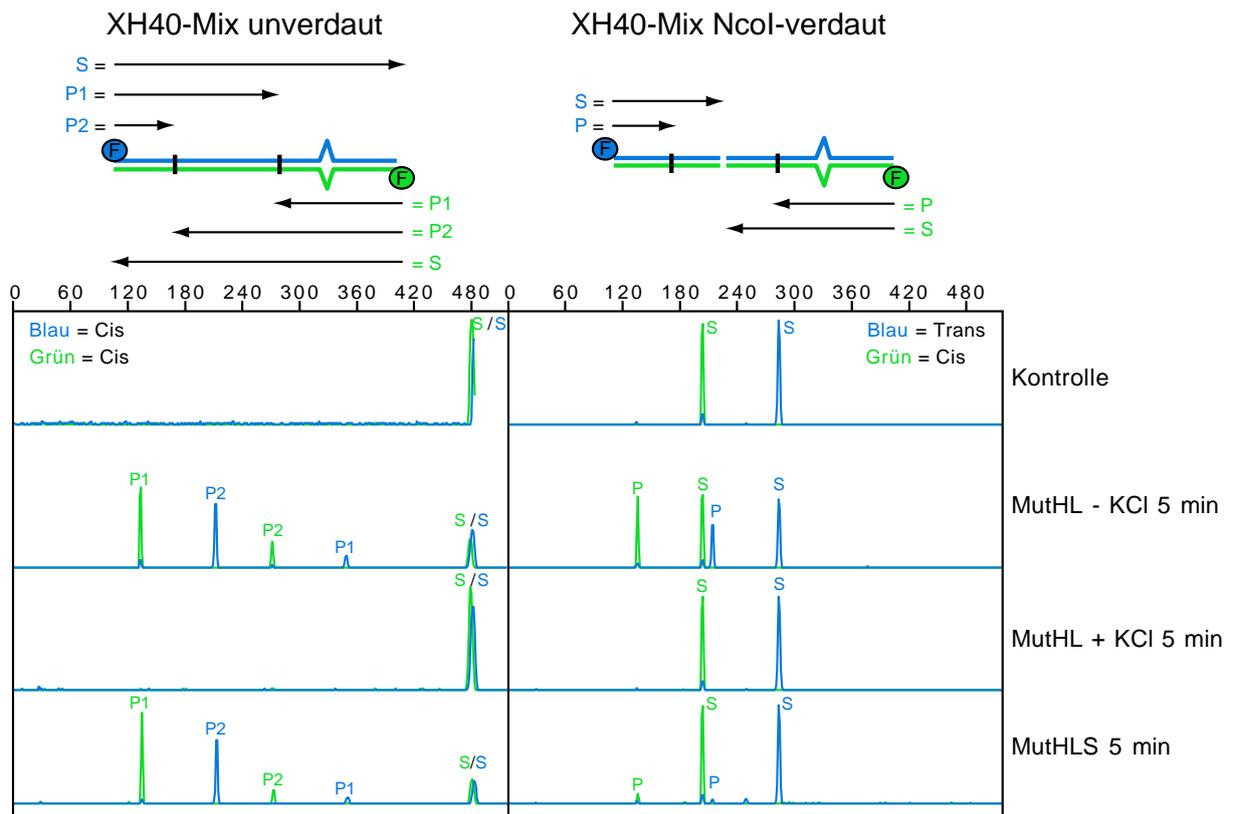


Abbildung 3-8: Vergleich der erfolgten MutHLS-Reaktion in cis oder in trans

25 nM der beiden hemimethylierten DNA-Substrate (XmH40 und XHm40) wurden gemischt und mit 5 U NcoI für 30 min bei 37°C verdaut. 10 nM des Substrat-Mix wurden mit und ohne 500 nM MutS, sowie 500 nM MutL und 50 nM MutH bei 37°C inkubiert. Die MutHL-Ansätze erfolgten in Gegenwart von 0 bzw. 125 mM KCl (rechte Reihe). Identische Ansätze wurden mit unverdaulichem Substrat-Mix durchgeführt (linke Reihe). Nach 5 min wurde ein Aliquot entnommen und durch Zugabe von TSR abgestoppt. Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. S = Substrat 484 bp bzw. 205 / 279 bp (nach NcoI-Verdau); P = 136 / 209 bp; P1 = Produkt 136 / 344 bp; P2 = Produkt 275 / 209 bp; Der Spaltstellen der beiden Stränge wurden beim unverdaulichem Substrat-Mix mit vergleichbarer Effizienz gespalten. Nach Kürzung des Rands durch NcoI war die Spaltung stark reduziert, kann aber sowohl in cis als auch in trans mit ähnlicher Intensität beobachtet werden. Man beachte, dass die MutHL-Reaktion durch die Verkürzung nicht so stark eingeschränkt wird.

Die MutHLS-Reaktion auf dem unverdaulichem *mismatch*-Substrat erfolgte mit hoher Effizienz. Beide Substrate wurden mit vergleichbarer Intensität gespalten. Die beiden Kontroll-Ansätze ohne MutS zeigten, dass unter diesen Salzbedingungen keine *mismatch*-unabhängige Spaltung durch MutHL zu erwarten ist (Abb. 3-8 vgl. der MutHL-Spaltung mit und ohne KCl). Bei der MutHL-Reaktion ohne KCl werden dagegen beide Substrate mit einer Effizienz vergleichbar dem MutHLS-Ansatz gespalten. Bei der MutHL-Reaktion mit dem NcoI-vorverdaulichem Substrat konnte dies ebenfalls beobachtet werden. Auch hier erfolgte ohne Salz eine deutliche Spaltung in beiden Substraten, die in Gegenwart von KCl nicht stattfand. Der hemmende

Einfluss des verkürzten Randes fiel bei der MutHL-Reaktion kaum ins Gewicht im Gegensatz zu der MutHLS-Reaktion (Abb. 3-8 vgl. MutHL mit MutHLS nach NcoI-Verdau).

Beim Vergleich der MutHLS-Spaltung auf dem vorverdauten Substrat mit der Spaltung des unverdauten, konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Spaltung auf dem DNA-Fragment mit dem *mismatch* (grün) war nur sehr schwach ausgeprägt und nur etwa 3-fach besser als die Reaktion auf dem Fragment ohne *mismatch* (blau). Die Produktbildung beim *mismatch*-freien Strang war aber ausgeprägter als bei dem MutHL-Ansatz in Gegenwart von KCl. Dies deutet darauf hin, dass die Spaltung allein durch MutS-Induktion erfolgt sein musste, was für eine *trans*-Aktivierung spricht. Die schlechte Spaltung der in *cis* erfolgten Reaktion war mit dem schon zuvor besprochenen Randeffekt des Substrats zu erklären. Durch die Spaltung mit NcoI war der Abstand von der d(GATC)-*Sequenz* zum Ende hin auf 69 bp verkürzt worden. Die Effizienz der nachfolgenden MutHLS-Reaktion wurde damit stark eingeschränkt.

Verglich man die Geschwindigkeit der *cis*- und *trans*-Reaktion miteinander (siehe Abb. 3-9), fiel auf, dass bei einem kurzen Abstand zum Rand, der Unterschied zwischen beiden sehr gering ausfällt (nur 3-fach).

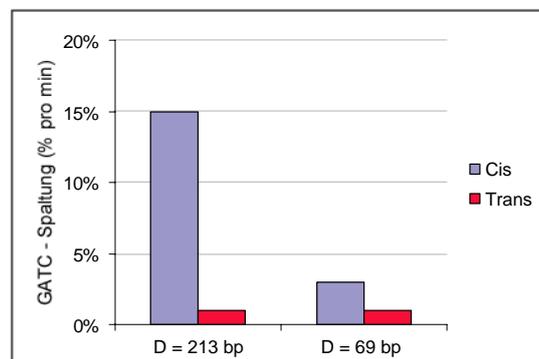


Abbildung 3-9: Vergleich der Spaltgeschwindigkeiten einer *cis*- bzw. *trans*-aktivierten MutHLS-Reaktion
 „D“ ist die Distanz zwischen gespaltenen d(GATC)-*Sequenz* und dem DNA-Ende

Bei Verwendung eines Substrats mit ausreichend Abstand zum DNA-Ende hin, ist dagegen deutlich die Präferenz von MutHLS für eine in *cis* ablaufende Reaktion zu erkennen. Die Fehlinterpretation der Resultate von Junop (2001) war somit durch die Wahl eines ungeeigneten *mismatch*-Substrats in der Kombination zu niedriger KCl-Konzentrationen entstanden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit damit festgestellt werden, dass beim MutHLS-System die Ergebnisse und daraus resultierenden Schlussfolgerungen im hohen Maße von der Wahl der Versuchsparameter abhängen, wie die Wahl eines geeigneten *mismatch*-Substrats

mit ausreichendem Abstand zum Rand und die gewählten Salzbedingungen, die unerwünschte Nebenreaktionen minimieren.

3.3 MutS-DNA-Crosslink

3.3.1 Planung eines *mismatch*-Substrat für ein *photocrosslinking*

Für die Klärung der Frage nach einer Präsenz von MutS am *mismatch* während der Phase der Strangdiskriminierung, wurde versucht, MutS an dieser Position chemisch zu fixieren. Dafür wurde ein DNA-Substrat benötigt, dass in der Nähe des *mismatches* eine reaktive Gruppe (Ioduridin) besaß, die in der Lage ist eine kovalente Bindung zwischen DNA und MutS auszubilden. Diese Bindung sollte durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht induziert werden (*photocrosslinking*). Ein dermaßen fixiertes MutS wäre während der nachfolgenden Reaktionen nicht mehr in der Lage sich vom *mismatch* zu entfernen. Käme es trotzdem zu einer MutS-spezifischen Aktivierung von MutHL, wäre dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass MutS während der gesamten Reaktion der Strangdiskriminierung am *mismatch* gebunden vorliegt.

Das für diese Art der Untersuchung benötigte DNA-Substrat wurde durch ein Modifikation der *mismatch*-Substrat-Synthese erreicht (siehe Schema Abb. 3-10). Bei der ursprünglichen Methode (Schema links) wurde ein *mismatch*-tragendes DNA-Substrat durch das Hybridisieren von zwei Einzelsträngen erzeugt. Die Einzelstränge waren bis auf eine Base

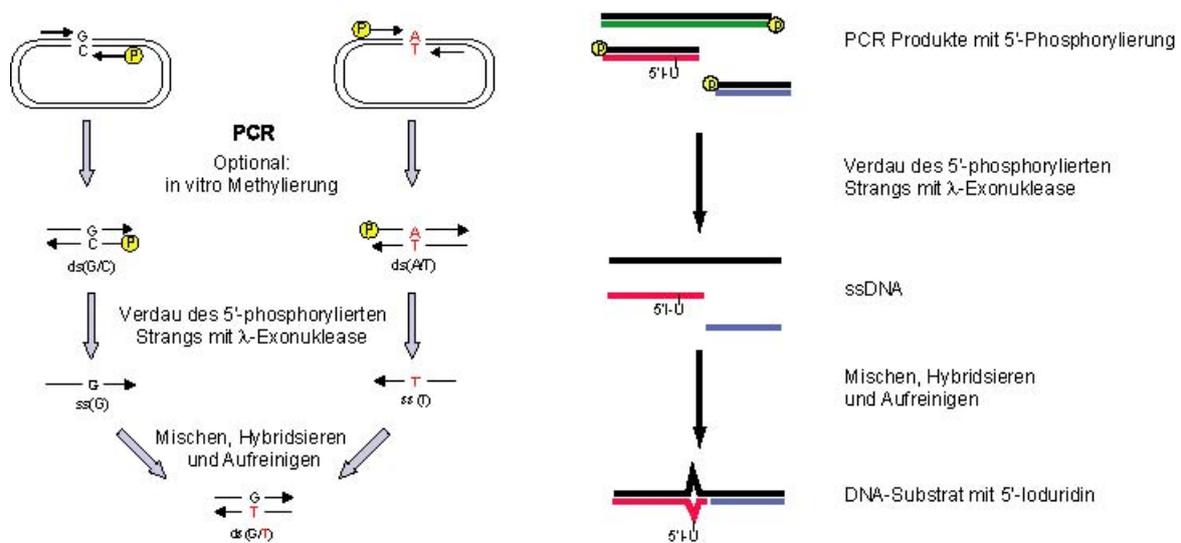


Abbildung 3-10: Schema der *mismatch*-Substratsynthese

Bild links: Methode zur Herstellung der regulären *mismatch*-Substrate; Bild rechts: Methode zur Generierung der *crosslink*-Substrate

vollständig komplementär zueinander. Erzeugt wurden die Einzelstränge durch Verdau mit dem Phagenenzym λ -Exonuklease, welches präferenziell den 5'-phosphorylierten Strang einer doppelsträngigen DNA abdaut. Die Phosphorylierung am 5'-Ende war zuvor während einer PCR mit den Primern eingeführt worden. Als Template für diese PCR-Reaktion dienten zwei Plasmide, die bis auf ein Basenpaar identisch waren.

Bei der Variation dieser Methode (Abb. 3-10 Schema rechts) wurden statt zwei, drei komplementäre Einzelstränge verwendet, da dies die einzige Möglichkeit war das 5'-Ioduridin in das fertige *mismatch*-Substrat einzuführen. Ein langer oberer Strang, enthält das Guanin für den späteren G / T-*mismatch*. Von den beiden kurzen Stränge, führt der untere linke Strang das 5'-Ioduridin gegenüber dem Guanin ein, während der untere rechte Strang zur Auffüllung des übrig bleibenden einzelsträngigen Bereichs dient. Das eingeführte 5'-Ioduridin verhält sich dabei ähnlich wie eine reguläre Thyminbase und bildete an dieser Position einen G-T *mismatch* (genauer ein G/5'IU). Das durch diese Methode erzeugte *mismatch*-Substrat enthält zwangsläufig einen *nick* zwischen den beiden kurzen Einzelsträngen, dessen Einfluss auf die MutHLS-Reaktion später genauer untersucht wird (siehe Versuch 3.3.3).

3.3.2 Herstellung des *crosslink*-Substrats

Für einen analytischen Ansatz wurden equimolare Mengen der drei 5'-phosphorylierten PCR-Produkte mit λ -Exonuklease verdaut um die komplementären Einzelstränge zu erhalten. Aufgrund der unterschiedlichen Länge, und damit verbunden das unterschiedliche Laufverhalten, konnte der Verlauf der einzelnen Produkte im Polyacrylamid-Gel verfolgt werden (Siehe Abb. 3-11). Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein reguläres PCR-Produkt der zu erwartenden Länge und zwei Ansätze bei denen jeweils ein Teilstück des unteren Strangs hybridisiert war, aufgetragen.

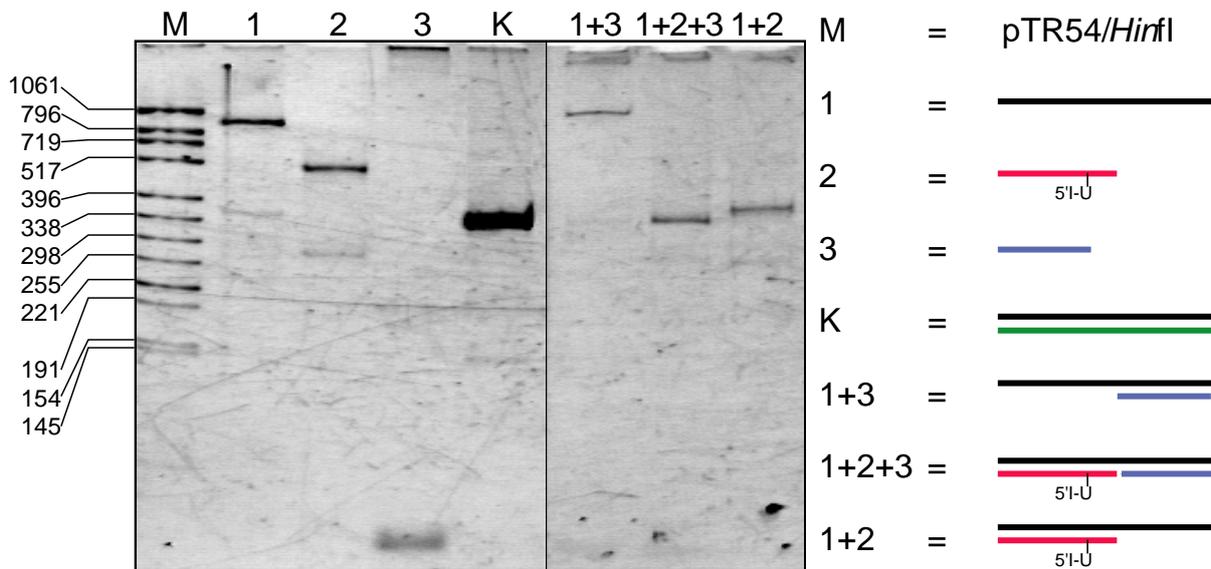


Abbildung 3-11: Laufverhalten der DNA-Produkte bei der Crosslink-Substratsynthese

Auftrag von je 100 ng DNA, nach Verdau der drei 5'-phosphorylierten PCR-Produkte (1-3) mit λ -Exonuklease und nach Hybridisierung mittels Hitzedenaturierung (Details siehe 5.5) Auftrag von jeweils 100 ng der beiden unvollständigen Produkte (1+3 u. 1+2) sowie des fertigen Crosslinksubstrats (1+2+3) auf ein natives 6 %iges PAA-Gel. Als Kontrolle (K) dienten 100 ng PCR-Produkt, der zu erwartenden Länge von 359 bp. Der verwendete Längen-Marker (M) war pTR54 / HinfI. Das fertig hybridisierte *crosslink*-Substrat (1+2+3) läuft auf der gleichen Höhe wie das Kontroll-PCR-Produkt (K) und unterscheidet sich eindeutig von den unvollständigen Hybridisierungs-Ansätzen (1+2 u. 1+3).

Spur 1-3 zeigen die Banden der einzelnen Einzelstränge. Die Einzelstränge liefen langsamer, als man es von ihrer Länge erwarten würde (359 nt bzw. 278 nt), eine Beobachtung, die bei allen bisher erzeugten Einzelsträngen > 150 bp gemacht werden konnte. Eine Erklärung hierfür ist wahrscheinlich die Ausbildung von Sekundärstrukturen wie z.B. *hairpin*-Strukturen, die die Wanderung im Gel behindern und damit eine höhere Masse simulieren. Der dritte Einzelstrang (81 nt) entspricht dagegen der erwarteten Fragmentgröße. Bei der Hybridisierung aller drei Einzelstränge (1+2+3) erhielt man ein Produkt, das trotz der fehlenden Verknüpfung der beiden unteren Stränge (*nick*) ein Laufverhalten zeigte, das vergleichbar mit dem PCR-Produkt (K) entsprechender Länge war. Die daneben aufgetragenen Kontrollen, zeigten welches Bandenmuster bei unvollständiger oder fehlerhafter Hybridisierung zu erwarten gewesen wäre. In diesem Falle wäre eine deutlich zu unterscheidende Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit aufgetreten (vgl. 1+3 oder 1+2 mit 1+2+3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit diesem Protokoll ein qualitativ hochwertiges *mismatch*-Substrat herstellen ließ, bei dem an der Position des *mismatch* ein 5'Ioduridin eingebaut war. Das 5'-Ioduridin sollte nun, nachdem es durch Bestrahlung mit UV-Licht

aktiviert worden ist, eine kovalente Bindung mit einem an der *mismatch*-Erkennung beteiligten Aminosäurerest von MutS eingehen und dieses dadurch an dieser Position fixieren. Vor dem Durchführen dieser *crosslink*-Reaktion, galt es allerdings noch zu überprüfen, ob der bei dieser Methode integrierte *nick*, der 15 bp entfernt vom *mismatch* am 5'-Ende lag, einen Einfluss auf die MutHLS-Aktivität hatte, um eine störende Wirkung dieser Lücke auszuschließen.

3.3.3 Einfluss eines *nicks* im *mismatch*-Substrats auf die MutHLS-Reaktion

In diesen Versuch wurde die MutHLS-Aktivität auf dem neuen *crosslink*-Substrat mit der Aktivität auf einem herkömmlichen *mismatch*-Substrat verglichen.

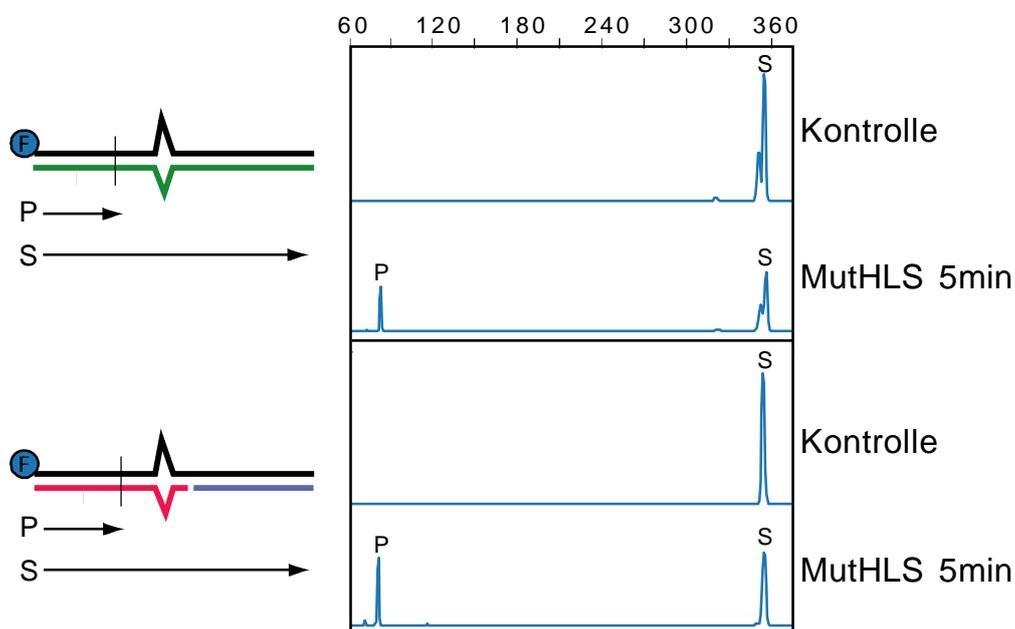


Abbildung 3-12: Vergleich MutHLS-Reaktion auf einem *crosslink*-Substrat oder einem regulären *mismatch*-Substrat

Es wurden jeweils 30 nM DNA (*crosslink*-Substrat bzw. *mismatch*-Substrat) mit 2 μ M MutS und 1 μ M MutL vorinkubiert. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von 50 nM MutH gestartet und bei 37°C fortgeführt. Als Kontrollen wurden identische enzymfreie Ansätze verwendet. Nach 5 min wurde ein Aliquot entnommen und durch Zugabe von TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. S = Substrat 359 bp; P = Produkt 84 bp. Es ist kein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Reaktionen zu erkennen.

Beide Reaktionen zeigten einen ähnlichen Verlauf. Nach 5 min war bei beiden Reaktionen etwa die Hälfte des Substrats gespalten. Ein *nick* in der Nähe des *mismatches* schien somit keinen störenden Einfluss auf die MutHLS-Aktivität zu haben. Eine negative Auswirkung auf das später durch den *crosslink* fixierte MutS, war von dieser Seite aus daher nicht zu erwarten. Nach Klärung dieser Fragestellung, wurde nun versucht mit diesem Substrat einen MutS-DNA-*crosslink* zu etablieren.

3.3.4 DNA-Bindung von MutS

Da die Ausbeute der *crosslink*-Reaktion stark von optimalen Reaktionsbedingungen abhängt, wurden verschiedene Versuchsparameter vor Beginn der Bestrahlungsreihe getestet. Als erstes wurde die Bindungskapazität von MutS überprüft und gleichzeitig untersucht, ob in der verwendeten MutS-Präparation genug aktives Enzym vorhanden war um ein *mismatch*-Substrat binden zu können (siehe Abb.3-11).

Dazu wurden verschiedene MutS-Konzentrationen mit einem radioaktiv markierten *mismatch*-Substrat oder einem PCR-Produkt der gleichen Sequenz gemischt und nach kurzer Inkubation auf ein natives PAA-Gel aufgetragen.

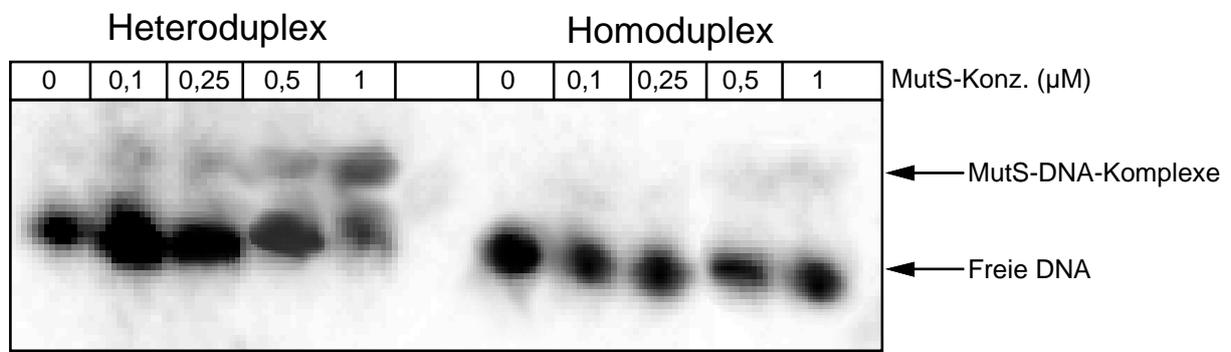


Abbildung 3-13: Shift-Assay MutS:

Jeweils 10 nM DNA (*mismatch*-Substrat bzw. PCR-Produkt) wurden mit MutS (0, 0.1, 0.25, 0.5 bzw. 1 μM) in 1 X Puffer gelb für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 50 % Succrose zugesetzt und die Proben auf ein natives 6 %iges PAA-Gel aufgetragen. Die Analyse erfolgte mittels InstantImager. Der *mismatch*-tragende Heteroduplex wird deutlich besser von MutS gebunden als der Homoduplex.

Die MutS-Bindung an den *mismatch*-tragenden Heteroduplex ist deutlich zu erkennen. Bei Verwendung von 1 μM MutS werden ca. 50 % der DNA gebunden. Beim Homoduplex sind bei dieser Enzym-Konzentration unter 5 % gebunden. Trotz des 100-fachen Enzymüberschuss konnte nicht die gesamte DNA gebunden werden. Der gebundene Anteil ist aber ausreichend um mit den *crosslink*-Versuchen fortzufahren.

3.3.5 Kontrolle der Oligoduplexbildung

Zur weiteren Optimierung der *crosslink*-Reaktion, erfolgten Bestrahlungsversuche mit MutS und mit einem 39 bp Oligoduplex anstatt des langen *crosslink*-Substrats. Dieser Substrat-Wechsel wurde durchgeführt, um größere Mengen in der Reaktion einsetzen zu können und damit eine einfachere Analyse und breitere Untersuchung der Versuchsparameter

möglich ist. Der verwendete Oligoduplex war allerdings sequenzidentisch, verglichen mit dem *crosslink*-Substrat und trug wie dieses ein 5'-Ioduridin an der späteren *mismatch*-Position.

Vor der Verwendung war die Qualität des Oligoduplexsubstrat genauer untersucht worden, um auszuschließen, dass bei der Prozedur der Hybridisierungsreaktion, der Duplexanteil stark reduziert war. Da das Vorhandensein eines DNA-Doppelstrangs von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit MutS ist, wurde der Erfolg dieser Hybridisierungsreaktion durch Analyse auf einem nativen PAA-Gel überprüft (Abb. 3-15).

Dazu wurde das Oligonukleotid HindIII-X zum einen mit dem komplementären Gegenstrang XhoIhin aber auch mit zwei nichtkomplementären Oligonukleotiden hybridisiert (Sequenz der Oligonukleotide siehe 5.5.4, Hitzedenaturierung nach 5.5.1). Die Wanderungsgeschwindigkeit der dabei entstehenden Produkte wurde auf einem nativen 10 %igem PAA-Gel bestimmt.

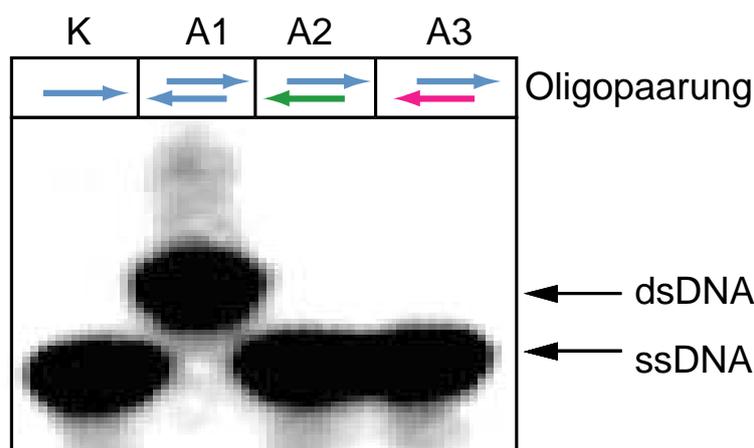


Abbildung 3-14: Kontrolle der Duplex-Ausbeute nach Einzelstrang-Hybrisierung

10 μ M des radioaktiv markierten Oligonukleotids HindIIIrück-X wurden mit 10 μ M des komplementären Oligonukleotids XhoIhin hybridisiert (A1). Als Kontrolle wurden zusätzliche Hybridisierungsansätze mit einer Leerprobe (K) und mit zwei Oligonukleotiden mit nicht komplementärer Sequenz durchgeführt (A2 = HindIIIrück u. A3 = HindIIIclose). Nach erfolgter Hybridisierungsreaktion wurden die Proben auf ein natives 10 %iges PAA-Gel aufgetragen und die Banden mit Hilfe des InstantImagers analysiert. Wie zu erwarten war führt nur der Einsatz der komplementären Oligonukleotide (A1) zu Ausbildung eines höher laufenden Doppelstrangs.

Die Kontrolle (K) mit der Leerprobe zeigte das Wanderungsverhalten von HindIIIrück-X als Einzelstrang. Die gleiche Höhe im Gel konnte beobachtet werden beim Versuch dieses Oligonukleotids mit nicht komplementären Strängen zu hybridisieren (A2 und A3). Allein bei der Hybridisierung mit dem korrekten Gegenstrangs (A2), kam es zur Ausbildung eines Doppelstrangs und dem damit verbunden höheren Laufverhalten der Bande. Das

Hybridisieren equimolarer Oligonukleotid-Konzentrationen resultierte somit in einer guten Duplex-Ausbeute. Als mögliche Fehlerquelle für eine mangelhafte *crosslink*-Ausbeute, konnte die Hybridisierungs-Prozedur damit ausgeschlossen werden.

3.3.6 Optimierung der *crosslink*-Ausbeute mit Oligoduplex-Substraten

Nach Kontrolle der MutS-Bindung und der Qualität des Oligoduplex, wurde nun mit einer Serie von Bestrahlungen begonnen. Variiert wurden dabei verschiedene Parameter, wie Bestrahlungsdauer, Pufferbedingungen und Enzym- bzw. Substrat-Konzentration. Nach Bestrahlung mit dem UV-Laser wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und sowohl die DNA- als auch die Protein-Banden detektiert.

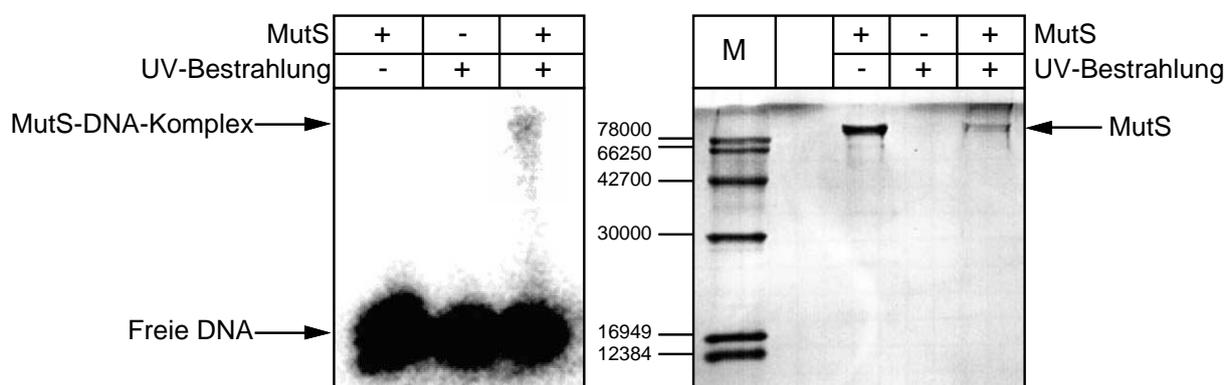


Abbildung 3-15: MutS-DNA-Crosslink

2 μ M MutS wurden mit 20 nM radioaktiv markierten *mismatch*-Oligoduplex (XhoIhin / HindIIIrück-X) reagiert. Die gewählten Puffer Bedingungen waren 20mM Tris/HCL pH 7,5 und 100 mM KCl. Die Bestrahlung erfolgte mit dem UV-Laser für 30 min auf Eis und wurde anschließend mit LAP abgestoppt. Als Kontrollen wurden zusätzlich ein identischer enzymfreier Ansatz und ein Ansatz ohne Bestrahlung durchgeführt. Die Proben wurden zusammen mit einem Proteinstandard (Merck IV) auf ein SDS-Gel (6 % Sammelgel/ 10 % Trenngel) überführt. Das Gel wurde erst unter dem InstantImager analysiert und anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt und im Durchlicht photographiert. Die *crosslink*-Reaktion zeigt einen höher laufenden MutS-DNA-Komplex, gleichzeitig erfolgt eine Abnahme der MutS-Bande.

Wie deutlich zu erkennen war, bildete sich nur bei UV-Bestrahlung und bei Gegenwart von MutS eine höher laufende Bande aus. Die Bande befindet sich an einer Laufhöhe, die für einen MutS-DNA-Komplex spricht. Die Stärke dieser Komplex-Bande ist allerdings äußerst gering (<5 %). Eine Korrelation dieser Bande mit MutS und DNA konnte durch die Coomassie-Färbung bestätigt werden, da die Proteinbanden von MutS sowohl bei der Kontrolle als auch bei der bestrahlten Probe deutlich zu erkennen waren und mit der Laufhöhe der radioaktiven Bande übereinstimmten. Auffällig war allerdings, dass die Bandenintensität bei der bestrahlten Probe deutlich abgeschwächt war. Diese Abnahme, die möglicherweise auf Photolyse des Enzyms zurückzuführen sein könnte, wäre eine mögliche Erklärung für die

schlechte *crosslink*-Ausbeute. Ein inaktives MutS vor der Bestrahlung konnte ausgeschlossen werden, da sowohl die *mismatch*-Bindung (siehe Abb. 3-13) als auch die Aktivität des Enzyms zuvor getestet worden war (siehe Abb. 3-12).

3.3.7 Verwendung von Oligonukleotiden mit multiplen 5'-Ioduridinen

Da die Ausbeute des MutS-DNA-*crosslinks* auch bei weiteren Variationen der Versuchparameter niedrig blieb, wurde versucht durch die Verwendung von zwei neuen Oligonukleotiden mit zwei bzw. drei zusätzlichen 5'-Ioduridinen (siehe Abb. 3-16) eine Steigerung der Ausbeute zu bewirken.

```
1.) GGCGTAGAGGATGAAGCTTTCGAGCCCGCGAAATTAATA
2.) GGCGTAGAGGATGAAGCTTTTCGAGCCCGCGAAATTAATA
3.) GGCGTAGAGGATGAAGCTTTTTTCGAGCCCGCGAAATTAATA
T = 5'-Iodouridin
```

Abbildung 3-16: Sequenz der *crosslink*-Oligonukleotide

Bezeichnung der Oligonukleotide: 1.) HindRück-X 2.) HindRück-3X 3.) HindRück-4X

Der erste mit diesem neuen Oligonukleotiden gebildete Duplex, hatte zu dem am *mismatch* beteiligten 5'-Ioduridin, zwei benachbarte 5'-IUs, die eine „reguläre“ A-T Basenpaarung imitierten. Bei Verwendung des dritten Oligos bei der Duplexbildung, wurde ein zusätzliches nicht-paarendes 5'-IU eingeführt, was von MutS als Insertion (ΔT) mit höchster Präferenz erkannt wird.

Nach der Bestrahlung der Proben mit dem UV-Laser wurden sie auf ein SDS-Gel aufgetragen und sowohl die DNA- als auch die Protein-Banden detektiert (siehe Abb. 3-17).

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Erhöhung der reaktiven 5'-Ioduridine im Duplex zu einer Verbesserung der MutS-DNA-Komplexbildung führt. Auffällig ist, dass beim Duplex mit drei bzw. vier 5'-Ioduridinen eine zusätzliche höher laufende Bande auftritt. Erklärung hierfür könnte ein DNA-DNA-*crosslink* sein, der bei einem Duplex mit bereits quervernetztem MutS, auftritt. Die *crosslink*-Ausbeute konnte mit den zusätzlichen 5'-Ioduridinen von 5 % auf 10 - 20 % gesteigert werden. Die Coomassie Färbung zeigt aber weiterhin, dass es in allen drei Ansätzen durch die Bestrahlung zu einer Photolyse von MutS kommt.

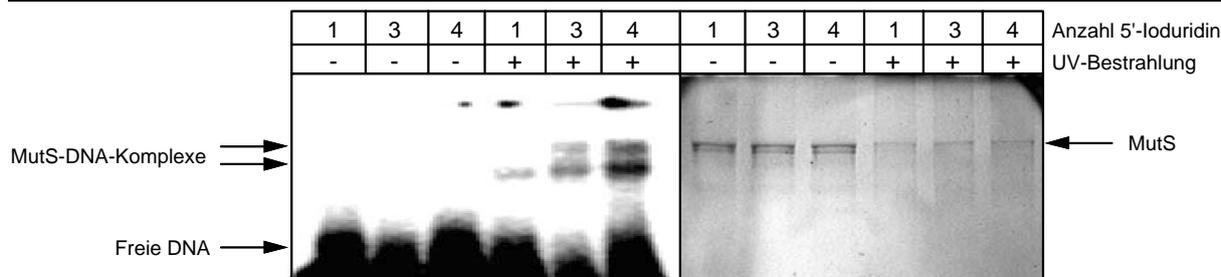


Abbildung 3-17: Crosslink-Reaktion mit MutS und einem Oligoduplex mit einem, drei oder vier 5'-Ioduridinen

500 nM MutS wurden mit jeweils 500 nM der radioaktiv markierten Oligoduplexes (HindRück-X, 3X bzw. 4X) gemischt und dann für 1h auf Eis mit dem UV-Laser bestrahlt. Als Kontrollen dienten identische Ansätze ohne Bestrahlung. Alle Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (6 % Sammelgel/ 10 % Trenngel) mittels InstantImager analysiert und anschließend das Gel mit Coomassie-Blue gefärbt. Es zeigt sich, dass die zusätzlichen 5'-Ioduridine zu einer verbesserten *crosslink*-Ausbeute führen.

3.3.8 Vergleich der *crosslink*-Ausbeute bei Verwendung eines Hetero- bzw. Homoduplex

Die Verwendung der Oligoduplexes mit den zusätzlichen 5'-Ioduridinen erhöhte die *crosslink*-Ausbeute erheblich. Es musste allerdings geklärt werden, ob diese verbesserte Ausbeute auf Kosten der Spezifität zustande gekommen war. Ein MutS, das zwar an die DNA fixiert vorliegt, aber keinen *mismatch* erkannt hat, ist möglicherweise nicht in der Lage die nachfolgenden Enzyme MutHL zu aktivieren.

Zur Untersuchung der Spezifität der *crosslink*-Reaktion, wurde daher die Ausbeute, die mit einem Homoduplex zustande kommt, verglichen mit der eines Heteroduplex.

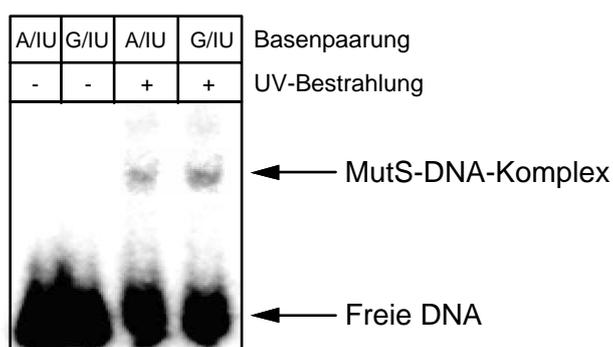


Abbildung 3-18: Vergleich der *crosslink*-Ausbeute zwischen Homo- und Heteroduplex

Jeweils 50 nM radioaktiv markierter Oligoduplex (mit G/IU- bzw. A/IU- Paarung) wurden mit 500 nM MutS auf Eis inkubiert und für jeweils 1 h mit einem UV-Laser bestrahlt. Als Kontrollen wurden zusätzlich zwei enzymfreie Ansätze pipettiert. Die einzelnen Proben wurden anschließend auf einem SDS-Gel (6 % Sammelgel/ 10 % Trenngel) aufgetragen und mit dem InstantImager analysiert. Beide Substrate führen zur Bildung einer vergleichbaren Menge MutS-DNA-Komplex. Eine Spezifität für den *mismatch* ist nicht mehr zu erkennen.

Sowohl beim Homo- als auch beim Heteroduplex tritt eine deutlich zu erkennende Protein-DNA-Bande auf, wobei sich aber quantitativ kein signifikanter Unterschied feststellen lässt. Die Vermutung, dass es sich bei der erhöhten *crosslink*-Ausbeute um unspezifisch gebundenes MutS handelt, kann damit nicht ausgeschlossen werden. Eine andere mögliche Erklärung für dieses Ergebnis, wäre eine Erkennung der A/IU-Paarung als *mismatch* durch MutS, was zu der gleichen Beobachtung führen würde.

Aufgrund dieser zweideutigen Ergebnisse und der weiterhin auftretenden Photolyse von MutS während der *crosslink*-Prozedur, wurde das *crosslink*-Projekt an dieser Stelle abgebrochen. Begründet wurde diese Entscheidung unter anderem auch dadurch, dass neu erzielte Resultate ein Verbleiben von MutS am *mismatch* während der Strangdiskriminierung ausschlossen (siehe unten). Diese neuen Ergebnisse standen mit neueren Veröffentlichungen in Einklang und unterstützten vielmehr eine Dissoziation von MutS nach der *mismatch*-Erkennung (Acharya, 2003).

3.4 Variabler Abstand zwischen *mismatch* und d(GATC)

3.4.1 *Mismatch*-Substrat-Herstellung mit zwei d(GATC)-Sequenzen

Sowohl ein *looping*- als auch ein Translokations-Mechanismus benötigen immer einen gewissen Mindestabstand zwischen dem *mismatch* und der d(GATC)-*Sequenz*, da ein Kontakt der beteiligten Enzyme ein Biegen der DNA voraussetzt. MutH-Erkennungssequenzen, die zu dicht am *mismatch* liegen, sollten über solch einen Mechanismus gar nicht oder nur sehr schwer zu erreichen sein, da die Doppelhelix-Struktur der DNA einem zu starken Knicken entgegenwirkt.

Um diese Überlegung experimentell zu überprüfen, wurden über zielgerichtete Mutagenese zusätzliche d(GATC)-Sequenzen in die beiden für die *mismatch*-Substratsynthese verwendeten Plasmide eingeführt. Die Position der neu eingeführten d(GATC)-Sequenz befand sich jeweils 80, 40, 20 oder 10 bp vom *mismatch* entfernt. Da flankierende Sequenzen einen Einfluss auf die Spaltaktivität haben, wurde zur Minimierung dieses Effekts eine BamHI-Sequenz (GGATCC) eingeführt. Als günstigen Nebeneffekt konnte dadurch die Überprüfung der Mutagenese über einen Verdau mit BamHI erfolgen. Das Bandenmuster beim BamHI-Verdau ist im Folgenden exemplarisch für die vier Plasmidvarianten dargestellt (Abb. 3-19).

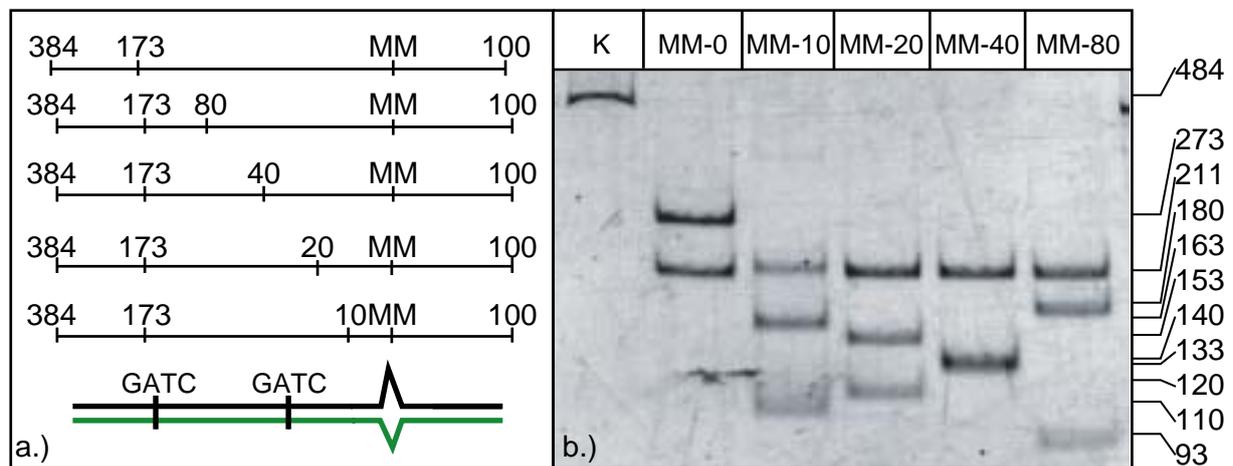


Abbildung 3-19: Nachweis der neu eingeführten BamHI-Sequenz

(a.): Schema der eingeführten BamHI-Sequenz, die Zahlen entsprechen dem Basenpaar-Abstand vom *mismatch* zur d(GATC)-Sequenz bzw. dem DNA-Ende (b.): Auf ein natives 6 %iges PAA-Gel wurden pro Spur 100 ng PCR Produkt aufgetragen, die alle (mit Ausnahme der Kontrolle K) mit 4 U BamHI für 30 min bei 37 °C verdaut wurden. Als Marker (M) diente pTR54 / HinFI. Man beachte, dass alle Substrate immer bei 211 bp (173 bp vom *mismatch*) gespalten werden.

Der BamHI-Verdau des 484 bp PCR Produkts erzeugte, je nach Position der neu eingeführten BamHI-Sequenz, unterschiedliche Spaltfragmente. Bei allen Spaltansätzen wurde ein 211 bp Fragment erzeugt, was als Kontrolle des vollständig erfolgten BamHI-Verdaus diente. Die zweite neu eingeführte BamHI-Sequenz konnte durch den Verdau ebenfalls nachgewiesen werden.

Da die Auflösung eines Polyacrylamidgels nicht ausreicht um die tatsächliche Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden daher alle Plasmide in dem für die *mismatch*-Substratsynthese wichtigen Bereich sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte sowohl den Abstand zwischen *mismatch* und BamHI-Sequenz als auch die Korrektheit der DNA-Sequenz. Letzteres ist essentiell für die nachfolgenden Untersuchungen mit dem MutHLS-Assay, da damit im fertigen *mismatch*-Substrat das Vorhandensein eines zusätzlichen *mismatch* an einer undefinierten Stelle ausgeschlossen werden kann.

Die so überprüften Plasmide wurden im Anschluss zu Herstellung hemimethylierter *mismatch*-Substrate verwendet, die für die folgenden MutHLS-Assays benutzt wurden.

3.4.2 MutHLS-Reaktion auf *mismatch*-Substraten mit variablen Abständen zur d(GATC)-Sequenz

Die neu synthetisierten hemimethylierten *mismatch*-Substrate mit der zusätzlichen d(GATC)-Sequenz wurden in einem MutHLS-Assay eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot aus dem jeweiligen Ansatz entnommen und mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Die Proben wurden mittels Kapillarelektrophorese analysiert und aus den erhaltenen Daten der Verlauf der Kinetik bestimmt (siehe Abb. 3.20).

Die Substrate, die bei dieser Messreihe verwendet wurden, waren durch einen Fluorophor am 5'-Ende des unmethylierten Strangs markiert. Bedingt durch diese Endmarkierung, kann das Produkt (P1), welches durch eine Spaltung der distalen d(GATC)-Sequenz entsteht, weiter zum kürzeren Produkt P2 prozessiert werden. Dagegen kann die weitere Prozessierung des zuerst an der proxiamlen Erkennungssequenz gespaltenen Produkts P2 nicht verfolgt werden. Daraus resultiert bei den Substraten mit zwei Spaltstellen die Abnahme des Produktpeaks P1 (**rot**) und das kontinuierliche Ansteigen von P2 (**grün**).

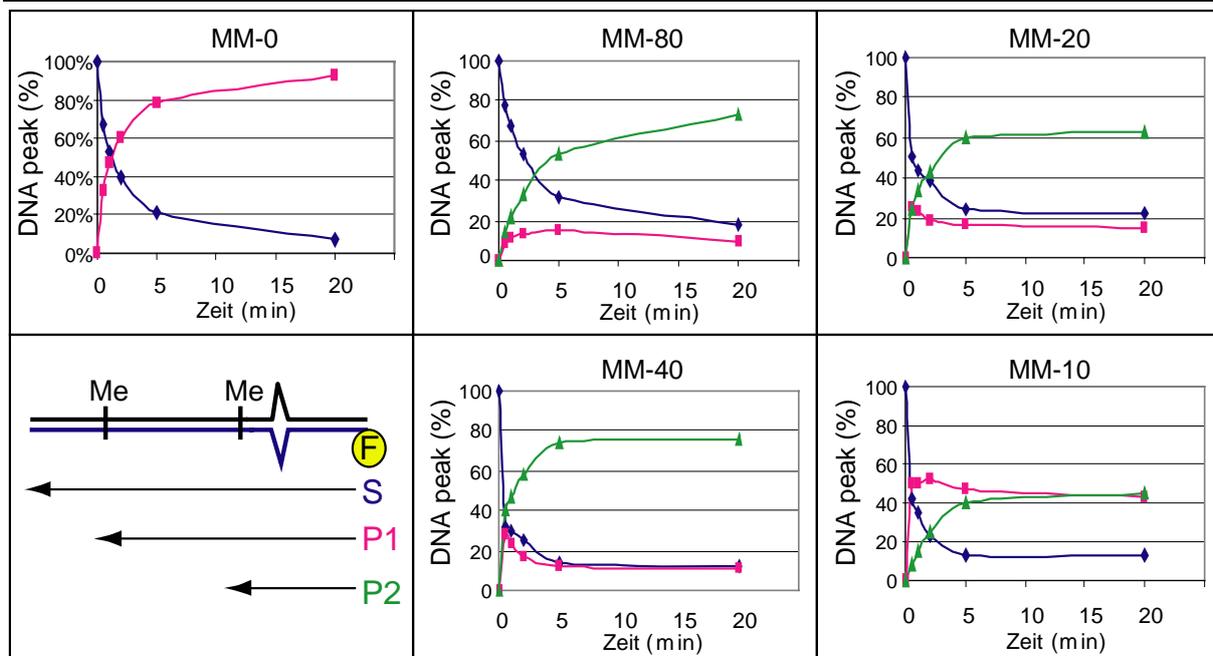


Abbildung 3-20: MutHLS-Kinetik bei verschiedenen Substraten

Jeweils 5 nM *mismatch*-Substrat (MM-0, MM-10, MM-20, MM-40 bzw. MM-80) wurden mit 500 nM MutS, 250 nM MutL und 20 nM MutH inkubiert. Der Puffer enthielt 1 mM ATP und 125 mM KCl und die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach jeweils 0,5, 1, 2, 5 und 20 min wurde eine Probe entnommen und mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Die einzelnen Ansätze wurden mittels Kapillarelektrophorese analysiert und die enthaltenen Daten graphisch dargestellt. S = Substrat = 484 bp; P1 = Produkt 271 bp; P2 = 176 / 136 / 126 / 126 bp (für MM-80, -40, -20 bzw. -10). Tendenziell werden MutH-Erkennungssequenzen, die näher am *mismatch* liegen langsamer gespalten.

Eine bevorzugte Spaltung an der distalen d(GATC)-Sequenz war daran zu erkennen, dass die Ausbildung des Produkts P1 in den ersten zwei Minuten der Reaktion bevorzugt erfolgte (siehe MM-10). Dies spricht gleichzeitig für eine verzögerte oder inhibierte Spaltung an der proximalen d(GATC)-Sequenz. Wurde die proximale Erkennungssequenz gleich schnell oder schneller gespalten, war eine Ausbildung größerer Mengen P1 nicht möglich, da es sofort weiter prozessiert wurde (siehe MM-80).

Vergleicht man die Spalthäufigkeit zwischen den beiden d(GATC)-Sequenzen, ist bei den einzelnen Substraten folgende Abhängigkeit zu erkennen.

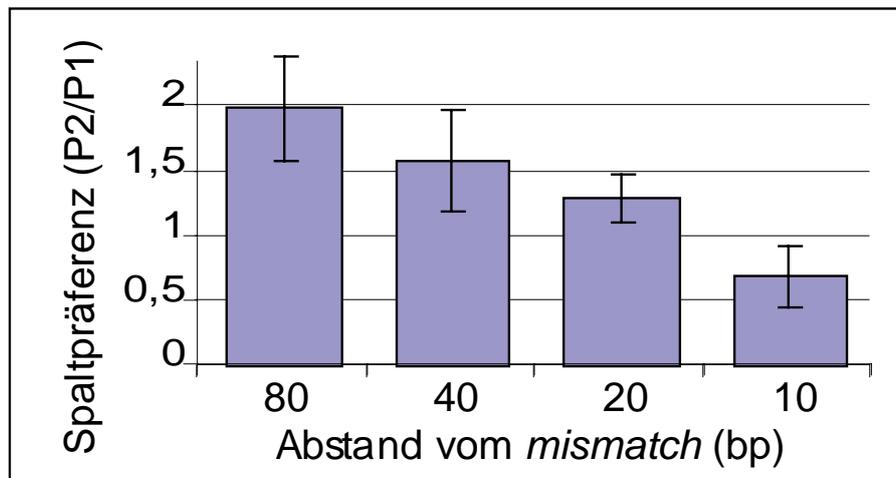


Abbildung 3-21: Relative Spaltpräferenz der nahen d(GATC)-Sequenz im Vergleich zur distalen

Die Mittelwerte und Standardabweichung stammen aus fünf unabhängigen Messungen unter Betrachtung des Produktverhältnisses nach 1 min. Werte über 1 zeigen eine relativ schnellere Spaltung der proximalen d(GATC)-Sequenz, Werte unter 1 entsprechend für die distale Sequenz. Man erkennt, dass je näher eine Spaltstelle am *mismatch* gelegen ist, desto langsamer wird sie gespalten.

Bedingt durch die Endmarkierung war eine genaue Bestimmung der tatsächlichen Spaltgeschwindigkeiten an den einzelnen MutH-Erkennungssequenzen nicht möglich. Eine relative Aussage über die Geschwindigkeit, konnte aber getroffen werden durch das Verhältnis der Produktpeaks (P2 / P1) nach 1 min. Eine Spaltpräferenz über 1 zeigt an, dass relativ gesehen die proximale d(GATC)-Sequenz schneller gespalten wird, bei einem Wert unter 1 entsprechend die distale. Allgemein lässt sich sagen, dass sich das Verhältnis der Produktentstehung bei sich verringerndem Abstand zum *mismatch* umkehrt, was auf eine Abnahme der Spaltgeschwindigkeit spricht.

Dieses Resultat passt auf den ersten Blick sehr gut zu der Beschreibung des *loopings*- aber auch des Translokations-Modells. Diese beiden Modelle benötigen für eine Kopplung zwischen *mismatch* und Strangdiskriminierung eine gewisse Länge der DNA um ein Biegen zu bewerkstelligen. Durch beide Mechanismen würden weit vom *mismatch* entfernte d(GATC)-Sequenzen bevorzugt gespalten. Bei einem *sliding clamp*-Mechanismus würden dagegen näher liegende d(GATC)-Sequenzen bevorzugt. Einziges Problem bei dieser Schlussfolgerung ist die Beobachtung, dass auch bei einem Abstand von 10 bp zum *mismatch* eine Spaltung induziert werden konnte, was sich durch das *loopings*- und Translokations-Modell nicht erklären lässt, dafür aber sehr wohl mit dem *sliding clamp*-Mechanismus.

Auf Grund dieser Ungereimtheit wurde der Aspekt der Spaltung bei der 10 bp entfernten MutH-Erkennungsstelle etwas genauer untersucht, um eventuelle Fehler oder noch nicht identifizierten Nebenreaktionen aus zu schließen.

3.4.3 Mögliche Erklärung der 10 bp entfernten Spaltung durch MutHLS

Eine Spaltung der 10 bp vom *mismatch* entfernten d(GATC)-Sequenz des MM-10-Substrats lassen ein Verweilen von MutS an dieser Position für eher unwahrscheinlich erscheinen. Durch die Veröffentlichung der Ko-Kristallstruktur von MuS mit DNA (Lamers, 2000) ist bekannt, dass das Enzym bei der Bindung eines *mismatch* etwa 12 Basenpaare besetzt hält. Die effektive Spaltstelle von MutH befindet sich auf dem MM-10-Substrat jedoch nur 6 Basenpaare vom *mismatch* entfernt und überschneidet sich somit mit der durch MutS besetzten Region. Da es aber trotzdem zu einer langsamen aber deutlichen Spaltung an dieser Position kommt, lässt sich dieses Phänomen durch eine feste MutS-Bindung nicht erklären. Bevor dies allerdings als Nachweis für ein abdissoziierendes MutS gelten kann, müssen andere Möglichkeiten für diese Beobachtung ausgeschlossen werden.

Eine der ersten offensichtlichen Erklärungen für dieses Ergebnis, wäre die Existenz weiterer Basenfehlpaarungen auf dem Substrat, die von ihrer Position aus die Spaltung an der 10-bp-Sequenz induzieren. Daher wurden die für die *mismatch*-Substratsynthese verwendeten Plasmide durch eine Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Dabei zeigte sich, dass alle Plasmide in dem relevanten Bereich, der für die *mismatch*-Substratsynthese wichtig ist, die gewünschte Basenfolge besaßen. Ein zusätzlicher *mismatch* war von dieser Seite aus daher nicht zu erwarten.

Was allerdings nicht ausgeschlossen werden konnte, waren Basenfehlpaarungen, die während der Prozedur der *mismatch*-Substratsynthese, insbesondere beim Hybridisierungsschritt, erzeugt wurden. Diese Möglichkeit wurde in dem folgenden Experiment genauer untersucht.

3.4.4 Vergleich der Spaltung an der 10 bp entfernten d(GATC)-Sequenz bei einem Homo- und Heteroduplex in Konkurrenz

Es wurde erneut die MutHLS-Reaktion auf dem *mismatch*-Substrat mit der 10 bp entfernten d(GATC)-Sequenz durchgeführt. Um auszuschließen, dass die verwendeten *mismatch*-Substrate zu der gewünschten G - T-Paarung noch einen anderen *mismatch* enthalten, wurde die MutHLS-Reaktion auf einem Homoduplex mit der Reaktion auf einem Heteroduplex verglichen. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Spaltungen wurden die Substrate in Konkurrenz eingesetzt. Um nachzuweisen, dass die MutH-Erkennungssequenzen des Homoduplex genauso gut wie beim Heteroduplex gespalten werden könne, wurde zusätzlich eine *mismatch*-unabhängige MutHL-Spaltung durchgeführt.

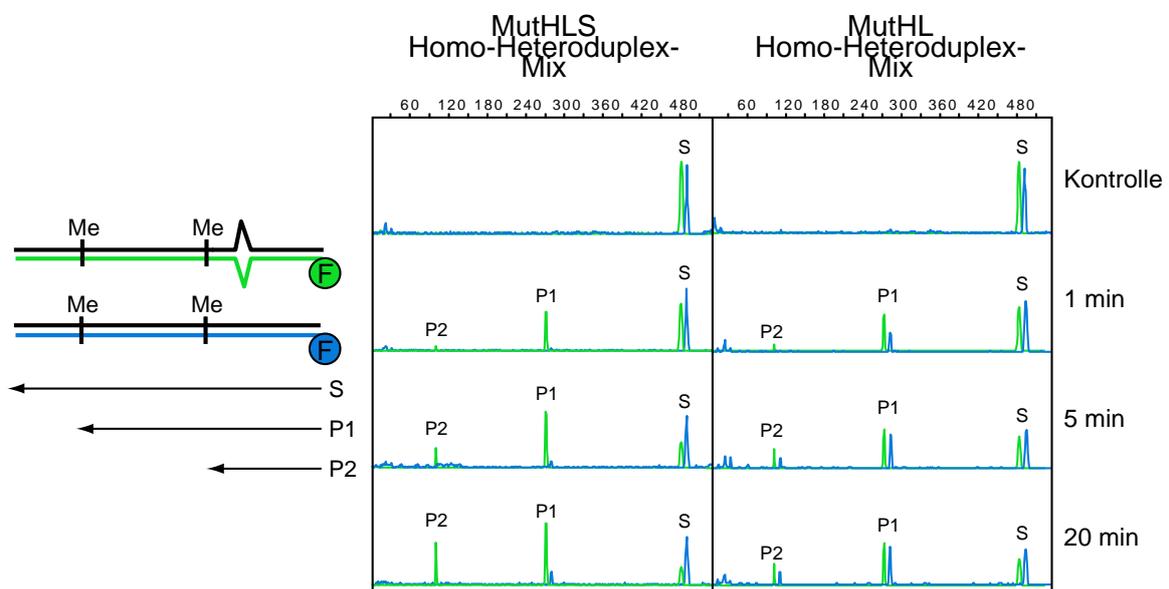


Abbildung 3-22: Verdau eines Homo- und Heteroduplex in Konkurrenz

Jeweils 5 nM eines Homo- (blau) und Heteroduplex (grün) wurden gemischt und durch 500 nM MutS, 500 nM MutL und 50 nM MutH in Gegenwart von 125 mM KCl inkubiert. Nach 1, 5 und 20 min bei 37°C wurde jeweils ein Aliquot entnommen und mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Als Nachweis der Spaltbarkeit des Substrats wurde ein identischer Ansatz ohne MutS und KCl durchgeführt. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. S = Substrat 484 bp; P1 = Produkt 271 bp; P2 = Produkt 106 bp. In der MutHLS-Reaktion wird bevorzugt der Heteroduplex gespalten, wobei Spaltung an der distalen d(GATC)-Sequenz (P1) bevorzugt wird. Die *mismatch*-unabhängige MutHL-Reaktion zeigt, dass beide Substrate mit gleicher Effizienz gespalten werden können.

Wie schon zuvor beobachtet werden konnte (vgl. Versuch 2.4), wurde bei der MutHLS-Reaktion bevorzugt das *mismatch*-Substrat gespalten, während die Spaltung des Homoduplex deutlich langsamer erfolgte. Im Gegensatz dazu wurden bei der *mismatch*-unabhängigen MutHL-Reaktion beide Substrate ähnlich gut prozessiert, wobei der Homoduplex geringfügig langsamer gespalten wurde. Bei beiden Ansätzen, MutHL oder MutHLS, wurde die distale

d(GATC)-Sequenz schneller gespalten als die proximale. Dies deutet darauf hin, dass diese Erkennungssequenz von MutH allgemein schlechter gespalten wird, was wahrscheinlich auf den Basenkontext zurückzuführen sein könnte. Trotz der schlechteren Spaltung an dieser Position ist aber doch ein signifikanter Unterschied zwischen dem Produktpeak des Homoduplex und des Heteroduplex zu erkennen.

Durch eine sechsmalige Wiederholung des Experiments konnten die folgenden Kinetiken erstellt werden.

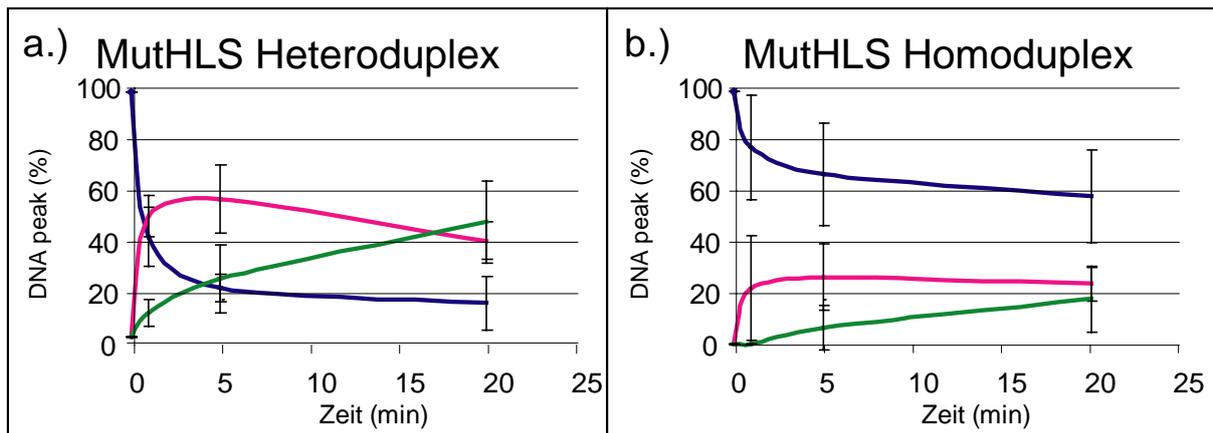


Abbildung 3-23: MutHLS-Reaktion auf Homo- und Heteroduplex in Konkurrenz

Gemittelte Daten und Standardabweichung aus 6 verschiedenen Ansätzen. Substratpeak (blau); Produktpeak distal (rot); Produktpeak nah (grün)

Ein Unterschied zwischen der Spaltung des Homo- und Heteroduplex ist deutlich zu erkennen. Die proximale Spaltstelle wird zwar langsamer prozessiert, aber die Präferenz für den Heteroduplex ist sichtbar. Die proximale Spaltstelle des Heteroduplex wird um 2,5 bis 6-fach besser prozessiert als beim Homoduplex. Dieses Ergebnis reicht als Nachweis um zu zeigen, dass die Spaltung an der proximalen d(GATC)-Sequenz tatsächlich vom *mismatch* aus induziert wird. MutS kann somit nicht während der Strangdiskriminierung am *mismatch* gebunden vorliegen.

3.5 **Roadblock auf der DNA**

3.5.1 **Mögliche Strategien für die Bildung einer Blockade zwischen *mismatch* und d(GATC)-Sequenz**

Eine Möglichkeit einen *sliding clamp*-Mechanismus direkt nachzuweisen, besteht im Einführen einer physikalischen Blockade (*roadblock*) zwischen dem *mismatch* und der MutH-Erkennungssequenz. Dieses Hindernis könnte z.B. aus einer extremen DNA-Struktur wie einer *holiday junction* bestehen. Diese Methode wurde in der Literatur bereits im Zusammenhang mit dem MutHLS-System beschrieben (Schofield, 2001), die Herstellung ist aber sehr aufwendig und mit hohen Kosten verbunden. Eine andere Möglichkeit der Blockade wäre die spezifische Bindung eines Proteins an die DNA, wie z.B. eines katalytisch inaktiven Restriktionsenzym. Da hier die Möglichkeit besteht, dass MutS dieses Enzym während des *slidings* verdrängt, muss das verwendete Enzym eine sehr hohe Bindungskonstante haben. Eine dritte Methode, die in Frage kommt, ist das spezifische Anlagern eines DNA-Einzelstrangs über eine so genannte „Tripelhelixstruktur“. Die Bindung des TFOs (*Tripelhelix-Forming Oligonucleotide*) erfolgt in der großen Furche der DNA-Helix (siehe Abb. 3-24) und wird über so genannte Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Purinen des Duplex und den Basen des TFOs stabilisiert (Seidmann, 2003). Die Bindung des TFOs an die DNA ist so stabil, dass sie das Anlagern von DNA-bindenden Enzymen in der besetzten Region verhindert und sogar die Elongation eines RNA-Transkripts hemmen kann (Faria, 2000).



Abbildung 3-24: Schema einer Tripelhelix-Struktur

Ein Tripelhelix-formendes Oligonukleotid ist in der großen Furche der DNA über Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. Quelle: (Seidman, 2003)

In unserem Institut war bereits durch Frau Dr. Kristin Eisenschmidt ein optimiertes Protokoll zur Ausbildung einer Tripelhelix entwickelt worden (Daten zur Veröffentlichung eingereicht). Daher wurde zuerst die Tripelhelix als Hindernis auf der DNA verwendet.

3.5.2 Planung eines *mismatch*-Substrats mit einer TFO-Erkennungssequenz

Das Anlagern eines Tripelhelix-formendes Oligonukleotids (TFO) erfolgt sequenzspezifisch. Daher wurde über zielgerichtete Mutagenese, die benötigte Erkennungssequenz in die Plasmide pET15b-X80 und -H80 eingefügt (siehe Abb. 3-25). Zusätzlich zur TFO-Sequenz wurde die Erkennungssequenz für das Typ IIS Restriktionsenzym FokI eingefügt. Bei diesem Enzym besteht eine Trennung zwischen der Erkennungssequenz und der Spaltstelle, die 13 bp entfernt liegt. Die Erkennungssequenz von FokI war so ausgerichtet, dass die Spaltung durch das Enzym innerhalb des okkupierten DNA-Bereichs der Tripelhelix erfolgen musste. Daher war es später möglich durch Verdau mit FokI die Tripelhelix-Ausbildung zu kontrollieren. Das angelagerte TFO verhindert den Zugang zur Spaltstelle von FokI und schützt dadurch das DNA-Produkt vor der Spaltung in diesem Bereich. Zusätzlich konnte die eingeführte FokI-

Sequenz während der Mutagenese beim *screening* verwendet werden, um positive Klone zu identifizieren.

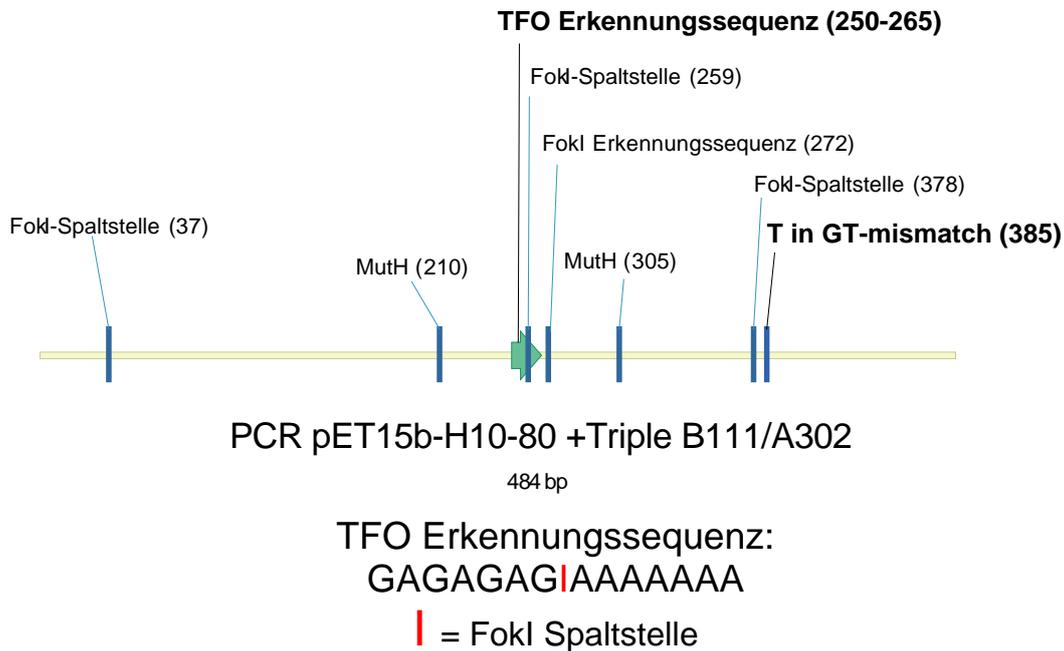


Abbildung 3-25: Schema des *mismatch*-Substrats XHm80tri

Die eingeführte TFO-Erkennungssequenz liegt genau zwischen den beiden von MutH zu spaltenden d(GATC)-Sequenzen. Die FokI-Erkennungssequenz befindet sich rechts davon und die Spaltstelle direkt in der Mitte der TFO-Sequenz. Quelle: Vector NTI 8.0.

3.5.3 Überprüfung der Stabilität der Tripelhelix-Bildung

Durch die eingeführte FokI-Schnittstelle, konnte die Stabilität der Tripelhelix-Ausbildung durch die vorhandene Protektion nachgewiesen werden. Bei erfolgter Tripelhelix-Ausbildung sollte keine Spaltung mehr in dem geschützten DNA-Bereich möglich sein.

Für den Versuch wurden zwei PCR-Produkte, eines mit (H80triple) und eines ohne TFO-Erkennungssequenz (H80), mit dem TFO über Nacht inkubiert um die Tripelhelix-Ausbildung zu ermöglichen. Beide so gebildeten Produkte wurden anschließend mit FokI verdaut und die auftretenden Produkte mit einem Polyacrylamid-Gel analysiert.

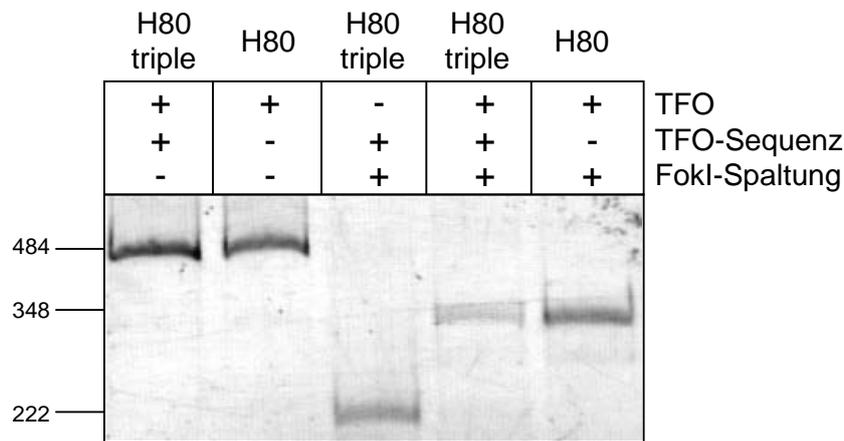


Abbildung 3-26: Nachweis einer Tripelhelix durch FokI-Protektion

Jeweils 100 ng DNA wurden mit 2 U FokI für 30 min bei 37 °C verdaut. Als Substrat wurde H80triple (mit TFO- und zusätzlicher FokI-Sequenz und als Negativ-Kontrolle H80 (ohne zusätzliche TFO- und FokI-Sequenz) in An- und Abwesenheit von TFO verwendet. Die Analyse erfolgte mit einem nativen 6 %iges PAA-Gel. Man erkennt, dass die durch TFO geschützte FokI-Spaltstelle auf dem H80triple-Substrat durch FokI nicht gespalten werden kann. Bei Abwesenheit des TFOs ist eine Spaltung jedoch möglich. Zu beachten ist, dass nur H80triple eine zweite FokI-Sequenz besitzt, die durch TFO geschützt werden kann (eingeführt mit der TFO-Bindungssequenz).

Die Spaltung mit FokI erzeugt beim PCR Produkt mit der TFO Erkennungs-Sequenz drei Produktbanden (die kleineren Produkte sind im Gelausschnitt nicht abgebildet), während bei dem PCR-Produkt ohne diese Sequenz nur zwei Produktbanden entstehen. Bei dem PCR-Produkt mit der TFO-Sequenz (H80triple) kommt es nur bei Anwesenheit von TFO zu einer Protektion und einem damit verbundenen größeren DNA-Fragment (bei 348 bp), während ohne TFO ein im Gel niedriger laufendes Produkt entsteht (bei 222 bp). Das Laufverhalten des geschützten Spaltprodukts ist vergleichbar mit dem Spaltergebnis des PCR-Produkts ohne TFO-Sequenz (H80). Das Resultat zeigt, dass es möglich ist eine Tripelhelix mit hoher Effizienz zu formen und dabei einen definierten DNA-Bereich vor Spaltung mit einem Restriktionsenzym zu schützen. Diese Tripelhelix ist für mindestens 30 min stabil, was sich durch die Inkubationszeit mit FokI schließen lässt.

Nun konnte der Einfluss einer Tripelhelix, die auf einem *mismatch*-Substrat gebildet wurde, auf die MutHLS Reaktion weiter untersucht werden.

3.5.3 MutHLS-Assay auf einem *mismatch*-Substrat mit angelagerter Tripelhelix

Das hemimethyliertes *mismatch*-Substrat XmH80triple wurde in mit dem TFO über Nacht inkubiert, damit es zur Ausbildung der Tripelhelix kam. Anschließend wurde das Substrat in

einem MutHLS Spaltversuch eingesetzt. Der Verlauf der Reaktion wurde mit einem Ansatz ohne Tripelhelix verglichen (siehe Abb 3-27).

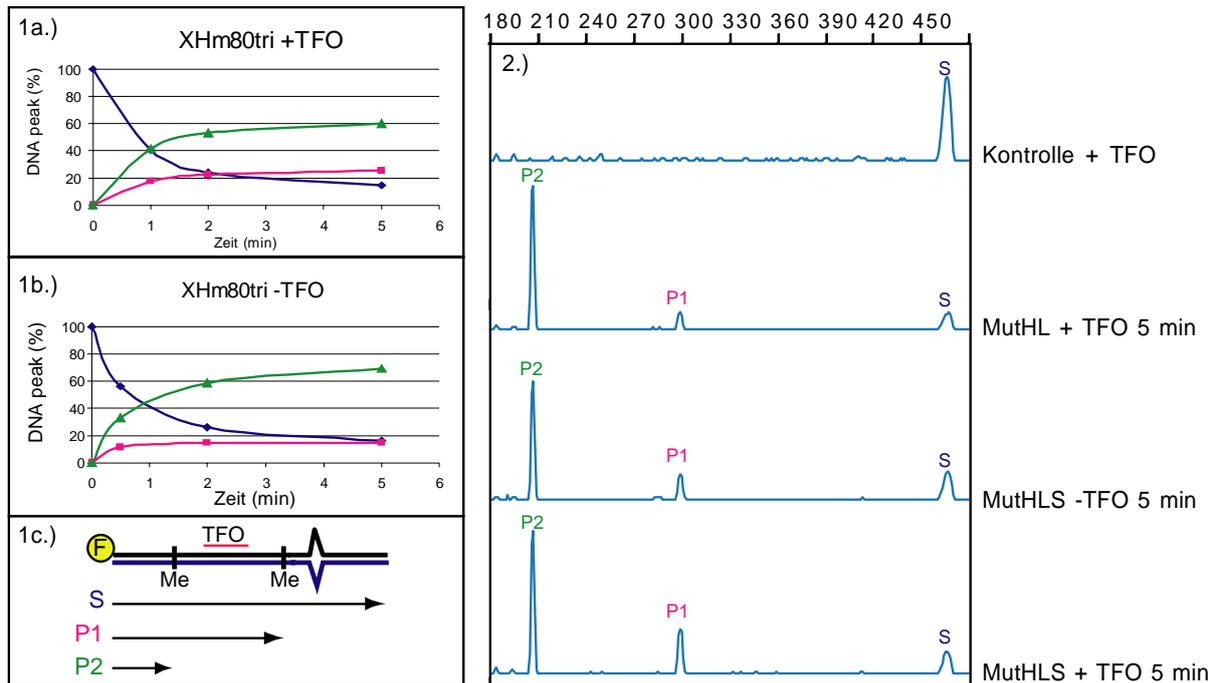


Abbildung 3-27: Vergleich der Spaltkinetik eines mismatch-Substrats mit und ohne Tripelhelix

5 nM mismatch-Substrat wurden mit 500 nM MutS in Gegenwart von 1 mM ATP vorinkubiert und die Spaltreaktion durch Zugabe von 500 nM MutL und 50 nM MutH gestartet. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C und nach 0,5, 1, 2 und 5 min wurde ein Aliquot entnommen und mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Zum Vergleich wurde das gleiche mismatch-Substrat ohne Tripelhelix unter identischen Bedingungen eingesetzt. (1a-c.): Verlauf der MutHLS-Kinetik mit und ohne TFO, und Schema der entstehenden Produkte. (2.): Elektropherogramm nach 5 min MutHLS +/- TFO. Als Kontrolle dienten ein enzymfreier Ansatz und ein MutHL-Ansatz ohne KCl. Es ist kein signifikanter Unterschied bei der Spaltung der beiden Substrate zu erkennen.

Bei einem vorhandenen sliding clamp-Mechanismus sollte die Blockade durch eine Tripelhelix eine Spaltung an der distalen MutH-Erkennungssequenz verhindern oder zumindest erschweren. Die Entstehung des kurzen Spaltprodukts (P2) sollte dadurch erheblich langsamer erfolgen als das längere, da dieses von einer Blockade durch die Tripelhelix unbeeinflusst sein sollte. Wie man aber an den Elektropherogrammen (Abb. 3-27 2.) sieht, ist keine besonders ausgeprägte Reduktion der Spaltung an dieser Stelle festzustellen. Die Kontrollreaktion der mismatch-unabhängigen MutHL-Reaktion zeigt wie zu erwarten, dass sich beide d(GATC)-Sequenzen in Gegenwart einer Tripelhelix spalten ließen. Die Peak-Verteilung entsprach der Spaltung eines endmarkierten Substrats mit zwei Spaltstellen, so wie es zu erwarten war. Der MutHLS-Ansatz ohne Tripelhelix-Blockade zeigt, wie gut sich das verwendete mismatch-Substrat in Gegenwart von MutS spalten lässt, was als Referenz für die

Reaktion mit dem Tripelhelix-Substrat dient. Überraschenderweise zeigt sich aber auch bei der MutHLS-Reaktion auf dem mit einer Tripelhelix besetzten *mismatch*-Substrat eine sehr gute Spaltung an der distalen d(GATC)-*Sequenz*, mit einer Effizienz, die mit der MutHLS-Reaktion ohne TFO-Blockade zu vergleichen war.

Bei Betrachtung der beiden Kinetiken, (vgl. Graph 3-27 1a mit 1b), erkennt man, dass beide relativ ähnlich verlaufen. Als einziger Unterschied fällt auf, dass der Produktpeak des langen Produkts in Gegenwart von TFO zunimmt, während der entsprechende Peak beim Ansatz ohne Blockade schon am Abnehmen ist. Diesen sehr geringen Unterschied könnte man als Inhibition der Prozessierung der distalen d(GATC)-*Sequenz* interpretieren und damit als Hinweis für eine blockierte *sliding clamp*. Aber da sich die Spaltung der beiden MutHLS-Reaktion nur um das 1,5-fache unterscheidet und auch weitere Messungen (Daten nicht gezeigt) zu einem vergleichbaren Resultat führten ist dieser nicht signifikante Unterschied wahrscheinlich eher durch kleinere Pippettierfehlern zustande gekommen.

Mit dem Ergebnis dieses Versuchs wird deutlich, dass eine Blockade der MutH-Aktivierung unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich ist. Daraus kann aber nicht automatisch gefolgert werden, dass ein *sliding clamp*-Mechanismus bei der Kopplung zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung auszuschließen ist. Folgende Möglichkeiten mussten zuerst ebenfalls überprüft und ausgeschlossen werden, bevor dieser Mechanismus falsifiziert werden konnte:

- 1.) Die Tripelhelixstruktur wird durch die hohen Salz- und Enzymkonzentrationen während der MutHLS-Reaktion aufgelöst.
- 2.) Die Tripelhelix selbst wird von MutS als Fehler erkannt und eine MutHLS Reaktion an beiden Seiten des TFOs eingeleitet.
- 3.) Auf dem Substrat ist zusätzlich zu dem G / T-*mismatch* ein weiterer Fehler vorhanden, der das MutS hinter der Tripelhelix aktiviert.
- 4.) Für MutS ist die dichte und starre Struktur der Tripelhelix kein echtes Hindernis, so dass es in der Lage ist, diesen Bereich zu „überspringen“.

Diese Möglichkeiten wurden durch die folgenden Versuche überprüft.

3.5.4 Stabilität der Tripelhelix während der MutHLS-Reaktion

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Tripelhelix unter den zuvor getesteten Pufferbedingungen sehr stabil ist und sich auch nicht durch die Wirkung des

Restriktionsenzym FokI von ihrer Bindungsstelle löste (Siehe Kapitel 5.3). Möglicherweise begünstigen aber die höheren Salz- und Enzymkonzentrationen während der MutHLS-Reaktion das Abdissoziieren des TFOs.

Um dies auszuschließen wurde durch einen FokI-Verdau die bestehende Protektion nach einer MutHLS-Reaktion überprüft.

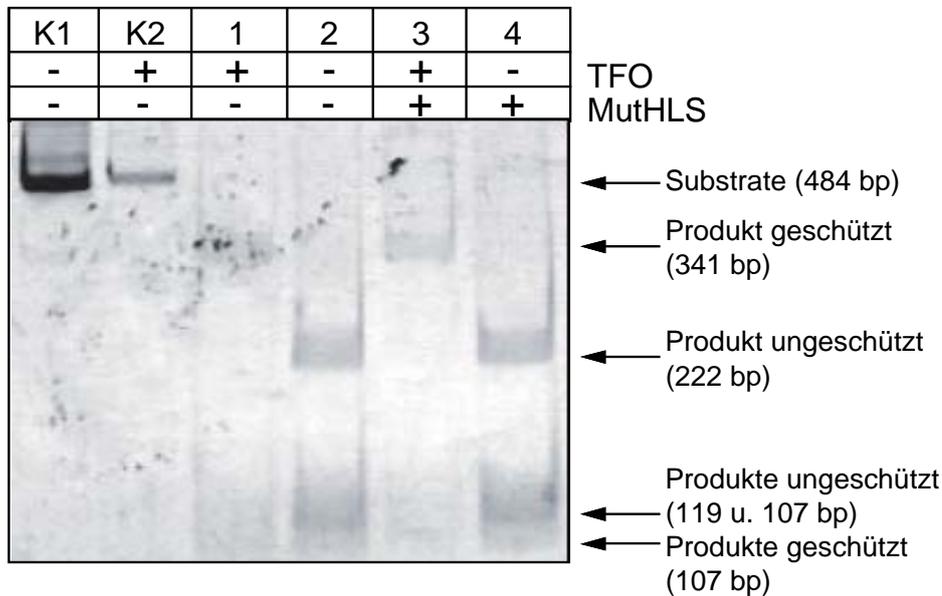


Abbildung 3-28: Stabilität der FokI-Protektion nach einer MutHLS-Reaktion.

Jeweils 100 ng DNA-Substrat wurde für 5 min mit MutHLS (50 nM MutH, 500 nM MutL und 500nM MutS) bei 37 °C reagiert und danach für weiter 15 min mit 2 U FokI verdaut (3 u. 4). Als Kontrolle dienten identische Ansätze ohne MutHLS (1 u. 2) sowie je ein ungespaltener Ansatz (K1 u. K2). Auch nach einer 20 minütigen MutHLS-Reaktion war kein Auflösen der Tripelhelix-Protektion zu erkennen.

Ein Ablösen der Tripelhelix, während der MutHLS-Reaktion ist nicht festzustellen. Ein Substrat mit einem zuvor angelagerten TFO, hat sowohl vor als auch nach der MutHLS-Reaktion eine für FokI nicht zugängliche Spaltstelle (Abb. 3-28 Spur 1 u. 3). Ohne eine blockierende Tripelhelix war eine FokI-Spaltung in diesem Bereich ohne weiteres möglich (Abb. 3-28 Spur 2 u. 4). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Tripelhelixstruktur, während der MutHLS-Reaktion stabil bleibt, was für die weiter führenden Experimente von großer Bedeutung ist.

3.5.5 Überprüfung des Substrats auf zusätzliche unspezifische *mismatches*

Bei dieser Untersuchung wurde das entsprechende *mismatch*-Substrat (XHm80tri+TFO) durch Verdau mit HinfI gespalten und damit der *mismatch*-enthaltende DNA-Bereich von den beiden d(GATC)-*Sequenzs* räumlich getrennt. Bei Anwesenheit eines weiteren *mismatches*

oder einer MutHLS-Induzierung durch die Tripelhelix, wäre trotzdem eine Spaltung an beiden d(GATC)-Sequenz zu erwarten gewesen.

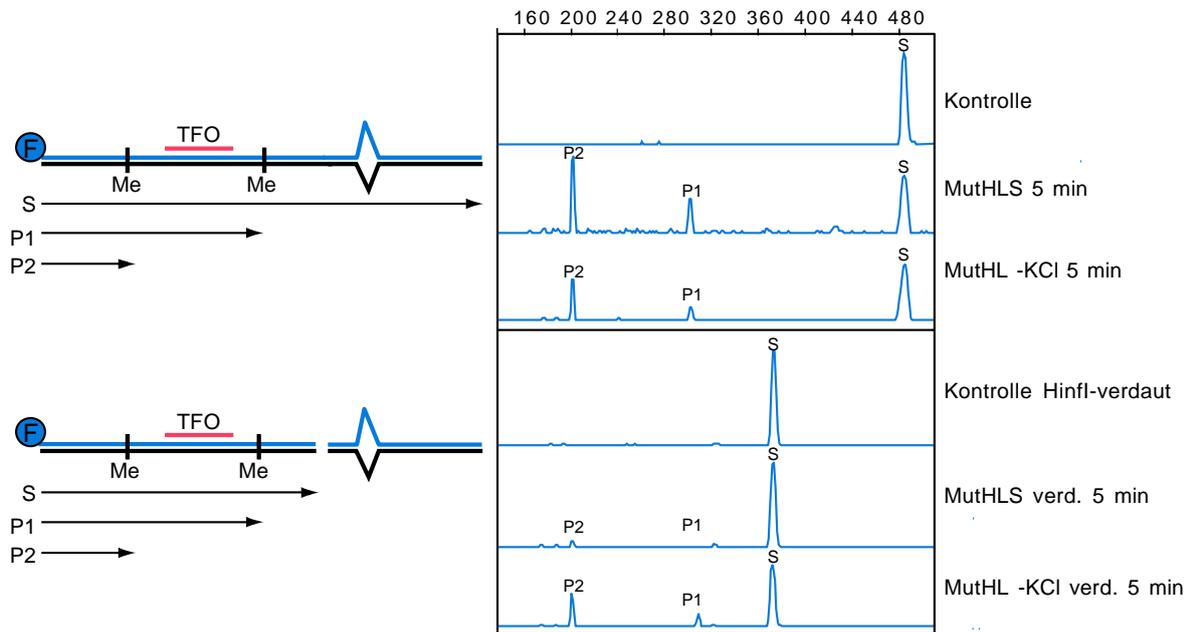


Abbildung 3-29: Überprüfung des *mismatch*-Substrats auf zusätzliche Basenfehlpaarungen

25 nM *mismatch*-Substrat (mit angelagerter Tripelhelix) wurden mit 5 U Hinfl für 30 min bei 37 °C vorinkubiert 5 nM davon wurden in einer MutHLS-Reaktion (500 nM MutS, 500 nM MutL und 50 nM MutH) verdaut. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C und nach 5 min wurde ein Aliquot entnommen und mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Zum Vergleich wurde das gleiche *mismatch*-Substrat ohne Hinfl-Verdau unter identischen Bedingungen verwendet. Als weitere Kontrolle dienen entsprechende Ansätze mit MutHL. S = 484 bp bzw. 359 bp (nach Hinfl-Verdau); P1 = Produkt 304 bp; P2 = 209 bp. Die Spaltung der beiden d(GATC)-Sequenzen in der MutHLS-Reaktion erfolgt hauptsächlich in Gegenwart eines *mismatch* auf dem gleichen Strang. Im Gegensatz dazu sind durch die *mismatch*-unabhängige MutHL-Reaktion beide Substrate gleich gut zu spalten.

Eine deutliche Aktivität auf dem Hinfl-gespaltenen Substrat konnte allerdings nicht beobachtet werden. Während beim langen Substrat bereits mehr als die Hälfte des Substrats gespalten war (an beiden Spaltstellen), konnte beim Hinfl-verdaulichem Substrat nur ein Produktpeak geringerer Intensität detektiert werden. Diese geringe Spaltaktivität war auf die schon zuvor beschriebenen *trans*-Aktivierungsfähigkeit von MutS und die *mismatch*-unabhängigen MutHL-Reaktion zurückzuführen, und hatte damit wenig mit einem induzierenden Effekt der Tripelhelix oder eines unspezifischen *mismatches* zu tun. Die parallel durchgeführten MutHL-Ansätze zeigten, dass Hinfl keinerlei störenden Einfluss auf die Spaltbarkeit des Substrats hatte (Abb. 3-29 vgl. MutHL mit MutHL verd.).

Um auszuschließen, dass das oben erzielte Ergebnis nicht auf Grund eines möglichen inhibitorischen Einflusses von Hinfl zustande gekommen war, wurde eine MutHLS-Reaktion

auf einem Homoduplex mit angelagertem TFO durchgeführt. Als Vergleich wurde eine identische Reaktion mit einem unmethylierten Heteroduplex durchgeführt (siehe Abb. 3-25).

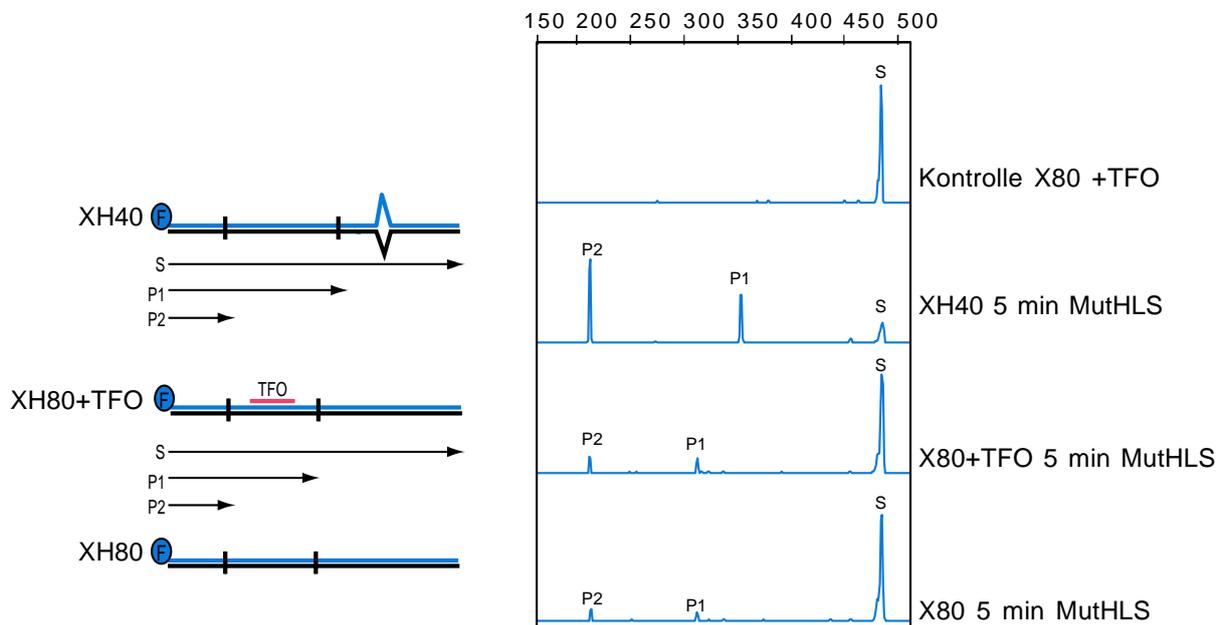


Abbildung 3-30: MutHLS-Reaktion auf Homoduplex mit Tripelhelix

5 nM Homoduplex mit und ohne zuvor ausgebildeten Tripelhelix wurden mit 500 nM MutS in Gegenwart von 1mM ATP inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 nM MutL und 50 nM MutH gestartet und erfolgte bei 37°C. Nach 5 min wurde ein Aliquot entnommen und mit TSR-Auftragspuffer abgestoppt. Als Aktivitätskontrolle der MutHLS-Reaktion wurde ein identischer Ansatz mit einem *mismatch*-Substrat durchgeführt (XH40). S = 484 bp; P1 = Produkt 304 bp bzw. 344 bp (bei XH40); P2 = 209 bp. Eine ausgebildete Tripelhelix wird von MutHLS nicht als *mismatch* erkannt und kann damit nicht die MutHLS-Reaktion einleiten.

Das verwendete *mismatch*-Substrat (XH40) wurde nach 5 min zu 90 % gespalten. Bei den beiden Homoduplices waren zu diesem Zeitpunkt erst etwa 10 % gespalten. Die Spaltung des Homoduplex mit Tripelhelix ist nur etwa 1,5-fach besser als die des Homoduplex ohne, was im Rahmen der experimentellen Genauigkeit liegt. Von einer Induktion der MutHLS-Reaktion durch die Tripelhelix ist daher nicht auszugehen. Der zuvor erzielte Befund, dass eine Tripelhelix nicht als Signal für das Auslösen der MutHLS-Reaktion dient, konnte hierdurch erneut bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine ausgebildete Tripelhelix kein Hindernis für eine Spaltung einer dahinter liegenden MutH-Erkennungsstelle ist. Die Stabilität der Tripelhelix ist über den Zeitrahmen einer MutHLS-Reaktion und darüber hinaus gegeben. Das angelagerte TFO wird vom MutHLS-System nicht als Fehler in der DNA erkannt und kann keine *mismatch*-induzierte Spaltung einleiten. Damit bleiben nur noch zwei Möglichkeiten als

Erklärung der erzielten Resultate übrig. Entweder ist eine Tripelhelix kein Hindernis für ein auf der DNA gleitendes MutS, oder die Kopplung zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung erfolgt nicht über einen *sliding clamp*-Mechanismus.

Durch die Verwendung einer dichteren Blockade wäre es zumindest möglich die erste Annahme auszuschließen.

3.5.6 Roadblock durch ein inaktives Restriktionsenzym

Eine andere Möglichkeit eine Blockade auf der DNA zu erzeugen, wurde durch die Verwendung des Restriktionsenzym SsoII versucht, welches eine wesentlich größeres Hindernis für ein auf der DNA gleitendes Enzym darstellt (Masse: ca. 38 kd). Dabei wurde die katalytisch-inaktive, aber immer noch DNA-bindende Mutante SsoII K184A verwendet ((Pingoud, 2003). Die Erkennungssequenz (NCCNGGN) auf dem *mismatch*-Substrat befand sich zwischen der ersten und zweiten d(GATC)-Sequenz.

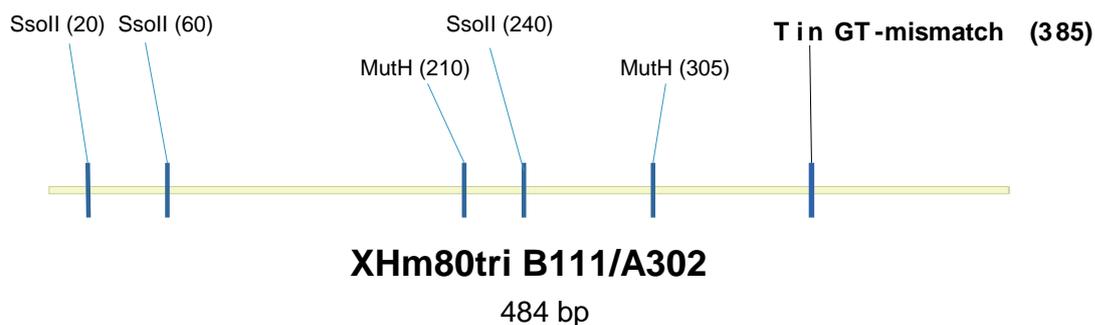


Abbildung 3-31: Schema des *mismatch*-Substrats XHm80tri

Die eingeführte SsoII-Erkennungssequenz liegt genau zwischen den beiden d(GATC)-Sequenzen. Quelle: Vector NTI 8.0

Eine Bindung von SsoII umfasst etwa 8 Basenpaare wobei die DNA dabei vom Enzym vollständig umklammert ist. Ein Passieren dieser Position durch ein DNA-gebundenes Enzym sollte dadurch unmöglich sein.

3.5.7 Bindungsaktivität von SsoII K182A

Die Bindung der SsoII-Mutante K182A an ihre Erkennungssequenz, wurde mittels Shift-Gel überprüft. Als Substrat wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Produkt verwendet. Das Enzym wurde mit der DNA bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf ein natives 6 %iges PAA-Gel aufgetragen (siehe Abb. 3-32).

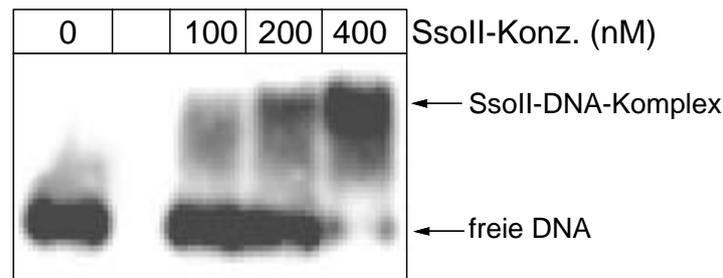


Abbildung 3-32: SsoII-DNA-shift

10 nM radioaktiv markiertes *mismatch*-Substrat (484 bp) wurde mit steigenden Konzentrationen SsoII K182A (0-400nM) bei RT für 20 min und unter den Standardpufferbedingungen der MutHLS-Reaktion inkubiert. Nach Auftrennung in einem nativen 6 %iges PAA-Gel erfolgte die Analyse mittels Instant Imager. Das *mismatch*-Substrat wird von SsoII gebunden und bei 400 nM Enzym-Konzentration fast vollständig in eine langsamer laufende Bande überführt.

Mit steigender Enzymkonzentration befand sich mehr DNA in einen langsamer wandernden Komplex. Bei 400 nM befand sich ein Großteil (>90%) der DNA in Bindung mit SsoII. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass unter den Pufferbedingungen der MutHLS-Reaktion die Bindung des Restriktionsenzym an die DNA erfolgt.

3.5.8 Einfluss der SsoII-Bindung auf die MutHLS-Reaktion

Nachdem die Bindungsfähigkeit von SsoII unter den Pufferbedingungen der MutHLS-Reaktion nachgewiesen worden war, erfolgte nun die Überprüfung, ob sich eine Blockade zwischen *mismatch* und d(GATC)-*Sequenz* etablieren lies.

Bei dem Versuch wurde zuerst ein *mismatch*-Substrat mit SsoII vorinkubiert um ein Ausbilden des Enzym-DNA-Komplexes zu ermöglichen. Im Anschluss wurde eine MutHLS-Reaktion mit dem Substrat durchgeführt und mittels Kapillarelektrophorese überprüft, ob eine Spaltinhibition der hinter der Blockade befindlichen d(GATC)-*Sequenz* zu beobachten war. Dabei konnte folgendes Ergebnis erzielt werden (siehe Abb. 3-33).

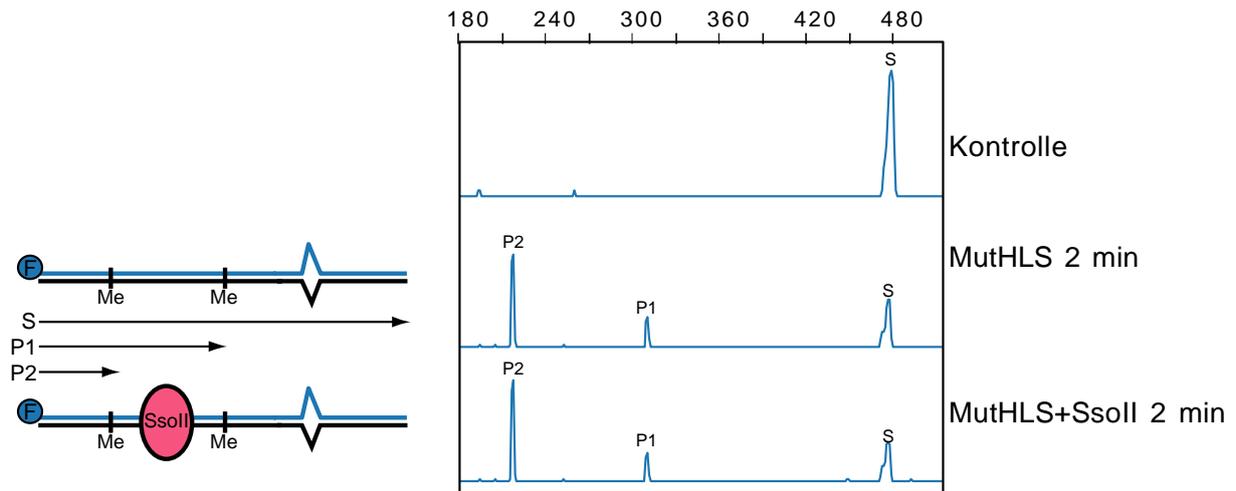


Abbildung 3-33: Blockade durch SsoII

10 nM *mismatch* Substrat wurden mit oder ohne 1 μ M SsoII K182A unter den Standardpufferbedingungen der MutHLS-Reaktion bei RT vorinkubiert. Nach 15 min wurde die MutHLS-Reaktion durch Zugabe von 500 nM MutS, 500 nM MutL und 50 nM MutH gestartet. Nach 2 min Inkubation bei 37°C wurde jeweils ein Aliquot entnommen und mit TSR-Puffer abgestoppt. Als Kontrolle wurde ein identischer Ansatz ohne SsoII durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. S = 484 bp; P1 = Produkt 304 bp; P2 = 209 bp. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Spaltung des *mismatch*-Substrats mit SsoII und ohne zu erkennen.

Die Spaltung war in beiden Ansätzen nahezu identisch. Bei beiden Ansätzen konnte die hinter dem Roadblock liegenden d(GATC)-*Sequenz* gespalten werden, was darauf hindeutet, dass SsoII kein Hindernis für die MutHLS-Reaktion ist.

Bewertet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den Resultaten der Tripelhelix-Experimente, ist es nur noch sehr schwer vorstellbar, dass die MutHLS-Reaktion über einen *sliding clamp*-Mechanismus erfolgen soll. Die Ergebnisse deuten eher auf einen *looping*-Mechanismus hin

4 Diskussion

4.1 Überblick über die postreplikative *mismatch*-Reparatur

Das postreplikative *mismatch*-Reparatur System ist für einen Organismus äußerst wichtig für die Erhaltung der genetischen Information. Obwohl die Hauptenzyme seit der *in vitro* Rekonstitution dieser Systeme (Modrich, 1987) schon relativ lange bekannt sind, konnten einige wichtige Aspekte immer noch nicht genau definiert werden. Eine wichtige Rolle während des gesamten Reparaturprozesses nimmt die Phase der Strangdiskriminierung ein, also die Unterscheidung des fehlerfreien DNA-Strangs vom neusynthetisierten und fehlertragenden Tochterstrang. Für das MutHLS-System von *E. coli* konnte dabei zumindest geklärt werden, welcher Mechanismus für das Setzen des Strangdiskriminierungssignals verantwortlich ist, nämlich die methylgerichtete Spaltung der DNA durch MutH. Aber für keinen Organismus konnte bisher eindeutig nachgewiesen werden, wie die Signalübertragung zwischen der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung erfolgen kann, die über eine Distanz von mehr als 1000 Basenpaaren funktioniert. Für diesen Mechanismus werden derzeit verschiedene Modelle sehr kontrovers diskutiert. So beschreibt die Gruppe von Modrich (Allen, 1997; Blackwell, 1998) einen so genannten Translokations-Mechanismus, bei dem MutS unter ATP-Hydrolyse die DNA durch das Enzym-Dimer hindurchfädelt und dadurch entfernt liegende DNA-Bereiche zusammenführt. Von der Gruppe von Fishel (Gradia, 1997; Acharya, 2003) wird dagegen ein so genannter *sliding clamp*-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem MutS die für die Strangdiskriminierung wichtige d(GATC) über lineare Diffusion erreicht. Die Gruppe von Hsieh (Schofield, 2001) veröffentlichte ein Modell bei dem MutS und MutL den *mismatch* durch Schleifenbildung der DNA mit benachbarten d(GATC)-Sequenzen zusammenbringt, das so genannte *looping*-Modell.

Auf Grund dieser zum Teil sehr unterschiedlichen Modellvorstellungen mit sich teilweise ausschließenden Beobachtungen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht den Aspekt der Strangdiskriminierung genauer zu untersuchen und dabei durch geeignete Experimente die in der Literatur publizierten Modelle zu überprüfen oder zu einem neuen Modell zusammenzufassen.

4.2 Vorteile eines definierten *mismatch*-Substrates

Einer der wichtigsten Parameter für eine genaue Untersuchung des Strangdiskriminierungs-Mechanismus ist die Verwendung eines geeigneten Substrats, das mit dem natürlichen vorkommenden Substrat vergleichbar ist. So lassen sich z.B. mit der Verwendung von kurzen Oligoduplices Ergebnisse erzielen, die hauptsächlich durch die Länge der DNA zu Stande kommen, was zu erheblichen Fehlinterpretationen führen kann. Die in dieser Arbeit dazu durchgeführten Versuche (siehe 3.2.3 und 3.2.5) zeigten eindeutig, dass bei Substraten mit sehr kurzem Abstand der d(GATC)-Sequenz zum DNA-Ende, die Spaltung eingeschränkt wird.

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur *mismatch*-Substrat-Generierung (siehe 5.5.1 und (Thomas, 2002)) ist es möglich Heteroduplices zu synthetisieren die deutlich länger sind als hybridisierte Oligoduplices, was gleichzeitig den „Randeffekt“ auf die Spaltaktivität minimiert. Da die Herstellung der Vorstufen dieses *mismatch*-Substrats über eine PCR verläuft, lassen sich in relativ kurzer Zeit große Mengen Substrat erzeugen. Die Synthese eines aufgereinigten und überprüften *mismatch*-Substrats dauert insgesamt, von der PCR, über den Verdau mit λ -Exonuklease, den verschiedenen Aufreinigungsschritten, der Überprüfung der *mismatch*-Qualität und der photometrischen Konzentrationsbestimmung einen Tag. Dabei verzichtet diese Methode auf aufwendige gelelektrophoretische oder säulenchromatographische Aufreinigungsschritte.

Durch die Verwendung fluorophormarkierter Primer bei der PCR können Substrate hergestellt werden, die an beiden Strängen unterschiedlich markiert sind. Dadurch erst ist es möglich mittels der Kapillarelektrophorese die Spaltung an verschiedenen Strängen gleichzeitig und in Konkurrenz zu verfolgen. Somit kann bei der Auswertung der Daten der Einfluss etwaiger Pipettierfehler oder anderer Varianzen während der Versuchsdurchführung minimiert werden und die Versuche erhalten immer eine interne Kontrolle.

Besonders eindrucksvoll lassen sich diese Vorteile der verwendeten Substrate an der Untersuchung verschiedener MutH-Varianten zeigen (siehe 3.1.2 und (Friedhoff, 2003)). Hier wurde die Substratspezifität verschiedener MutH-Mutanten an unterschiedlich methylierten Substraten getestet. Bei dieser Fragestellung ging es darum, die an der Strangdiskriminierung beteiligten Aminosäurereste zu identifizieren, welche für die Erkennung der methylierten Adenine verantwortlich sind. Durch den Vergleich der Kristallstruktur von MutH mit anderen Restriktionsenzymen und durch multiple Sequenzalignments, konnten verschiedene Aminosäurereste ausgemacht werden, die möglicherweise an der Strangdiskriminierung

beteiligt sind. Durch die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente wurde die Spaltpräferenz dieser Mutanten genauer charakterisiert.

Beim dabei verwendeten DNA-Substrat waren beide Stränge unterschiedlich fluorophormarkiert. Die von MutH erzeugte Spaltung an der DNA zeigte, dass beim Wildtyp eine Präferenz für hemimethylierte d(GATC)-Sequenzen besteht, was seiner biologischen Rolle entsprechend zu erwarten war. Ebenso wurden vom Wildtyp auch nichtmethylierte d(GATC)-Sequenzen gespalten. Die methylierten Stränge, die per Definition einem fehlerfreien Mutterstrang entsprechen, wurden von MutH dagegen nicht gespalten.

Bei der untersuchten MutH-Mutante (Y212S) war diese Methylierungs-Erkennung mehr oder weniger reduziert, was durch die Spaltung in beiden Strängen des hemimethylierten und vollständig methylierten Substrats deutlich zu erkennen war. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass das ausgetauschte Tyrosin 212 ein wichtiger, wenn nicht sogar der einzige Aminosäurerest ist, der den Methylierungsstatus der DNA erkennt. Dies war in dieser Qualität nur durch die Verwendung der *mismatch*-Substrate möglich.

Außer mit einer Fluorophor-Markierung konnten die *mismatch*-Substrate auch radioaktiv markiert werden. Dies wurde bei der Untersuchung von MutH-Varianten anderer mit *E. coli* verwandter Organismen durchgeführt (siehe 3.1.1 und (Friedhoff, 2002)). Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass die MutH-Enzyme der anderen Organismen mit MutSL interagieren und zu einer deutlichen Spaltung der *mismatch*-Substrate in der Lage sind. Dies war in Anbetracht der geringen Sequenzhomologie von 56-60 % nicht zu erwarten. Dadurch war es möglich zu schlussfolgern, dass die nicht konservierten Aminosäurenresten der drei untersuchten MutH-Enzyme, als mögliche Interaktionsstellen zwischen MutL und MutH eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Eingrenzung des Interaktionsinterface zwischen MutH und MutL war für nachfolgende Untersuchungen unserer Gruppe hilfreich (Toedt, 2003).

4.3 Verküpfung von MutS am *mismatch*

Photocrosslinking ist in der Biochemie eine weit verbreitete Technik zur Identifizierung von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionsstellen. Für letzteres wird unter anderem das modifizierte Nukleotid 5-Iododeoxyuridin (5-IdUrd) verwendet, welches als „zero-length“-Crosslinker die Aminosäuren eines Proteins nur bei sehr dichtem Kontakt bindet, was eine erhöhte Spezifität mit sich bringt. Der Erfolg dieser Methode hängt außer von der Nähe der Aminosäuren zum 5-IdUrd, auch von ihrer lokalen Geometrie und ihrer chemischen Struktur

ab. Nach Bestrahlung des 5-IdUrd mit langwelligem UV-Licht reagiert das photoaktivierte Pyrimidin bevorzugt mit den Aminosäuren Cystein, Serin, Methionin, Lysin, Arginin, Histidin, Phenylalanin, Thyrosin und Tryptophan (Chodosh, 1996).

Für die Untersuchung von MutS ist 5-IdUrd besonders gut geeignet, das es strukturell gesehen mit dem Thymin vergleichbar ist. Der Van-der-Waals-Radius des Iods ist hier nur etwa 8 % größer als die Methylgruppe des Thymins an der entsprechenden Position (Willis, 1993). Dadurch kann es als Equivalent eines A – T- bzw. G – T-Basenpaars eingesetzt werden. Beispiele für erfolgreiche Crosslink-Reaktionen mit MutS und 5-IdUrd wurden bereits publiziert (Malkov, 1997). In dieser Veröffentlichung wurde die für die *mismatch*-Erkennung essentielle Aminosäure PHE-39 von *Taq* MutS durch proteolytisches *fingerprinting* identifiziert. Vergleichbare Beispiele für eine Crosslink-Reaktion von MutS von *E. coli* wurden bisher allerdings noch nicht veröffentlicht.

Die Planung für die Versuchsreihe im Rahmen dieser Doktorarbeit sah vor, MutS über ein *crosslinking* an ein langes *mismatch*-Substrat zu binden, um dann die nachfolgende *downstream*-Reaktion mit MutL und MutH ablaufen zu lassen. Sollte es möglich sein eine Spaltung von MutH zu beobachten, wäre der direkte Nachweis über den Verbleib von MutS am *mismatch* während des Prozesses der Strangdiskriminierung erbracht.

Das für diesen Versuch benötigte *mismatch*-Substrat wurde durch eine Modifikation der bisher verwendeten Methode erzeugt (siehe 3.3.1). Dadurch wurde das Problem gelöst werden, das Oligo mit dem entahltenen 5-IdUrd in die Mitte des *mismatch*-Substrats einzubauen. Die Qualität des durch dieses Verfahren hergestellten Substrats wurde durch Bestimmung des Laufverhaltens in einem Polyacrylamid-Gel überprüft (siehe 3.3.2). Es zeigte sich, dass das *crosslink*-Substrat eine vergleichbare Wanderungsgeschwindigkeit hat, wie eine dsDNA gleicher Länge. Zusätzlich wurde das neue Substrat mit einem nach der ursprünglichen Methode hergestellten *mismatch*-Substrat in einem MutHLS-Spaltassay verglichen, wobei sich kein bedeutsamer Unterschied in der Spaltreaktion nachweisen lies (siehe 3.3.3). Das *crosslink*-Substrat wurde vom MutHLS-System also trotz des enthaltenen *nicks* wie ein reguläres *mismatch*-Substrat erkannt und prozessiert.

Im weiteren Verlauf wurde an der Optimierung der Reaktionsbedingung für die Bestrahlung gearbeitet. Hierfür wurde MutS mit einem 39 bp langem Heteroduplex eingesetzt, welches durch eine Hybridisierungsreaktion erzeugt worden war (siehe 3.3.5). Die Verwendung des Oligoduplex an Stelle des langen *mismatch*-Substrats, erbrachte für die Optimierungsversuche

den Vorteil einer einfacheren Erfolgskontrolle der erfolgten Quervernetzung zwischen Enzym und DNA. Mit dem langen Substrat wäre solch eine Kontrolle nur bei zusätzlicher Beteiligung von MutL und MutH möglich gewesen, was die Optimierungsversuche unnötig verkompliziert hätte. Da die Sequenz des Oligoduplex identisch war mit der den *mismatch* umgebenden Region des langen Substrats, sollte die physikalische Ausrichtung bei der Bindung von MutS zum *mismatch* vergleichbar sein. Die hier gefundenen Bestrahlungsparameter sollten im Anschluss dann mit dem langen *mismatch*-Substrat angewandt werden.

Leider gelang es trotz der guten Ausgangsbedingungen nicht mit dem Oligoduplex und MutS eine ausreichende *crosslink*-Ausbeute zu erzielen, die für weiterführende Experimente nötig gewesen wäre. Es zeigte sich vielmehr, dass MutS während des Bestrahlungsvorgangs teilweise photolytisch abgebaut wird, was durch eine reduzierte Proteinbande im Coomassie-Gel nachgewiesen werden konnte (siehe 3.3.6).

Eine leichte Verbesserung der *crosslink*-Ausbeute konnte durch die Verwendung von Oligoduplexen mit zusätzlichen 5-IdUrd erzielt werden (siehe 3.3.7). Allerdings ging dabei gleichzeitig die Spezifität zurück, da ein Homoduplex mit der gleichen Effizienz wie das *mismatch*-Substrat gebunden wurde (siehe 3.3.8). Dies könnte unter Umständen, damit zu erklären sein, dass MutS eine 5-IdUrd – T-Basenpaar trotz der strukturellen Ähnlichkeit als Basenfehlpaarung detektiert, aber beweisen lässt sich das nicht so einfach.

Diese unklaren Ergebnisse zur Spezifität mit der gleichzeitig geringen Ausbeute (max. 20 %) waren für das weitere Vorgehen äußerst problematisch. Berücksichtigt man weitere Verluste von MutS durch die nachfolgende MutHLS-Reaktion, würde es sehr schwer werden auswertbare und reproduzierbare Daten zu erzeugen. Daher wurde dieser Aspekt der MutHLS-Untersuchung eingestellt. Bestärkt wurde dieser Entschluss mit den Ergebnissen anderer Versuchsreihen (s.u.), die ein Verbleib von MutS am *mismatch* während der Strangdiskriminierung ausschlossen.

Diese Einschätzung, dass ein *photocrosslinking* von *E.coli* MutS alles andere als trivial ist, liefert auch gleichzeitig eine mögliche Erklärung warum bisher noch keine Publikationen mit erfolgreich durchgeführten Crosslink-Versuchen mit diesem Enzym veröffentlicht wurden, obwohl viele Gruppen damit arbeiten. Dies trifft genauso für die Gruppe von Peggy Hsieh zu, die den Taq-MutS-DNA-Crosslink veröffentlicht hatten (Malkov, 1997).

4.4 Untersuchungen zum *looping*-Modell

Ein möglicher Mechanismus, der die Interaktion zwischen der *mismatch*-Erkennung und der Strangdiskriminierung beschreibt ist das *looping*-Modell, wie es von der Gruppe von Hsieh befürwortet wird (Schofield, 2001). Dabei wird davon ausgegangen, dass MutS während der Strangdiskriminierung in der Nähe des *mismatch* verbleibt und die von MutH zu spaltende d(GATC)-Sequenz über ein Biegen der DNA in räumliche Nähe des MutS-MutL-Komplex gebracht wird (siehe Abb. 4-1).

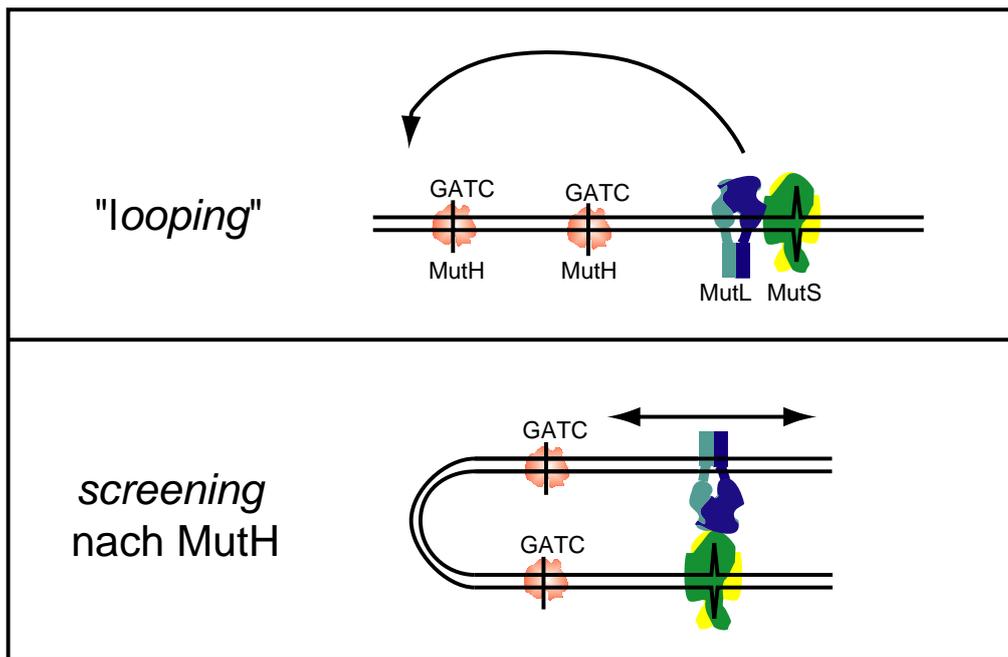


Abbildung 4-1: Schema des Looping-Modells

Ein am *mismatch* gebundener MutS-MutL-Komplex erreicht eine entfernt liegende d(GATC)-Sequenz mit MutH über ein Biegen der DNA. Die Suche von MutH bzw. GATC erfolgt dabei ungerichtet über lineare Diffusion.

Diesem Biegen der DNA sind physikalische Grenzen gesetzt, da die Struktur der Helix Knicke mit zu großen Winkelgrade verhindert (Strick, 2000). Diese Eigenschaft der DNA bietet aber auch gleichzeitig die Chance einer Überprüfung des *looping*-Modells. Der DNA-Bereich in der Nähe des *mismatch* ist bei diesem Mechanismus nur sehr schwer zugänglich für den MutS-MutL-Komplex (zumindest über eine Schleifen-Bildung). Das bedeutet, dass eine MutH-Erkennungssequenz in der Nähe des *mismatch* durch die sterische Hinderung schlechter erreicht wird als eine Erkennungssequenz, die weiter weg liegt und wo sich die DNA in größere Schleifen bewegen kann.

Für den Nachweis dieser Hypothese wurde eine Serie von *mismatch*-Substraten hergestellt, welche mit zwei d(GATC)-Sequenzen ausgestattet waren (siehe 3.4.1). Bei der Planung dieser

d(GATC)-Sequenzen wurde darauf geachtet, dass die flankierenden Basen ebenfalls gleich waren, um unterschiedliche Spalteffizienz durch MutH zu vermeiden. Die Position der distalen Sequenz, war immer 173 bp vom *mismatch* entfernt und die proximale d(GATC)-Sequenz in einem variablen Abstand von 80, 40, 20 oder 10 bp. Die d(GATC)-Sequenz mit 10 bp Abstand sollte dabei gleichzeitig den Nachweis liefern, ob sich MutS während der Strangdiskriminierung vom *mismatch* ablöst oder nicht. Eine Spaltung von MutH an dieser Stelle ist aus physikalischen Gründen nur dann möglich, wenn der *mismatch* frei von MutS ist, da MutS die d(GATC)-Sequenz während der Bindung der Fehlpaarung überlagert (Malkov, 1997).

Bei der Durchführung der MutHLS-Reaktionen mit diesen Substraten, zeigte sich eine signifikante Präferenz für die Spaltung der distalen d(GATC)-Sequenz (siehe 3.4.2). Es war deutlich zu erkennen, dass die proximale Spaltstelle bei kürzerem Abstand zum *mismatch*, immer schlechter gespalten wurde, im Vergleich zur Spaltung der distalen d(GATC)-Sequenz. Eine Aktivierung von MutH an der distalen Spaltstelle erfolgte mit einer größeren Wahrscheinlichkeit, was die These von einem *looping*-Mechanismus unterstützt. Erstaunlicherweise wurde aber auch die d(GATC)-Sequenz mit dem geringen Abstand von 10 bp deutlich gespalten, was wie bereits beschrieben unwahrscheinlich sein sollte, wenn MutS den *mismatch* gebunden hält. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung, wäre eine Transaktivierung von einem anderen DNA-Molekül aus, was im *looping*-Modell ebenfalls möglich ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Hsieh bereits beschrieben und gilt als Hauptargument für ihre Modellvorstellung (Junop, 2001). Die Aktivierung von MutH erfolgt dabei von einem MutSL-Komplex aus, welcher sich auf einem anderen DNA-Molekül befindet, also in *trans*.

Um den Aspekt der Transaktivierung genauer zu untersuchen, wurde eine MutHLS-Reaktion mit einem *mismatch*-Substrat in Konkurrenz mit einer äquivalenten Menge Homoduplex durchgeführt (siehe 3.2.4). Falls eine Transaktivierung tatsächlich stattfände, müsste der Homoduplex in vergleichbarer Weise wie der Heteroduplex gespalten werden. Überraschenderweise erfolgte die Spaltung aber hauptsächlich auf dem Heteroduplex. Eine Spaltung am Homoduplex war dagegen kaum zu erkennen. Eine Spaltung durch einen Transaktivierungs-Mechanismus wäre theoretisch auf beiden Substrate gleich gut zu beobachten gewesen. Die marginale Spaltung des Homoduplex, die man tatsächlich messen konnte, war auf keinen Fall vergleichbar mit dem Resultat der 10 bp entfernten d(GATC)-Sequenz in den Versuchen zuvor. Hier war die Spaltung deutlich besser.

Eine genauere Betrachtung der gewählten Versuchsbedingung von Junop et al. zeigte eine mögliche Fehlerquelle auf. Zu Beginn meiner Arbeit am MutHLS-System wurden für die Ermittlung der optimalen Versuchsparameter der MutHLS-Reaktion verschiedene Pufferbedingungen getestet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die KCl-Konzentration einen wesentlichen Einfluss auf die Spezifität der Strangdiskriminierung hat. Neben der *mismatch*-abhängigen von MutS initiierten Spaltreaktion, findet gleichzeitig auch eine unspezifische MutHL-Reaktion statt, die ebenfalls zur Spaltung von d(GATC) führt.

Diese MutHL-Reaktion findet bevorzugt bei niedrigen KCl-Konzentrationen statt und ihre Spaltaktivität vermindert sich mit steigenden Salzkonzentrationen (siehe 3.2.1 und 3.2.2).

So zeigte sich, dass die Spezifität der Spaltreaktion bei 50 mM KCl 11-fach höher ist und bei 100 mM 26-fach höher ist als bei 0 mM KCl. Diese erhaltenen Werte stehen im Einklang mit den von Modrich veröffentlichten Daten (Au, 1992), die eine Spezifität von 9,3 bei der KCl-Konzentration von 30 mM beschreiben, was genau zu den hier ermittelten Daten passt.

Daher sollten Untersuchungen der MutHLS-Reaktion unter hohen (>125 mM) KCl-Konzentrationen erfolgen, um diese Nebenreaktion von MutHL weitestgehend auszuschalten, was in dieser Arbeit auch getan wurde.

Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kam die Gruppe von Fishel (Acharya, 2003), die darauf hinwies, dass das Optimum der Salzkonzentration für das MutHLS-System zwischen 100 und 160 mM liegt, welches gleichzeitig den physiologischen Salzbedingungen der Zellen entspricht. Gleichzeitig wiesen sie ebenfalls darauf hin, dass das MutHLS-System bei Salzkonzentrationen unter 50 und über 250 mM nicht mehr zwischen einem Homo- oder Heteroduplex unterscheidet. In einer früheren Publikation konnte bereits gezeigt werden, dass MutL bei hohen Salzkonzentrationen eine reduzierte DNA-Bindung aufweist (Hall, 2001). Dies wäre biologisch gesehen eine sinnvolle Eigenschaft des Enzyms, da es für eine Zelle energetisch günstiger ist, die *mismatch*-unabhängige Reaktion zu unterdrücken um überflüssige und energieaufwendige Reparaturprozesse zu vermeiden. Gleichzeitig erhöht jeder zusätzliche Reparaturprozess die Wahrscheinlichkeit weitere Mutationen hervorzurufen.

Ein weiterer wichtiger Parameter, den man berücksichtigen muss, wenn man eine mögliche Transaktivierung untersucht, ist der Einfluss der DNA-Enden auf die Spaltreaktion von MutHLS. Die Gruppe von Modrich veröffentlichte schon 1996 in PNAS, dass der Abstand einer d(GATC)-Sequenz zum Ende hin einen signifikanten Einfluss auf die Spaltung an dieser Stelle hat (Smith, 1996). Zu dem gleichem Schluss kam 2001 auch die Gruppe von Krontiris (Beaulieu, 2001). In beiden Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Spaltreaktion von MutHLS zum DNA-Ende abnimmt.

Eigene Versuche zu dieser Problematik zeigten, dass diese Abstandsabhängigkeit zum DNA-Ende tatsächlich einen großen Einfluss auf die Spaltung der d(GATC)-Sequenz hat, die mit Verkleinerung der Distanz zum Rand immer ineffektiver erfolgt (siehe 3.2.3). Zusätzlich sind die Auswirkungen auf die *mismatch*-spezifische MutHLS-Reaktion wesentlich größer als für die unspezifische MutHL-Reaktion (siehe 3.2.5).

Dies kann bei der Verwendung von kurzen *mismatch*-Substraten und zu niedrigen KCl-Konzentrationen zu Fehlinterpretationen führen, da die Unterschiede zwischen *mismatch*-abhängiger und unabhängiger Spaltreaktion kleiner werden. In den Veröffentlichungen von Hsieh (Schofield, 2001; Junop, 2001) wurde dieser Randeffekt bei der Interpretation der erzielten Resultate nicht mit einbezogen.

Fasst man diese Resultate zusammen kommt es zu folgendem Problem:

Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass eine Transaktivierung unter den gewählten Salzbedingungen nur im sehr geringen Maße stattfindet. Ebenfalls von untergeordneter Rolle ist die unspezifische MutHL-Reaktion, die bei den verwendeten optimalen Salzbedingungen nahezu vollständig unterdrückt wird. Diese beiden parallel verlaufenden Reaktionen führen zu einer Spaltung in der Größenordnung vergleichbar mit der Spaltung des Homoduplex, wie es im Konkurrenzexperiment beobachtet werden konnte. Dagegen zeigen die Versuche zur Abstandsabhängigkeit eine deutlich bessere Spaltung an der 10 bp entfernten d(GATC)-Sequenz, die somit nicht durch eine Transaktivierung oder durch die unspezifische MutHL-Reaktion zustande gekommen ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Auslöser für die Spaltung an dieser Position sich auf dem gleichen DNA-Molekül befindet.

Dies wiederum ist nur möglich, wenn der *mismatch* von MutS nach der Aktivierung verlassen wird. Die Signalübermittlung an die nun freierwerdende d(GATC)-Sequenz erfolgt erst dann, da MutH diese Sequenz erst noch erkennen muss. Die eigentliche Aktivierung von MutH kann dann durch MutSL wieder durch eine Schleifenbildung erfolgen (*looping*) oder durch das Zurückgleiten des MutSL-Komplexes (*sliding clamp*). Unklar bleibt allerdings wieso ein mögliches *looping* hauptsächlich die Spaltung in *cis* begünstigen soll. Möglicherweise ist dies mit der Verteilung der Substrate in der Lösung zu erklären. Für eine Interaktion zwischen *mismatch*-Region und d(GATC)-Sequenz besteht für eine *cis*-Reaktion immer eine höhere Wahrscheinlichkeit als für eine *trans*-Reaktion, da die Proximität in *cis* durchschnittlich kleiner ist.

4.5 Ausschluss des *sliding clamp*-Modell

Ein alternatives Modell, der so genannte „*sliding clamp*“-Mechanismus, geht von einer linearen Bewegung der Enzyme aus, wie es von der Gruppe von Fishel befürwortet wird (Acharya, 2003). Ausgehend vom *mismatch* als Start-Position bewegt sich ein aktivierter MutSL-Komplex mittels linearer Diffusion auf dem DNA-Strang bis zum Erreichen einer d(GATC)-Sequenz, um dann mit MutH die DNA an dieser Stelle zu spalten.

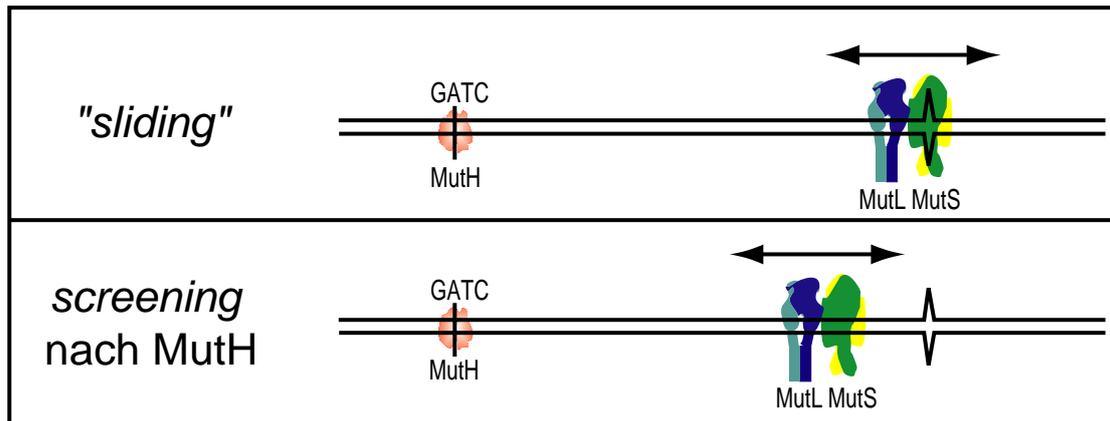


Abbildung 4-2: Schema des *sliding*-Modells

Ein am *mismatch* gebildeter MutS-MutL-Komplex gleitet mittels linearer Diffusion entlang der DNA und erreicht eine entfernt liegende d(GATC)-Sequenz mit MutH.

Die Reihenfolge der Enzyme MutS und MutL an der Einschnittstelle liefern gleichzeitig eine Richtungsinformation für die nach der Strangdiskriminierung rekrutierten Helikase und Exonuklease. MutL übernimmt die Rekrutierung dieser Enzyme, während die Position von MutS die Richtung der Basenfehlpaarung anzeigt. Dieser Mechanismus wird von den Befürwortern dieses Modells verwendet, um die Beobachtung der gerichteten Exonuklease-Aktivität zu erklären, die immer nur den Bereich zwischen d(GATC)-Sequenz und *mismatch* erfasst (Acharya, 2003).

Für die Überprüfung dieser Modell-Vorstellung wurde in dieser Arbeit der folgende Ansatz gewählt. Durch die Erzeugung einer physikalischen Barriere auf dem DNA-Strang, wurde ein *mismatch* von einer d(GATC)-Sequenz getrennt. Eine Interaktion mit dieser MutH-Spaltstelle sollte für einen gleitenden MutSL-Komplex durch die Barriere blockiert sein. Gleichzeitig stellt solch eine Barriere für einen *looping*-Mechanismus kein echtes Hindernis dar. Zur Etablierung dieser Blockade wurde zum einen eine Tripelhelix-Struktur verwendet. Diese ungewöhnliche DNA-Struktur verhindert die Weiterbewegung von eng an die DNA gebundenen Enzymen wie z.B. die RNA-Polymerase (Faria, 2000) und möglicherweise auch

einer hypothetischen *sliding clamp* bestehend aus MutSL. Eine eigene Überprüfung der Stabilität dieser Tripelhelix mittels Protektionsassay ergab, dass der besetzte DNA Bereich von Restriktionsenzymen nicht mehr geschnitten werden kann (siehe 3.5.3). Ebenso war ein Entfernen der Tripelhelix durch eine erfolgte MutHLS-Reaktion nicht zu erreichen (siehe Abb. 3.5.4). Die Protektion des belegten DNA-Abschnitts vor einer Spaltung durch FokI, war auch nach der MutHLS-Reaktion gegeben. Die Tripelhelix kann daher als äußerst stabile Struktur angesehen werden.

Die anschließenden Versuche zum Nachweis einer *sliding clamp*-Blockade zeigten allerdings, dass es nicht möglich war die MutHLS-bedingte Spaltung einer d(GATC)-Sequenz durch eine Tripelhelix zu hemmen (siehe 3.5.3). Das Spaltmuster des *mismatch*-Substrats mit Triplehelix unterschied sich nur minimal vom Substrat des Kontrollansatzes. Eine Spaltinhibition der hinter der Blockade liegenden d(GATC)-Sequenz war nicht auszumachen.

Bei der anschließenden Fehleranalyse wurde untersucht, ob die Tripelhelixstruktur als Startpunkt der MutHLS-Reaktion dienen kann, was zu dem gleichen Resultat geführt hätte. Bei dem dazu durchgeführten Versuch wurde die MutHLS-Spaltung eines Homoduplex mit der eines Homoduplex mit gebildeter Tripelhelixstruktur verglichen (siehe 3.5.5). Das Ergebnis zeigte eindeutig, dass ein Homoduplex mit einer Tripelhelixstruktur, keine Spaltung durch die MutHLS-Reaktion erfährt wie durch ein echtes *mismatch*-Substrat. Die Spaltmuster der Homoduplexe mit und ohne Tripelhelix waren nahezu identisch und bei beiden Substraten sehr schwach ausgeprägt. Eine Induktion der MutHLS-Reaktion durch die Tripelhelixstruktur kann somit ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde überprüft, ob auf dem verwendeten *mismatch*-Substrat weitere unspezifische Basenfehlpaarungen vorhanden waren. Dazu wurde der den *mismatch* tragende DNA-Abschnitt durch einen Restriktionsverdau abgetrennt und eine MutHLS-Reaktion durchgeführt (siehe 3.5.5). Auch hier zeigte sich, dass im Vergleich zu einem echten *mismatch*-Substrat keine signifikante Spaltung mehr zu erkennen war.

Ein parallel dazu durchgeführter Blockade-Ansatz mittels eines inaktiven Restriktionsenzym führte zu vergleichbaren Resultaten (siehe 3.5.8). Auch hier war es nicht möglich die hinter der Barriere liegende d(GATC)-Sequenz vor einer MutHLS-Spaltung zu schützen, obwohl das verwendete Restriktionsenzym SsoII einen räumlich größeren Bereich der DNA umschlossen hielt als es durch die Verwendung der Tripelhelix möglich war. Das Spaltmuster des blockierten Substrats war nahezu identisch mit dem des unblockierten *mismatch*-Substrats. Eine zuvor durchgeführte Kontrolle, hatte gezeigt, dass das *mismatch*-Substrat

unter der verwendeten Puffer- und Enzymkonzentration nahezu vollständig von SsoII gebunden ist (siehe Abb. 3.5.7). Ein Ablösen von SsoII während der MutHLS-Reaktion konnte auf Grund der hohen Bindungskonstante des Restriktionsenzym (Pingoud, 2002) ebenfalls ausgeschlossen werden. Aber selbst wenn es zu einer Dissoziation des Enzyms während der MutHLS-Reaktion gekommen wäre, hätte man zumindest eine Inhibition der MutHLS-Reaktion beobachten können, was aber nicht der Fall war.

Fasst man alle Resultate dieser Blockade-Experimente zusammen, scheint es nicht plausibel, dass die MutHLS-Reaktion über einen *sliding clamp*-Mechanismus erfolgt. Ein solcher Mechanismus wäre auf jeden Fall durch eine der beiden Barrieren (Tripelhelix bzw. SsoII) beeinflusst worden, was aber nicht zu Beobachten war. Die einzige Möglichkeit für einen Enzym-Komplex MutSL auf die andere Seite der Blockade einzuwirken ist durch den Raum reichend, also so wie es beim *looping*-Modell beschrieben wird. Zu dem gleichen Schluss kamen Wang und Hays bei ihrer Untersuchung des eukaryonten *mismatch*-Reparatursystems (Wang, 2004). Sie trennten ebenfalls den *mismatch* von der Exzissionsstelle durch die Anbringung einer Biotin-Streptavidin-Blockade, was die Bewegung einen gleitenden MutSL-Komplex verhindert. Trotzdem konnten sie eine *mismatch*-abhängige Exonukleaseaktivität messen, was nur möglich ist durch eine Überbrückung der Barriere über ein *looping*. Dies deckt sich auch mit den zuvor ermittelten Resultaten der Abstandabhängigkeit (siehe 3.4.2). Bei einem *sliding clamp*-Mechanismus wären die proximalen d(GATC)-Sequenzen schneller gespalten worden als die distalen. Beim *looping* ist es genau umgekehrt und so war es auch zu beobachten.

4.6 Formulierung eines neues Modell

Fasst man die in dieser Arbeit ermittelten Daten zusammen, kann das folgende Modell für einen möglichen Mechanismus der Interaktion zwischen *mismatch*-Erkennung und Strangdiskriminierung formuliert werden (siehe Abb. 4-3).

Der *mismatch* wird anders als bisher angenommen von MutS nach der Aktivierung verlassen. Der Kontakt zur DNA bleibt nach dem Lösen vom *mismatch* aber weiter erhalten. Unklar ist, ob dies nur unter Komplex-Bildung mit MutL geschieht oder MutS auch alleine vom *mismatch* gleiten kann und später mit MutL interagiert. Nach Verlassen der Basenfehlpaarung wird der Kontakt mit weit entfernt liegenden DNA-Bereichen hergestellt. Der DNA-Bereich mit der d(GATC)-Sequenz wird dabei durch den Raum erfasst. Mögliche Barrieren auf der

DNA werden so umgangen. Nicht bekannt ist, ob MutH schon auf der DNA gebunden ist oder erst durch MutSL rekrutiert werden muss. Die Aktivierung von MutH führt zur Spaltung der d(GATC)-Sequenz. MutS und MutL rekrutieren im Anschluss die für die Entfernung des fehlerhaften Stranges wichtigen Helikasen und Exonukleasen

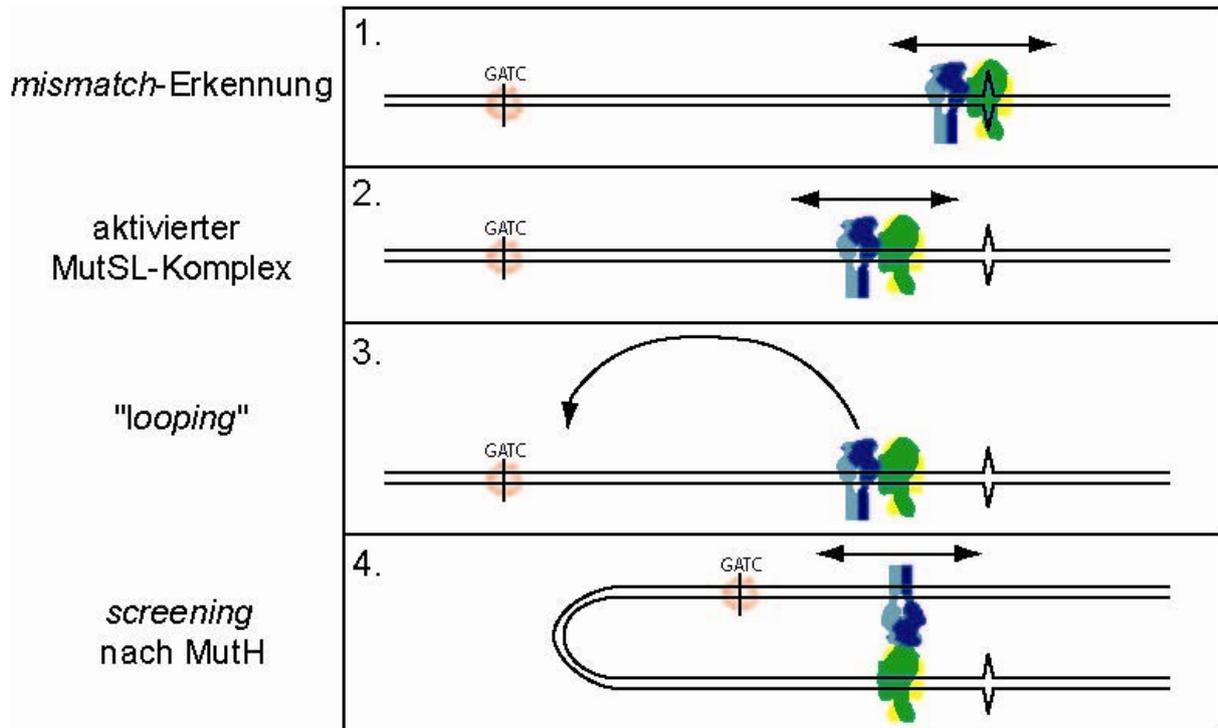


Abbildung 4-3: Schema des neuen Modells

Ein am *mismatch* aktivierter MutS-MutL-Komplex bewegt sich durch lineare Diffusion auf der DNA. Durch Schleifenbildung der DNA wird ein größerer DNA-Bereich überbrückt und dabei nach MutH an einer d(GATC)-Sequenz gesucht.

Eine Frage die sich dadurch zwangsläufig ergibt ist, wie die zielgerichtete Rekrutierung der Exonukleasen erfolgt, die den angespaltenen DNA-Strang hauptsächlich in Richtung des *mismatch* entfernen. Eine Richtungsinformation kann durch MutL nicht übermittelt werden, da MutH sowohl von 3' als auch von 5' aus kontaktiert werden kann und daher auch unterschiedliche Exonukleasen (siehe 1.3.4) an diese Exzisionstelle herangeführt werden. Diese Frage lässt sich mit dem hier vorgestellten Modell nicht erklären und bedarf weiterer Untersuchungen.

Vorstellbar wäre ein Experiment, bei dem der *mismatch* dicht am DNA-Ende liegt. MutS dissoziiert normalerweise von der DNA bei Erreichen der DNA-Enden (Acharya, 2003). D.h. ein solches Substrat würde die Bewegung eines auf der DNA bewegenden MutSL-Komplex in 50 % der Fälle unterbrechen, was Auswirkungen auf die Spaltgeschwindigkeit der

d(GATC)-Sequenz haben müsste. Bezogen auf die 10 bp entfernte d(GATC)-Sequenz, müsste die Spaltung fast vollständig inhibiert werden.

Eine andere Fragestellung die bei meinem oben beschriebenen Mechanismus aufkommt, ist wie vermieden werden kann, dass ein DNA-Strang ohne Basenfehlpaarung gleichfalls gespalten wird. Durch ein *looping* kann die d(GATC)-Sequenz eines Homoduplex nicht von der eines Heteroduplex unterschieden werden. Wie meine Versuche dazu gezeigt haben, ist die Wahrscheinlichkeit für die Spaltung einer d(GATC)-Sequenz in *cis* wesentlich höher als in *trans*, da die Distanz in *cis* durchschnittlich kleiner ist. Eine Transaktivierung ist zwar möglich, findet aber deutlich seltener statt, so dass sie keine große Relevanz besitzt. Auf die *in vivo*-Situation übertragen, dürfte dieses Problem auch hier nur eine untergeordnete Rolle spielen, da an einer Replikationsgabel die Proximität zur d(GATC)-Sequenz des benachbarten DNA-Strangs niedriger ist als zur Spaltstelle des *mismatch*-tragenden Stranges.

Zusätzlich ist die Original-DNA hiervon nicht betroffen, weil ihre d(GATC)-Sequenzen bereits methyliert vorliegen. Dadurch ist sie vor einer Markierung durch MutH geschützt. Falls doch eine Spaltung des zweiten fehlerfreien Tochterstrangs erfolgen sollte, verursacht dies keine weiteren Komplikationen, wenn man von dem überflüssigen Energieaufwand absieht. Das Auffüllen der dadurch entstandenen Lücke erzeugt im Allgemeinen keine neuen Basenfehlpaarungen. Eine solche Investition ist für einen Organismus tolerierbar, weil der Vorteil einer um den Faktor 10^3 reduzierten Mutationsrate durch das MMR-System (Kunkel, 2000), die Nachteile der leicht erhöhten Mutationsrate durch „überflüssige“ Reparaturprozesse und der dadurch bedingte höhere Energieaufwand aufwiegt.

5 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden nur die für diese Arbeit typischen Methoden detailliert beschrieben. Gängige Standardverfahren wurden, sofern dies nicht anders vermerkt ist, nach den Ausführungen der Laborhandbücher *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel., 1987-2003) durchgeführt.

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien haben den Reinheitsgrad *pro analysi* und stammen überwiegend von der Firma Gibco BRL, Life Technologies (Eggenstein). Nachstehend aufgeführte Chemikalien wurden dagegen von anderen Firmen bezogen:

Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt, welches über ein Seralpur PRO 90CN-Reinstwassersystem (Seral, Ransbach-Baumbach) gewonnen wurde.

Tabelle 5-1: Übersicht ausgesuchter Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie	Lieferant
BSA	Pierce, Rockfort USA
Coomassie brilliant blue R250	Serva, Heidelberg
DTT	Applichem, Heidelberg
EDTA	Roche, Mannheim
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN, Hilden
Oligodesoxyribonukleotide	Thermo Hybaid, Ulm
TSR	ABImed, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt

Auf weitere Bezugsquellen wird an entsprechender Stelle im Text verwiesen.

5.1.2 Radiochemikalien

$[\alpha\text{- und } \gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ wurden von der Firma Amersham Life Science bezogen. Die spezifische Aktivität am Kalibrierungsdatum betrug $3000 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$, die Konzentration der Stammlösungen $3 \mu\text{M}$.

5.1.3 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Restriktionsendonukleasen	Schnittstelle	Firma
<i>DpnII</i>	^GATC CTAG^	NEB, Frankfurt
<i>XhoI</i>	C^TCGAG GAGCT^C	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>DpnI</i>	G ^m A^TC CT^AG ^m	NEB, Frankfurt
<i>NcoI</i>	C^CATGG GGTAC^C	NEB, Frankfurt
<i>Hinfl</i>	G^ANTC CTNA^G	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>HindIII</i>	A^AGCTT TTCGA^A	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>FokI</i>	GGATGNNNNNNNNN^NNNN CCTACNNNNNNNNNNNNN^	NEB, Frankfurt
<i>BamHI</i>	G^GATCC CCTAG^G	NEB, Frankfurt

Tabelle 5-2: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Die jeweilige Schnittposition ist mit einem “^” gekennzeichnet, methylierte Basen mit einem “^m”.

Andere DNA-modifizierende Enzyme	Firma
Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
λ-Exonuklease	NEB, Frankfurt
Exonuklease I	NEB, Frankfurt
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -Polymerase	Promega, Mannheim

Tabelle 5-3: Verwendete DNA-modifizierende Enzyme

5.1.4 Sonstige Enzyme

Für die Erzeugung der *His*₆-Fusionsproteine MutH, MutL und MutS wurden in dieser Arbeit Expressionsplasmide verwendet, die uns freundlicherweise von Dr. M. E. Winkler (University of Texas Medical School, Houston, Texas) überlassen worden waren.

Die benutzte *dam*-Methyltransferase wurde freundlicherweise von Frau Kirsten Liebert zur Verfügung gestellt. Das Enzym war aufgereinigt und in Glycerinpuffer bei -20 °C aufbewahrt worden. Es hatte eine Konzentration von 71,5 µM.

Die katalytisch inaktive Endoniklease SsoII (Mutante K182A) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Vera Pingoud zur Verfügung gestellt. Das Enzym war aufgereinigt und lag in einem Lagerungspuffer mit 50% Glycerin vor. Es hatte eine Konzentration von 10 µM.

5.2 Mikrobiologische Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die für diese Arbeiten verwendeten Medien, Lösungen, Gefäße, Pipetten und sonstige Materialien wurden vor Benutzung für 30 min bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert.

5.2.1 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden, die als Substrate für die *mismatch*-Synthese und zur Expression der MutHLS-Proteine dienen, wurden Bakterien der Art *Escherichia coli* eingesetzt. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind Abkömmlinge des Sicherheitsstammes *E. coli* K12 (Sicherheitsstufe 1).

JM109

Der *E. coli* K12-Abkömmling JM109 eignet sich besonders zur langfristigen Aufbewahrung von Plasmiden, da dieser Stamm die Fähigkeit zur homologen Rekombination verloren hat. Plasmidverluste oder Integration episomaler Gene bzw. Genabschnitte in das Bakteriengenom sind somit weitestgehend ausgeschaltet. Er eignet sich jedoch nicht zur Expression rekombinanter Proteine, die unter Kontrolle eines T7-Promotors stehen, da er nicht über die benötigte Polymerase (T7-RNA-Polymerase) zur Transkription des mit dem Plasmid eingeführten Gens verfügt.

Genotyp des Stammes JM109: *gyr96A*, *recA1*, *relA1*, *hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*⁺), *endA1*, *thi*, Δ [*lac, proAB*], *supE44*, [*F*' ...], *traD36*, *proAB*, *lacI*^q Δ M15

HMS174(λ DE3)

Zur Expression von Proteinen in einem Vektor wie pET-15b oder anderen Plasmidkonstrukten mit einem λ - oder T7-Promotor eignen sich diese mit dem Phagen λ DE3 lysogenisierten Bakterienzellen. Die Lysogenisierung der Zellen ist wichtig, da dadurch die λ -RNA-Polymerase eingeführt wird, ohne die das auf dem Plasmid befindliche Gen nicht transkribiert werden kann. Dieser Stamm eignet sich für die Gewinnung sehr hoher Mengen an Protein.

Genotyp des Stammes HMS174(λ DE3): F^- , *recA*, $r_{K12}^-m_{K12}^+$, *Rif^r*, *DE3*

5.2.2 Plasmide

pET15b-XhoI und –HindIII

Aus dem Plasmid pET15b-XhoI wurden durch eine zielgerichtete Mutagenese die Varianten pET15b-X10, X20, X40, X80 sowie X80tri hergestellt. Das Gleiche geschah mit dem Ursprungsplasmid pET15b-HindIII. Durch die Mutagenese wurden eine zusätzliche d(GATC)-Sequenz eingeführt, die 10, 20, 40 oder 80 bp vom später auftretenden *mismatch* lokalisiert war. Im Falle des X80tri- bzw. H80tri-Plasmids wurde eine Erkennungssequenz für ein TFO (Tripelhelix-Forming Oligonucleotide) eingeführt, die für die Ausbildung einer Tripelhelix notwendig ist.

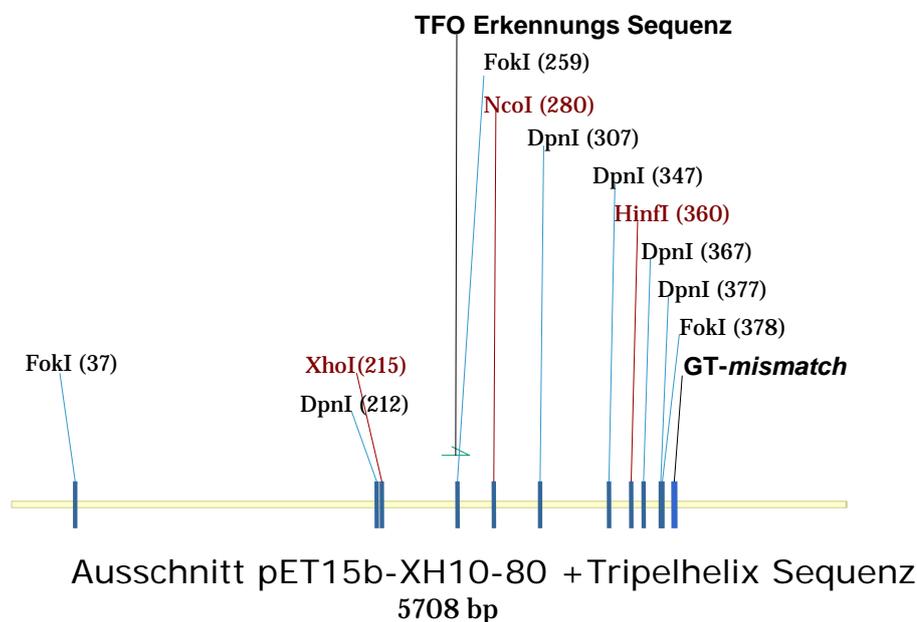


Abbildung 5-1: Überblick der wichtigsten Restriktionsschnittstellen der für die *mismatch*-Herstellung wichtigen Plasmide

Als Vergleich sind die Restriktionsschnittstellen aller verwendeten Plasmidvarianten aufgeführt. Quelle: Vector NTI 5.0

5.2.3 Glycerinkulturen

Bakterienkulturen lassen sich nur circa 4 Wochen bei 4 °C auf Erhaltungsplatten lagern. Nach Ablauf dieser Zeit ist mit einem Plasmidverlust oder mit dem Absterben der Bakterien zu rechnen. Um dies zu vermeiden, wurde eine Bakterienkultur, die erfolgreich mit einer der pET-15b-Varianten transformiert worden war, in Glycerin aufgenommen und konnte dadurch bei -70 °C gelagert werden.

Für die Anlage der Glycerinkultur wurden 3 ml LB-Medien, die den gewünschten Antibiotikazusatz enthielten, mittels eines sterilen Zahnstochers mit dem gewünschten Klon von einer Erhaltungsplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden noch einmal 3 ml LB-Medien (wieder mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz) mit je 100 µl der ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelwasserbad für weitere 4-5 Stunden angezogen. 800 µl dieser Kulturen wurden anschließend in einem geeigneten Gefäß (z.B. Costar Biofreeze™) steril mit 200 µl Glycerin versetzt. Das Bakterien-Glycerin-Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert und konnte danach bei -70 °C gelagert werden. Da die genetische Identität der Klone in Glycerinkulturen erhalten bleibt, kann man aus solchen Kulturen jederzeit mittels eines sterilen Zahnstochers Proben entnehmen, die zum Ausstreichen auf Agarplatten oder zum Animpfen von Flüssigmedien verwendet werden können.

5.3 Proteinaufreinigung MutHLS

5.3.1 Zellen ernten

Für die Aufreinigung der Enzyme MutH, MutL und MutS wurde jeweils eine 20 ml-Vorkultur, bestehend aus LB-Medium mit Ampicilin, mit den entsprechenden Glycerinkulturen (HMS174 (λ DE3)-Zellen) angesetzt. Nach Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad, wurden die 20 ml der Vorkultur vollständig auf die 500 ml der Hauptkultur übertragen (LB-Medium mit Ampicilin). Die Hauptkultur wurde bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,8-1 OD^{600 nm} wurde die Induktion durch Zugabe von 2,5 ml IPTG 0,1 M eingeleitet. Nach 4 Stunden Wachstum der Zellen bei 30 °C und Erreichen einer optischen Dichte von circa 3,0 OD^{600 nm} wurde die gesamte Hauptkultur in einen Zentrifugenbecher überführt und für 15 min bei 4200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 40 ml eiskaltem 1X STE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA) resuspendiert und in einen 50 ml Falcon-Becher überführt. Nach erneuter Zentrifugation der Suspension wurde der

Überstand dekantiert und das Sediment bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum Aufschluss der Zellen gelagert. Im Falle der MutL-Präparation wurde sofort mit der weiteren Aufreinigung fortgefahren.

5.3.2 Zellaufschluss

Das Bakterienpellet wurde auf Eis aufgetaut und mit 15 ml kaltem Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,9; 1 M NaCl; 5 mM Imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin) resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden anschließend mittels Ultraschall weiter aufgeschlossen. Dabei wurde für zwanzigmal für 15 sec beschallt mit jeweils 15 sec Pause dazwischen. Um eine Erhöhung der Temperatur zu vermeiden geschah der Aufschluss auf Eis. Im Anschluss wurden die unlöslichen Zellbestandteile von den löslichen durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt. Dies erfolgte bei 20000 rpm für 30 min bei 4°C in einer Beckmann-Zentrifuge mit Verwendung eines JA-20-Rotors. Der Überstand wurde direkt in einen 50 ml Grainer mit 10 ml Bindungspuffer und 1 ml Ni-NTA-Agarose gegeben.

5.3.3 Aufreinigung mit Ni-NTA-Säulchen

Der 50 ml Grainer wurde für eine 1 h im Kühlraum (ca. 4°C) geschwenkt und anschließend für 2 min bei 4°C und 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Das Pellet mit 30 ml Waschpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,9; 1 M NaCl; 20 mM Imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin) versetzt und für weiter 15 min im Kühlraum geschwenkt. Unter leichtem Schwenken wurde die Lösung anschließend auf ein Biorad-Säulchen übertragen. Nach Durchlauf der vollständigen Waschlösung wurde das Protein durch Zugabe von dreimal jeweils 2ml Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,9; 1 M NaCl; 500 mM Imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin) eluiert. Die Protein-Konzentration der Fraktionen wurde photometrisch bestimmt und die Fraktion mit der höchsten Konzentration für die Gelfiltration verwendet.

5.3.4 Aufreinigung mittels Gelfiltrationssäule

Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels FPLC und einer Sephadex 200-Säule. Die Fließgeschwindigkeit des Laufpuffers (20 mM HEPES pH 8,0; 200 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT) betrug während der Auftrennung 0,5 ml / min. MutS konnte dadurch bei den Fraktionen zwischen 22 und 23 min aufgefangen werden. Die MutL-Fraktion konnte dagegen nach 17 min und MutH nach etwa 12 min isoliert werden.

Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der aufgefundenen Fraktionen photometrisch bestimmt und die Enzyme mit flüssigen Stickstoff in kleinen Aliquots (5-10 µl) schockgefroren. Die Reinheit der Enzyme wurde mittels SDS-Gel überprüft.

5.3.5 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der aufgereinigten MutH, MutL und MutS-Proteine wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die Stammlösung wurde dazu 1:10 oder höher mit Reinstwasser verdünnt, in Quarzmikroküvetten (Fa. Helma; d = 1 cm) pipettiert und die Extinktion der Probe bei 240 bis 320 nm mit Hilfe eines U-3000-Spektralphotometers (Hitachi) gemessen. Der molekulare Extinktionskoeffizient (ϵ) der drei Enzyme inklusive His-tag konnte aufgrund der enthaltenen Tryptophan- und Tyrosin-Reste auf 34470, 54890 bzw. 73980 M⁻¹ cm⁻¹ festgelegt werden (Pace, 1995). Mit Hilfe der bei 280 nm bestimmten Extinktion (E) und der Schichtdicke der Küvette (d = 1 cm) ließ sich die Konzentration nach dem *Lambert-Beerschen* Gesetz ($E = c * d * \epsilon$) berechnen.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Plasmid-DNA-Präparationen

Die Isolierung von Plasmiden Mini-, Midi- oder Maxipräparationen wurde mit den entsprechenden Aufreinigungs-Kits von QIAGEN durchgeführt.

5.4.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der PCR-Produkte und der Plasmide wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Aufnahme eines Spektrums im Wellenlängenbereich zwischen 220 nm und 320 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass bei doppelsträngiger DNA 1 OD²⁶⁰nm = 50 µg/ml Nukleinsäure entsprechen, während einzelsträngige DNA (ssDNA) der gleichen Absorption eine Konzentration von 33 µg/ml hat (Pingoud, 1997).

Bei DNA-Präparationen konnte der Reinheitsgrad der isolierten DNA über das Verhältnis der gemessenen Extinktionen bei 260 nm und 280 nm, das idealerweise zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte, bestimmt werden. Kleinere Werte deuteten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, größere Werte (>1,8) auf RNA-Überreste in der DNA-Lösung.

5.4.3 Gelelektrophoretische Analysen

5.4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von Plasmiden und einiger linearer DNA-Fragmenten erfolgte mittels 1%iger Agarose-Gelelektrophorese. Nach Zugabe von 0,2 Vol. 5x-Agaroseauftragspuffer(5x-AAP: 250 mM EDTA; 1.2 % (w/v) SDS; 25 % (w/v) Saccharose; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau; 0.1 % (w/v) Xylencyanol; mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt) wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert Die Elektrophorese erfolgte in 1x-TPE-Puffer (800 mM Tris-Phosphat pH 8,2; 20 mM EDTA) bei einer konstanter Feldstärke von max. 10 V/cm Elektrodenabstand und RT. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml Ethidiumbromid in Wasser) für 30 min angefärbt und anschließend für 20 min in Wasser entfärbt. Zur Auswertung wurden die Gele mit UV-Licht der Wellenlänge von 312 nm auf einem Transilluminator (Bachhofer, Reutlingen) angeregt. Das in doppelsträngige DNA interkalierende Ethidiumbromid, fluoresziert und machte somit die DNA-Fragmente sichtbar. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe eines digitalen Videosystems (INTAS, Göttingen). Die Intensitäten der Banden konnten anschließend mit dem Gelanalyse-Programm TotalLab 2.01 quantitativ ausgewertet werden.

5.4.3.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 50-1000 bp (z.B. PCR-Produkte) eignete sich ein natives (nicht denaturierendes) 6%iges Polyacrylamidgel (1,5 Vol. 40 % AA 29:1; 8,5 Vol. 1x TPE). Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 0,2 Vol. 5x AAP versetzt. Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde vertikal mit 1x TPE-Laufpuffer, bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA (entsprechend 15-20 V/cm Elektrodenabstand) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel wie oben beschrieben in Ethidiumbromidlösung gefärbt und dokumentiert.

5.4.3.3 Denaturierende Harnstoff-PAGE

Zur Analyse von Spaltassays mit der Endonuklease MthH war es nötig, die Einzelstränge der DNA-Helix nach der Reaktion voneinander zu trennen und getrennt zu analysieren. Dies wurde erreicht durch den Zusatz von 8 M Harnstoff zur Acrylamid/Puffer-Mischung für ein 6%iges PAA-Gel (1,5 Vol. 40 % AA 19:1; 8,5 Vol. 1x TBE) und vorheriges Denaturierung der aufzutragenden Proben. Die Elektrophorese wurde bei hohen Stromstärken durchgeführt (10W 30mA 300V), um mit der damit verbundenen Hitzeentwicklung ein Rehybridsieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern und erfolgte mit dem Laufpuffer 1x TBE(100 mM Tris pH

8,0; 100 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA). Die Analyse der Harnstoffgele erfolgte über die radioaktive Markierung der DNA mit dem Instant Imager™ (Canberra Packard).

5.4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Proteinanalyse wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) eingesetzt. Diese Elektrophorese trennt die Polypeptidketten nach ihrem Molekulargewicht auf. Als Molekulargewichtsstandard diente die Protein-Standardmischung Merck IV. Die zu analysierende Protein-Probe wurde mit 0,2 Vol 5X-Lämmli-Auftrags-Puffer(5x LAP: 160 mM Tris / HCl pH 6,8; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 2 % (v/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Danach wurde die Probe für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend sofort auf 4°C abgekühlt. Die schnelle Temperaturumstellung wurde durch die Verwendung eines PCR-Thermocyclers (Perkin-Elmer) erreicht.

Bei der dann erfolgenden Elektrophorese wurde das Proteingemisch zuerst in einem großporigen Sammelgel (6% AA, pH 6.8) konzentriert, bevor die Auftrennung im Trenngel (15% AA, pH 8.8) erfolgte. Die Elektrophoresebedingungen lagen bei einer Stromstärke von 30 mA (für ein Gel der Größe 0.1 x 10 x 10 cm) in 1X SDS-Elektrodenpuffer (25 mM Tris pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS). Der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt, mit Essigsäure entfärbt und mit einem Videosystem (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

5.4.3.5 Kapillarelektrophorese

Die Analyse der fluorophormarkierten PCR-Produkten und *mismatch*-Substraten erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels Kapillarelektrophorese auf einem ABI PRISM 310 Genetic analyser (Perkin-Elmer). Die 47 cm lange Kapillare (Durchmesser 50 μ M) enthielt das POP-4 Polymere mit 8 M Harnstoff (Perkin-Elmer). Die einzelnen DNA-Proben wurden in TSR-Auftragspuffer (*Template Supression Reagent*) aufgenommen und durch Elektroinjektion in die Kapillare gebracht. Diese erfolgte durch eine Spannung von 15.000 V für 5 s. Der Lauf selbst wurde unter derselben Spannung durchgeführt bei einer Temperatur von 60°C bei Verwendung des 1X Genetic Analysis Puffer mit 1 mM EDTA (Perkin-Elmer). Als interner Längen-Standard wurde TAMRA 500 (Perkin-Elmer) verwendet.

5.4.3.6 Protein-Längenmarker

Der für die Lämmli-Gele verwendete Marker war:

Merck Standard IV (jeweils 8µl)

Markerprotein	Molekulargewicht (g / mol)
Ovotransferin	78000
Albumin	66250
Ovalbumin	42700
Carboanhydrase	30000
Myoglobin	16949
Cytochrom C	12384

5.4.3.7 DNA-Längen-Marker

Für die Größenbestimmung der analysierten DNA-Proben wurden folgende selbsthergestellte Marker eingesetzt:

Name	pRT54* <i>Hinfl</i>	λ-DNA* <i>EcoRV</i>
Konzentration	(100 ng / µl)	(100 ng / µl)
Fragmentgrößen	1061, 796, 719, 517, 396, 338, 298, 255, 221, 220, 191, 154, 145, 75	5765, 5376, 4613, 4597, 3873, 3744, 3595, 3326, 2884, 1921, 1679, 1434, 1403, 1377, 738, 655, 618, 588, 268, 35, 13

(Quelle: Vector NTI 5.0)

5.4.4 PCR-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; (Mullis, 1987)) wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation von DNA für analytische und präparative Zwecke eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, für die Mutagenese und die *mismatch*-Substratsynthese die *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Für die Amplifikation wurde ein Thermocycler der Firma Biometra oder Perkin-Elmer verwendet.

5.4.4.1 Standard-PCR

Wenn nicht anders angegeben, wurden für eine 50 µl PCR-Reaktion 10 ng *template* DNA, jeweils 400 nM des Hin- und Rück-Primers, 200 µM dNTP's und 1 U *Taq*- bzw. *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt, und die Reaktion in 1x PCR-Puffer (Promega) durchgeführt. Bei Bedarf konnten die PCR-Produkte radioaktiv markiert werden. Dies geschah durch Zugabe von (α -³²P)-dATPs (1-2 µl) in den PCR-Ansatz. Bei der Erzeugung der *mismatch*-Substrate wurde nur jeweils ein Strang radioaktiv markiert.

Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist spezifisch für die jeweilige Anwendung, und wird an den entsprechenden Stellen im Text angegeben. Die erhaltenen PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch analysiert und wenn nötig, für weitere Anwendungen aufgereinigt. Bei der Aufreinigung mit dem „QIAquickspin PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) werden die PCR-Primer, die dNTP's und die DNA-Polymerase von dem PCR-Produkt abgetrennt.

5.4.4.2 PCR-Produkte für die *mismatch*-Substrate

Für die Erzeugung der Vorstufen des *mismatch*-Substrats wurde jeweils zwei Standard-PCR-Reaktionen durchgeführt mit den Plasmid-*templates* pET15b-XhoI und pET15b-HindIII oder der entsprechenden Varianten (X10 und H10, X20 und H20, usw...). Als Hin-Primer wurde B111 oder B236 (Für ein 484 bp bzw. 359 bp langes Produkt) verwendet, als Rück-Primer A302. Beim Ansatz mit pET15b-XhoI waren die Primer B111 und B236 5'-phosphoryliert, beim Ansatz mit pET15b-HindIII entsprechend A302. Alle sonstigen Primer waren bei Bedarf mit den Fluorophoren FAM, HEX oder TET 5'-markiert. Für die PCR-Reaktion wurde das folgende Temperaturprofil verwendet.

Temperaturprofil (*mismatch*-Substrat)

Phase	1	2		3	4
T (°C)	94	94	55	72	72
t (sec)	60	15	30	45	150
Zyklen	1	20		1	99

Die Sequenz der für die Generierung des *mismatch*-Substrats verwendeten Primer:

Bezeichnung _____ Sequenz (5' → 3')

B111 TCATCCTCGGCACCGTCAC
 B236 TAGAGGCCCAAGGGGTTAT
 A302 ATCTTCCCCATCGGTGATGTC

Alle hier verwendeten Primer wurden sowohl unmodifiziert als auch 5'-phosphoryliert bzw. 5'-fluorophormarkiert eingesetzt.

5.4.4.3 PCR-Produkte für die Crosslink-Substraten

Für die Erzeugung der Vorstufen des Crosslink-Substrats wurde jeweils drei Standard-PCR-Reaktionen durchgeführt mit dem Plasmid-*template* pET15b-XhoI. Als Primer für die Herstellung des oberen Strangs wurde B236 und der am 5'-Ende phosphorylierte A302-p verwendet. Das Temperaturprofil entsprach dem der *mismatch*-Substrat-PCR (4.4.2.). Für die beiden unteren Stränge wurde das Primer-Paar B236-p / HindIII-X (-3X, -4X) und HindIIIclose-p / A302 verwendet. Für die PCR-Reaktion wurde das folgende Temperaturprofil verwendet.

Temperaturprofil (Crosslink-Substrat Stränge unten)

Phase	1	2			3	4
T (°C)	94	94	55	72	72	4
t (sec)	60	15	30	45 / 30	150 / 100	999
Zyklen	1	20			1	99

Die Sequenz der für die Generierung des Crosslink-Substrats verwendeten Primer:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
B236(-p)	TAGAGGCCCAAGGGTAT
A302(-p)	ATCTTCCCATCGGTGATGTC
HindIIIclose-p	GGACGCATCGTGGCC
HindIIIrück-X	GGCGTAGAGGATGAAGCT <u>U</u> TCGAGCCCGCGAAATTAATA
HindIIIrück-3X	GGCGTAGAGGATGAAGC <u>UUU</u> CGAGCCCGCGAAATTAATA
HindIIIrück-4X	GGCGTAGAGGATGAAGC <u>UUUU</u> CGAGCCCGCGAAATTAATA

„-p“ entspricht einer 5'-Phosphorylierung. Das „U“ entspricht 5'-Ioduridin

5.4.4.4 Zielgerichtete Mutagenese

Die Plasmid-*templates* für die *mismatch*-Substrate mit der zusätzlichen GATC Sequenz bzw. der Tripelhelix Erkennungssequenz wurden über eine zielgerichtete Mutagenese aus den Ursprungsplasmiden pET15b-XhoI und -HindIII kreiert. Das Protokoll dieser Methode orientiert sich an dem Verfahren von (Kirsch, 1998).

Die gewünschte Mutation wird dabei durch eine PCR-Reaktion über einen der PCR-Primer eingeführt. Als Endprodukt der PCR-Reaktion entsteht eine zirkuläre Kopie des mutierten Plasmids, das ohne weitere Umklonierungsschritte in eine Bakterienzelle transformiert werden kann. Zur Kontrolle der eingeführten Mutation wurde gleichzeitig eine zusätzliche Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym eingeführt.

Das Einführen der Mutation erfolgte über zwei getrennte PCR-Reaktionen. In der Ersten Stufe wurde zuerst ein kurzes 100-200 bp PCR-Produkt erzeugt, der so genannte „megaprimer“. Dieses doppelsträngige Produkt wurde anschließend aufgereinigt (über Qiagen PCR Purification Kit) und in der zweiten PCR-Reaktion als Primer verwendet, wobei das vollständige Plasmid repliziert wurde. Diese PCR-Reaktion wird als „inverse“ PCR bezeichnet. Wichtig für diese Form der Mutagenese ist eine vollständige Abtrennung des als *template* verwendeten Plasmids von den PCR-Produkten. Dies wurde durch einen Restriktionsverdau des gesamten Ansatzes mit *DpnI* (für 3 h bei 37°C mit 10 U) erreicht. *DpnI* aus *Streptococcus pneumoniae* spaltet nur methylierte G^mATC-Sequenzen, die nur in den *template*-Plasmiden auftreten, da diese aus *dam*⁺-*E. coli*-Zellen isoliert wurden. Die Produkte der PCR-Reaktion sind nicht methyliert und damit vor dem Verdau geschützt. Im Anschluss wurde das zirkuläre Produkt über eine Ethanol-Fällung aufgereinigt, in Aqua *demin.* aufgenommen und über Elektrotransformation in kompetente Zellen eingeführt.

Bedingungen der Mutagenese zur Einführung der zweiten d(GATC)-Sequenz

Für die Erzeugung der Megaprimer wurde jeweils zwei PCR-Reaktionen durchgeführt mit dem Plasmid-*template* pET15b-XhoI bzw. -HindIII. Als Primer wurde für die Einführung der d(GATC)-Sequenz GATC-10X (oder GATC-10H, -20MM, -40MM, bzw. -80MM) und der A302 verwendet. Jede PCR-Reaktion wurde mit 3 U *Pfu*-Polymerase unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils durchgeführt.

Temperaturprofil (*Megaprimer*)

Phase	1	2			3	4
T (°C)	94	94	56	72	72	4
t (sec)	90	30	30	30	150	999
Zyklen	1	25			1	99

Die Qualität des Megaprimers wurde nach der Aufreinigung durch Auftrag auf einem 6%igen PAA-Gel überprüft und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Sequenz der verwendeten Mutagenese-Primer:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
GATC-10 X MM	GTATTAATTTG [^] GATCCCTCGAGAGCT
GATC-10 H MM	GTATTAATTTG [^] GATCCCTCGAAAGCT
GATC-20 MM	TAGTGAGTCG [^] GATCCATTTTCGCGGG
GATC-40 MM	TATCCGCTCAG [^] GATCCCCCTATAGTG
GATC-80 MM	TTCTTAAAGTG [^] GATCCAAATTATTTC

G[^]GATCC = BamHI Erkennungsequenz

Für die Durchführung der „inversen“ PCR wurden im Anschluss 0,4 µM des aufgereinigten Megaprimers genommen und zusammen mit dem Plasmid-*template* pET15b-XhoI bzw. – HindIII und 5 U *Pfu*-Polymerase unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Temperaturprofil („inverse“ PCR)

Phase	1	2			3			4	5
T (°C)	95	95	60	68	95	60	68	68	4
t (sec)	120	50	50	1080	50	50	1080*	420	999
Zyklen	1	9			9			1	99

* = + 15 s pro Zyklus

Bedingungen der Mutagenese zur Erzeugung der Tripelhelix-*templates*

Die Prozedur erfolgte vergleichbar mit der Mutagenese zur Einführung der zweiten d(GATC)-Sequenz. Unterschiede waren in den verwendeten Mutageneseprimern und den Temperaturprofilen.

Temperaturprofil (*Megaprimer*)

Phase	1	2			3	4
T (°C)	94	94	56	72	72	4
t (sec)	90	30	30	30	150	999
Zyklen	1	25			1	99

Temperaturprofil („inverse“ PCR)

Phase	1	2			3			4	5
T (°C)	95	95	60	68	95	60	68	68	4
t (sec)	120	50	50	1080	50	50	1080*	420	999
Zyklen	1	9			9			1	99

* = + 15 s pro Zyklus

Sequenz der verwendeten Mutagenese-Primer:

Bezeichnung Sequenz (5' → 3')

Tripelhelix sense CAGGCCGCTGAGAGAGAG[^]AAAAAATGATGACCATCCGCCCATGGT

Tripelhelix antisense ACCATGGGCGGATGTCATCATTT[^]TTTTCTCTCTCTCAGCGGCCTG

CATCC bzw. GGATG = Erkennungssequenz FokI; [^] = Spaltstelle FokI

5.4.4.4 Plasmid-Aufreinigung durch Ethanol-Fällung

Nach dem DpnI-Verdau wurde das Zirkuläre PCR-Produkt mit Ethanol präzipitiert, um es von den in der Lösung befindlichen Enzymen, kleineren DNA-Fragmenten und den Puffersalzen zu trennen. Bei einem 50 µl PCR-Ansatz wurde dazu 300µl Ethanol (96%), 15µl Natrium-Aceat (3M) und 20 µg Glykogen pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung für weitere 30 min bei 9000 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom milchigem Pellet abgetrennt und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und für 30 min bei 9000 g zentrifugiert (Im Kühlraum bei etwa 4°C). Anschließend wurde der Überstand erneut entfernt und verworfen. Das Pellet wurde mittels Speedvac getrocknet und in 10µl Aqua demin. aufgenommen.

5.5 Substratherstellung

5.5.1 Herstellung der *mismatch*-Substrate

Mittels PCR wurden zwei, bis auf ein Basenpaar identische DNA-Fragmente hergestellt. Durch Verwendung eines phosphorylierten Primers während der PCR-Reaktion wurde ein Strang des PCR-Produkt mit einer 5'-Phosphatgruppe versehen. Durch die Wahl welcher Primer phosphoryliert war, ließ sich festlegen, ob der Hin- oder der Rück-Strang markiert wurde, der dann durch den folgenden λ-Exonukleaseverdau entfernt werden konnte (siehe dazu Abb. 2-1).

Für die Reaktion inkubierte man 1000 ng eines aufgereinigten PCR-Fragments (Qiagen PCR-Purification Kit) mit 5 U λ -Exonuklease, ein Enzym des λ -Phagens. Dieses Enzym entfernt spezifisch den am 5'-Ende phosphorylierten Einzelstrang von einer Doppelsträngigen DNA. Der λ -Phage nutzt diese Fähigkeit des Enzyms normalerweise zur Vorbereitung der Integration seiner DNA in ein Wirtsgenom. Die Inkubation der Spaltreaktion erfolgte bei 37 °C für 1 h und wurde danach durch Erhitzen für 10 min bei 70 °C abgestoppt. Der vollständige Verdau des PCR-Produkts konnte anschließend durch Auftragen eines DNA-Aliquots auf ein 6%iges PAA-Gel überprüft werden, da sich das Laufverhalten von einzelsträngiger DNA signifikant von dem doppelsträngiger unterscheidet.

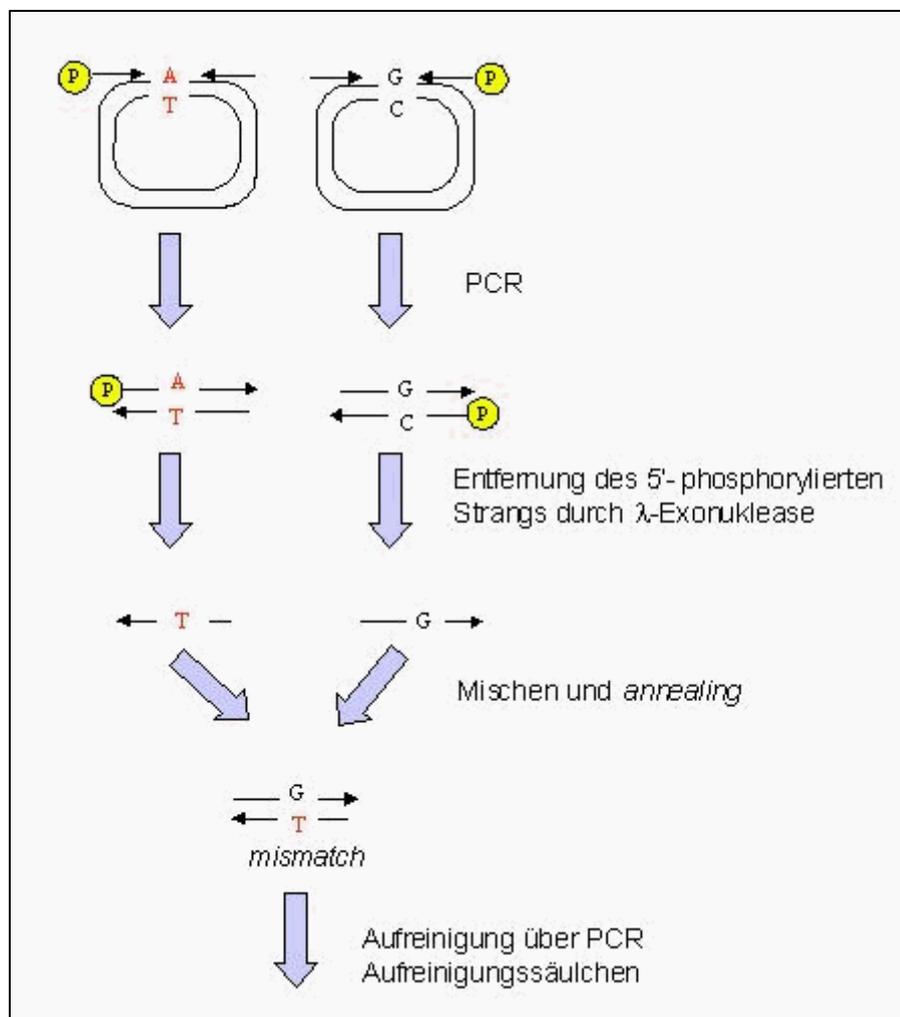


Abbildung 5-2: Methode zur Generierung von *mismatch*-Substraten mit phosphorylierten Primern

Zwei bis auf ein Basenpaar identische Plasmide werden zur Amplifikation von PCR-Produkten verwendet. Bei einem PCR-Ansatz ist jeweils der *sense*-Primer bzw. der *antisense*-Primer 5'-phosphoryliert. Durch Verdau mit λ -Exonuklease wird jeweils der phosphorylierte Einzelstrang abgedaut. Die komplementären Einzelstränge werden gemischt und hybridisiert. Die *mismatch*-Substrate werden aufgereinigt.

Nach vollständigem Verdau wurden equimolare Mengen der beiden komplementären Einzelstränge gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Dadurch wurden alle Sekundärstrukturen der DNA-Stränge aufgeschmolzen. Durch anschließendes langsames Abkühlen (in 20 min auf RT) hybridisierten die komplementären Einzelstränge und es bildeten sich Doppelstränge mit einem *mismatch* aus. Gelagert wurden die fertigen *mismatch*-Substrate anschließend bei -20 °C. Bei Verwendung von bereits methylierten PCR-Produkten, konnten auf diese Weise auch hemimethylierte *mismatch*-Substrate erzeugt werden.

5.5.2 Methylierung

Für die Herstellung der hemimethylierten *mismatch*-Substrate musste zuerst ein PCR-Produkt vollständig methyliert werden. Im Allgemeinen wurden dazu 300 nM PCR-Produkte (mit ein oder zwei d(GATC)-Sequenzs) mit 3 µM dam-Methyltransferase (Eigenpräparation) in Gegenwart von 1 mM SAM (S-Adenosyl-L-Methionin von Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Bei der Reaktion wurde der 1x-damMT-Puffer von NEB verwendet. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 h bei 37 °C wurde die Vollständigkeit der Reaktion durch einen DpnI-Verdau kontrolliert, da dieses Enzym nicht Adenin methylierte d(GATC)-Sequenzs spaltet. Ein 100 ng Aliquot wurde dafür mit 5 U DpnI für 30 min bei 37 °C verdaut und die Spaltung auf einem 6%igem PAA-Gel überprüft. Bei unvollständiger Methylierung wurde nachträglich 1 µM dam-MT und 0,5 mM SAM in die Methylierungsreaktion nachgegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die methylierte DNA mittels Qiagen PCR-Säulchen aufgereinigt und die DNA-Menge photometrisch bestimmt.

5.5.3 Herstellung der Crosslink-Substrate

Für die Erzeugung des Crosslink-Substrat mit einem oder mehreren 5'-Ioduridinen am *mismatch* wurden drei verschiedene PCR-Produkte benötigt. Für den oberen Strang das PCR-Produkt aus den Primern B111 / A302-p (484 bp). Für die beiden unteren Stränge die PCR-Produkte B111-p / HindIII-X (-3X bzw -4X) (384 bp) und HindIIIclose-p / A302 (100 bp). Das „-p“ zeigt den am 5'-Ende phosphorylierten Strang an der durch den folgenden λ-Exonuklease entfernt werden konnte. Das PCR-Produkt für den oberen Strang war zusätzlich methyliert worden, um die MutHLS-Spaltung ausschließlich auf dem unteren Strang zu ermöglichen. Equimolare Mengen der drei DNA-Fragmente wurde mit λ-Exonuklease verdaut (Je 5 U für 1000 ng DNA) und die Vollständigkeit des Verdaus durch Auftrag auf ein

6%iges PAA-Gel kontrolliert. Anschließend wurden die drei Einzelstränge gemischt und homolog der *mismatch*-Substrat-Synthese hybridisiert. Mit dem Verdau durch Exonuklease I und der Aufreinigung mit Qiagen PCR-Aufreinigungs-Säulchen wurde die Herstellung beendet.

5.5.4 Präparation der Oligoduplices

Zur Detektion der Oligoduplices im PAA-Gel wurde eine radioaktive Phosphatgruppe an das 5'-Ende des Strangs mit dem 5'-Ioduridin angehängt. Dazu wurden jeweils 10 μM Oligodesoxynukleotid mit 10 U Polynukleotidkinase (PNK) in Gegenwart von 5 μM (γ - ^{32}P)-ATP und in 1x PNK-Puffer (NEB) inkubiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Phosphorylierungs-Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min abgestoppt. Anschließend wurde zum phosphorylierten Oligonukleotid 100 μM des unmarkierten Komplementär-Strangs pipettiert und für weiter 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde in einem Zeitrahmen von 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt um die Hybridisierung zu ermöglichen. Der gebildete Oligoduplex wurde ohne weitere Aufreinigung für die Crosslink-Reaktion verwendet.

Tabelle der Sequenzen, der für die für die Crosslink-Versuche verwendete Oligonukleotide:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>
Oberer Strang	
HindIIIrück-X	GGCGTAGAGGATGAAGCT <u>U</u> TCGAGCCCGCGAAATTAATA
HindIIIrück-3X	GGCGTAGAGGATGAAGCU <u>UU</u> CGAGCCCGCGAAATTAATA
HindIIIrück-4X	GGCGTAGAGGATGAAGCU <u>UUU</u> CGAGCCCGCGAAATTAATA
HindIII_rück	GGCGTAGAGGATGAAGCTTTCGAGCCCGCGAAATTAATA
Unterer Strang	
XhoI_hin	TATTAATTTTCGCGGGCTCGAGAGCTTCATCCTCTACGCC
antiHindIIIrück	TATTAATTTTCGCGGGCTCGAAAGCTTCATCCTCTACGCC

Das „U“ entspricht 5'-Ioduridin

5.6 MutHLS-Versuche

5.6.1 Standard-MutHLS-Assay

Verschiedene Konzentrationen an DNA-Substrat (5-25 nM) wurden mit MutS in Gegenwart von 1 mM ATP in 1X Puffer gelb (10 mM Tris / HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 0,1 mg / ml

BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz enthielt außerdem verschiedene Konzentrationen KCl (100 – 125 mM) zur Reduktion der *mismatch*-unabhängigen MutHL-Reaktion. Gleichzeitig wurden 2,5 µM MutL mit 4 mM ATP in Puffer gelb für 15 min auf Eis vorinkubiert. 1 µM MutH wurde ebenfalls in 1X Puffer gelb für 15 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die entsprechenden Volumina MutL- und MutH-Lösung gemischt und dabei auf die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt (siehe Ergebnisteil für die verwendeten Enzymkonzentrationen). Der MutHL-Mix wurde anschließend zum MutS-DNA-Ansatz pipettiert und die MutHLS-Reaktion damit eingeleitet.

5.6.2 Probenaufbereitung der MutHLS-Ansätze

Je nach verwendeter Analysemethode wurde die MutHLS-Reaktion unterschiedlich abgestoppt. Bei Analyse auf einem denaturierenden Harnstoff-Gel wurde die MutHLS-Reaktion durch Zugabe des zweifachen Volumens einer FA-Puffers (75 % (v / v). Formamid; 100 mM EDTA) abgestoppt. Die Probe wurde vor dem Auftrag aufs Gel für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf 4 °C abgekühlt durch Verwendung eines PCR-Geräts (Perkin-Elmer).

Für die Analyse mittels Kapillarelektrophorese wurde die MutHLS-Probe zuerst mit 25 ng Plasmid-DNA gemischt und für 5 min auf Eis gelagert, um ein Abdissozieren von MutS vom *mismatch*-Substrat zu ermöglichen. Durch die Konkurrenz mit der Plasmid-DNA, die von MutS deutlich besser gebunden wird, konnte die Qualität der Elektropherogramme an der Kapillarelektrophorese enorm verbessert werden. Direkt danach wurden 15 µl TSR-Auftragspuffer und 0,6 µl TAMRA-Standard 500 dazugegeben. Die Probe wurde anschließend für 5 min auf 95 °C erhitzt und sofort danach auf 4 °C abgekühlt auch hier durch Verwendung eines PCR-Thermocyclers (Perkin-Elmer).

5.6.3 Standard-MutHL-Assay

Bei Ansätzen, die zur Darstellung der *mismatch*-unabhängigen MutHL-Reaktion verwendet werden sollten, wurden 2,5 µM MutL mit 4 mM ATP in 1x Puffer gelb für 15 min auf Eis vorinkubiert. Über den gleichen Zeitraum wurden 1 µM MutH ebenfalls in 1x Puffer gelb auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die entsprechenden Volumina der MutL- und MutH-Lösung gemischt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt (siehe Ergebnisteil für die verwendete Enzymkonzentration). Die gewünschte DNA-Substrat-Konzentration (5 –

25 nM) wurde zuvor mit 1x Puffer gelb und 1 mM ATP eingestellt. Die Spaltung wurde anschließend mit der Zugabe des MutHL-Mix zur DNA-Lösung gestartet.

Das Abstoppen der Reaktion und die weitere Probenaufbereitung hing von der Analysemethode ab und erfolgte entsprechend mit der des MutHLS-Assay (s.o.).

5.6.4 MutHLS-Assay mit vorgespaltene*n* mismatch-Substraten

Bei den Versuchen zur Untersuchung der in *Cis* und *Trans* erfolgenden MutHLS-Reaktion wurden mit Restriktionsenzymen verdaute DNA-Produkte eingesetzt. Dazu wurde die DNA-Probe für 30 min bei 37 °C in 1x Puffer gelb mit 5 U Restriktionsenzym (XhoI, NcoI oder HinfI) verdaut. Zur Inaktivierung der Endonukleasen wurde die Probe im Anschluss für 30 min bei 75 °C inkubiert. Als Vergleich wurde immer eine unverdaute DNA-Probe verwendet, die in der gleichen Art und Weise in 1x Puffer gelb verdünnt wurde und den gleichen Temperaturen ausgesetzt war. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurde die gewünschte DNA-Menge für die MutHLS-Reaktion bereitgestellt und unter den Standardbedingungen für die MutHLS-Reaktion gespalten (s.o.).

5.6.5 UV-Bestrahlung

Der MutS-DNA-Crosslink wurde durch die Bestrahlung mit einem Helium-Cadmium-Laser bei 325nm (LaserLab 2000) erzeugt. Dazu wurde MutS mit dem radioaktiv markierten Oligoduplex oder dem langen Crosslink-Substrat gemischt. Die Bindungsreaktion erfolgte auf Eis in Gegenwart von 100 mM KCl und in 1x Puffer gelb (ohne BSA). Nach 15 min Vorinkubation wurde die Bestrahlung gestartet. Nach 1 h wurde die Probe mit 0,2 Vol 5x LAP versetzt und für den Auftrag auf ein SDS-Gel vorbereitet. Die Analyse erfolgte sowohl mittels Instant Imager™ (Canberra Packard) als auch mittels Färbung mit Coomassie Blue.

5.7 Blockade zwischen mismatch und d(GATC)-Sequenz

5.7.1 Erzeugung der Tripelhelix

Zur Erzeugung der Tripelhelix wurde die einfache Menge Substrat-DNA, PCR-Produkt oder *mismatch*-Substrat mit der 1,5-fachen Menge TFO (*Tripelhelix Forming Oligonucleotide*) gemischt. Die Reaktion erfolgte in 1x TFO-Puffer (20 mM Tris/Phosphat pH 7,2) in Gegenwart von 1 mM Spermin (Merck) bei 37 °C für mindestens 12 h. Im Anschluss konnte das Substrat ohne weitere Aufreinigung in den verschiedenen Versuchen eingesetzt werden.

5.7.2 SsoII-shift

Für den Nachweis der DNA-Bindungs-Aktivität der SsoII-Mutante K182A wurde ein Shift-Experiment durchgeführt. Dazu wurde ein PCR-Produkt, durch Verwendung von [α - 32 P]-dATP während der PCR-Reaktion, radioaktiv markiert. 10 nM dieses DNA-Produkts wurden jeweils mit steigenden Konzentrationen SsoII K182A (0, 100, 200 und 400 nM) bei RT inkubiert. Die Anlagerungsreaktion erfolgte in Gegenwart von 1 mM ATP, 125 mM KCl und 1x Puffer gelb, was den Standardbedingungen der MutHLS-Reaktion entspricht. Für den späteren Auftrag auf das Gel enthielt dieser Puffer zusätzlich 10% Glycerin. Nach 20 min wurden die einzelnen Proben auf ein 6%iges PAA-Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 80V für 1.30 h (Laufpuffer: 20 mM Tris / Acetat pH 8,5; 5 mM CaCl₂). Die Analyse erfolgte mittels Instant Imager™ (Canberra Packard).

6 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Dissertation wurden einzelne Aspekte des postreplikativen *mismatch* Reparatur Systems von *E. coli* (MutHLS) mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht, um die spezifischen Abläufe dieses Prozesses genauer charakterisieren zu können. Besonderer Fokus lag dabei auf die Reaktionen, die zwischen dem Schritt der *mismatch*-Erkennung und dem der Strangdiskriminierung erfolgen. Durch die Verwendung eines eigens kreierten Testsystems sollten die dabei vorhandenen kritischen Versuchsparameter des MutHLS-Systems identifiziert und gleichzeitig mit den gefundenen Daten ein mögliches Modell für diesen Mechanismus vorgestellt werden.

Bei den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen KCl-Konzentration eine *mismatch*-unabhängigen Nebenreaktion von MutHL erfolgt, die der eigentlichen Hauptreaktion von MutHLS aufgelagert ist. Diese Nebenreaktion kann durch die Verwendung hoher Salzkonzentrationen (> 125 mM) nahezu vollständig unterdrückt werden. Ein weiterer wichtiger Parameter der identifiziert werden konnte, ist beim DNA-Substrat die vorhandene Distanz zwischen der d(GATC)-Sequenz zum DNA-Ende. Die Effizienz der Spaltreaktion wird mit kleiner werdendem Abstand zum Ende deutlich reduziert. Der Einfluss auf die die MutHLS-Reaktion ist dabei deutlich höher als auf die Nebenreaktion von MutHL.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass MutS während der Strandiskriminierungsreaktion von MutH nicht am *mismatch* gebunden vorliegt, anders als es breits in verschiedenen Publikationen beschrieben wird. Eine d(GATC)-Stelle, die so dicht am *mismatch* liegt, dass sie von einem gebundenen MutS bedeckt wurde, konnte trotz dieser Nähe in einer *mismatch*-abhängigen Weise geschnitten werden. Der Stimulus für diese Spaltung kommt dabei nachgewiesenerweise vom gleichen DNA-Molekül (in cis) und nicht von einem anderen aus (in trans), wie es bei dieser Art des Mechanismus möglich wäre.

Durch weiterführende Experimente liess sich nachweisen, dass eine Blockade auf der DNA zwischen *mismatch* und d(GATC)-Sequenz, kein Hindernis für die Strangdiskriminierungsreaktion darstellt. Damit kann ein Mechanismus bei dem MutSL auf der DNA gleitend den Kontakt zu MutH herstellen (*sliding clamp*-Modell) ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit gefundenen Resultate unterstützen vielmehr einen „*looping*“-Mechanismus, bei dem der Kontakt zwischen MutSL und der d(GATC)-Spaltstelle über eine Schleifenbildung der DNA ermöglicht wird. Aber anders als dieser Mechanismus bisher beschrieben wurde, bleibt MutS während der Reaktion nicht am *mismatch* gebunden.

7 Literaturverzeichnis

Acharya, S., P. L. Foster, P. Brooks & R. Fishel (2003). "The Coordinated Functions of the *E. coli* MutS and MutL Proteins in Mismatch Repair." *Molecular Cell* **12**: 233-246.

Allen, D. J., A. Makhov, M. Grilley, J. Taylor, R. Thresher, P. Modrich & J. D. Griffith (1997). "MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism." *EMBO Journal* **16**(14): 4467-76.

Au, K. G., K. Welsh & P. Modrich (1992). "Initiation of methyl-directed mismatch repair." *Journal of Biological Chemistry* **267**(17): 12142-12148.

AUSUBEL ET AL (1987-2003) Current Protocols in Molecular Biology

Bakker, A. & D. W. Smith (1989). "Methylation of GATC Sequenzs is required for precise timing between rounds of DNA replication in Escherichia coli." *J Bacteriol* **171**(10): 5738-42.

Ban, C. & W. Yang (1998). "Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis." *Cell* **95**(4): 541-552.

Beaulieu, M., G. P. Larson, L. Geller, S. D. Flanagan & T. G. Krontiris (2001). "PCR candidate region mismatch scanning: adaptation to quantitative, high-throughput genotyping." *Nucleic Acids Res* **29**(5): 1114-24.

Besnier, C. & H. Kong (2001). "Converting MlyI endonuclease into a nicking enzyme by changing its oligomerization state." *EMBO Rep* **2**(9): 782-6.

Bjornson, K. P., L. J. Blackwell, H. Sage, C. Baitinger, D. Allen & P. Modrich (2003). "Assembly and molecular activities of the MutS tetramer." *J Biol Chem* **278**(36): 34667-73.

Blackwell, L. J., D. Martik, K. P. Bjornson, E. S. Bjornson & P. Modrich (1998). "Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism." *J Biol Chem* **273**(48): 32055-32062.

Blackwell, L. J., K. P. Bjornson & P. Modrich (1998). "DNA-dependent activation of the hMutS α ATPase." *J Biol Chem* **273**(48): 32049-54.

Buermeyer, A. B., S. M. Deschenes, S. M. Baker & R. M. Liskay (1999). "Mammalian DNA mismatch repair." *Annu Rev Genet* **33**: 533-64.

Cooper, D. L., R. S. Lahue & P. Modrich (1993). "Methyl-directed mismatch repair is bidirectional." *Journal of Biological Chemistry* **268**(16): 11823-9.

Faria, M., C. D. Wood, L. Perrouault, J. S. Nelson, A. Winter, M. R. White, C. Helene & C. Giovannangeli (2000). "Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 3862-7.

Feng, G., H. C. Tsui & M. E. Winkler (1996). "Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase Escherichia coli K-12 cells." *Journal of Bacteriology* **178**(8): 2388-96.

Feng, G. & M. E. Winkler (1995). "Single-step purifications of His₆-MutH, His₆-MutL and His₆-MutS repair proteins of Escherichia coli K-12." *Biotechniques* **19**(6): 956-965.

Fishel, R. (1998). "Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction." *Genes Dev* **12**(14): 2096-101.

Friedhoff, P., B. Sheybani, E. Thomas, C. Merz & A. Pingoud (2002). "Haemophilus influenzae and Vibrio cholerae genes for mutH are able to fully complement a mutH defect in Escherichia coli." *FEMS Microbiol Lett* **208**(1): 121-126.

- Friedhoff, P., E. Thomas & A. Pingoud (2003).** "Tyr-212: A key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MutH." *Journal of Molecular Biology* **325(2)**: 285-297.
- Funchain, P., A. Yeung, J. L. Stewart, R. Lin, M. M. Slupska & J. H. Miller (2000).** "The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness." *Genetics* **154**: 959-70.
- Gradia, S., S. Acharya & R. Fishel (1997).** "The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch." *Cell* **91(7)**: 995-1005.
- Grilley, M., J. Griffith & P. Modrich (1993).** "Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair." *Journal of Biological Chemistry* **268(16)**: 11830-7.
- Harfe, B. D. & S. Jinks-Robertson (2000).** "DNA mismatch repair and genetic instability." *Annu Rev Genet* **34**: 359-399.
- Hunter, W. N., T. Brown, G. Kneale, N. N. Anand, D. Rabinovich & O. Kennard (1987).** "The structure of guanosine-thymidine mismatches in B-DNA at 2,5 Å resolution." *J. Biol. Chem.* **262**: 9962-9970.
- Iaccarino, I., G. Marra, F. Palombo & J. Jiricny (1998).** "hMsh2 and hMsh6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α ." *Embo J* **17(9)**: 2677-86.
- Jiricny, J. (1998).** "Replication errors: challenging the genome." *EMBO J.* **17(22)**: 6427-36.
- Jiricny, J. (2000).** "Mismatch repair: the praying hands of fidelity." *Curr Biol* **10(21)**: R788-90.
- Jiricny, J. & G. Marra (2003).** "DNA repair defects in colon cancer." *Curr Opin Genet Dev* **13(1)**: 61-9.
- Joshi, A. & B. J. Rao (2002).** "ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex: a case for MutS treadmilling?" *Biochemistry* **41(11)**: 3654-66.
- Kirsch, R. D. & E. Joly (1998).** "An improved PCR-mutagenesis strategy for two-Sequence mutagenesis or sequence swapping between related genes." *Nucleic Acids Res* **26(7)**: 1848-1850.
- Kunkel, T. A. (1992).** "DNA replication fidelity." *J Biol Chem* **267(26)**: 18251-4.
- Lahue, R. S., K. G. Au & P. Modrich (1989).** "DNA mismatch correction in a defined system." *Science* **245(4914)**: 160-164.
- Lahue, R. S., S. S. Su & P. Modrich (1987).** "Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* mutHLS mismatch correction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84(6)**: 1482-6.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind & T. K. Sixma (2000).** "The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch." *Nature* **407(6805)**: 711-717.
- LeClerc, J. E., B. Li, W. L. Payne & T. A. Cebula (1996).** "High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens." *Science* **274(5290)**: 1208-11.
- Malkov, V. A., I. Biswas, R. D. Camerini-Otero & P. Hsieh (1997).** "Photocross-linking of the NH₂-terminal region of Taq MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA." *Journal of Biological Chemistry* **272(38)**: 23811-7.
- Marra, G. & P. Schär (1999).** "Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system." *Biochem J* **338(Pt 1)**: 1-13.
- Mechanic, L. E., B. A. Frankel & S. W. Matson (2000).** "*Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA." *J Biol Chem.*
- Modrich, P. (1991).** "Mechanisms and biological effects of mismatch repair." *Annu Rev Genet* **25**: 229-253.

- Modrich, P. (1994).** "Mismatch repair, genetic stability, and cancer." *Science* **266(5193)**: 1959-60.
- Modrich, P. (1997).** "Strand-specific mismatch repair in mammalian cells." *Journal of Biological Chemistry* **272(40)**: 24727-30.
- Modrich, P. & R. Lahue (1996).** "Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology." *Annual Review of Biochemistry* **65**: 101-133.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona (1987).** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Obmolova, G., C. Ban, P. Hsieh & W. Yang (2000).** "Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA." *Nature* **407(6805)**: 703-710.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley & T. Gray (1995).** "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Sci* **4(11)**: 2411-2423.
- Pingoud, A. & C. Urbanke (1997).** Arbeitsmethoden der Biochemie. Berlin, de Gruyter.
- Pingoud, V., E. Kubareva, G. Stengel, P. Friedhoff, J. M. Bujnicki, C. Urbanke, A. Sudina & A. Pingoud (2002).** "Evolutionary relationship between different subgroups of restriction endonucleases." *J Biol Chem* **277(16)**: 14306-14.
- Pingoud, V., C. Conzelmann, S. Kinzebach, A. Sudina, V. Metelev, E. Kubareva, J. M. Bujnicki, R. Lurz, G. Luder, S. Y. Xu & A. Pingoud (2003).** "PspGI, a type II restriction endonuclease from the extreme thermophile *Pyrococcus* sp.: structural and functional studies to investigate an evolutionary relationship with several mesophilic restriction enzymes." *J Mol Biol* **329(5)**: 913-29.
- Sancar, A. & J. E. Hearst (1993).** "Molecular matchmakers." *Science* **259(5100)**: 1415-20.
- Schofield, M. J., S. Nayak, T. H. Scott, C. Du & P. Hsieh (2001).** "Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch." *J Biol Chem* **276(30)**: 28291-9.
- Seidman, M. M. & P. M. Glazer (2003).** "The potential for gene repair via triple helix formation." *J Clin Invest* **112(4)**: 487-94.
- Smith, J. & P. Modrich (1996).** "Mutation detection with MthH, MutL, and MutS mismatch repair proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(9)**: 4374-9.
- Spampinato, C. & P. Modrich (2000).** "The MutL ATPase Is Required for Mismatch Repair." *J. Biol. Chem.* **275(13)**: 9861-9869.
- Acharya, S., P. L. Foster, P. Brooks & R. Fishel (2003).** "The Coordinated Functions of the *E. coli* MutS and MutL Proteins in Mismatch Repair." *Molecular Cell* **12**: 233-246.
- Allen, D. J., A. Makhov, M. Grilley, J. Taylor, R. Thresher, P. Modrich & J. D. Griffith (1997).** "MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism." *EMBO Journal* **16(14)**: 4467-76.
- Au, K. G., K. Welsh & P. Modrich (1992).** "Initiation of methyl-directed mismatch repair." *Journal of Biological Chemistry* **267(17)**: 12142-12148.
- Bakker, A. & D. W. Smith (1989).** "Methylation of GATC sites is required for precise timing between rounds of DNA replication in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **171(10)**: 5738-42.
- Ban, C. & W. Yang (1998).** "Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis." *Cell* **95(4)**: 541-552.
- Beaulieu, M., G. P. Larson, L. Geller, S. D. Flanagan & T. G. Krontiris (2001).** "PCR candidate region mismatch scanning: adaptation to quantitative, high-throughput genotyping." *Nucleic Acids Res* **29(5)**: 1114-24.
- Besnier, C. & H. Kong (2001).** "Converting MlyI endonuclease into a nicking enzyme by changing its oligomerization state." *EMBO Rep* **2(9)**: 782-6.

- Bjornson, K. P., L. J. Blackwell, H. Sage, C. Baitinger, D. Allen & P. Modrich (2003).** "Assembly and molecular activities of the MutS tetramer." *J Biol Chem* **278(36)**: 34667-73.
- Blackwell, L. J., K. P. Bjornson & P. Modrich (1998).** "DNA-dependent activation of the hMutS α ATPase." *J Biol Chem* **273(48)**: 32049-54.
- Blackwell, L. J., D. Martik, K. P. Bjornson, E. S. Bjornson & P. Modrich (1998).** "Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism." *J Biol Chem* **273(48)**: 32055-32062.
- Buermeyer, A. B., S. M. Deschenes, S. M. Baker & R. M. Liskay (1999).** "Mammalian DNA mismatch repair." *Annu Rev Genet* **33**: 533-64.
- Chodosh, L. A. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons.
- Cooper, D. L., R. S. Lahue & P. Modrich (1993).** "Methyl-directed mismatch repair is bidirectional." *Journal of Biological Chemistry* **268(16)**: 11823-9.
- Faria, M., C. D. Wood, L. Perrouault, J. S. Nelson, A. Winter, M. R. White, C. Helene & C. Giovannangeli (2000).** "Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(8)**: 3862-7.
- Feng, G., H. C. Tsui & M. E. Winkler (1996).** "Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells." *Journal of Bacteriology* **178(8)**: 2388-96.
- Feng, G. & M. E. Winkler (1995).** "Single-step purifications of His₆-MutH, His₆-MutL and His₆-MutS repair proteins of *Escherichia coli* K-12." *Biotechniques* **19(6)**: 956-965.
- Fishel, R. (1998).** "Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction." *Genes Dev* **12(14)**: 2096-101.
- Friedhoff, P., B. Sheybani, E. Thomas, C. Merz & A. Pingoud (2002).** "*Haemophilus influenzae* and *Vibrio cholerae* genes for *mutH* are able to fully complement a *mutH* defect in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* **208(1)**: 121-126.
- Friedhoff, P., E. Thomas & A. Pingoud (2003).** "Tyr-212: A key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MutH." *Journal of Molecular Biology* **325(2)**: 285-297.
- Funchain, P., A. Yeung, J. L. Stewart, R. Lin, M. M. Slupska & J. H. Miller (2000).** "The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness." *Genetics* **154**: 959-70.
- Gradia, S., S. Acharya & R. Fishel (1997).** "The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch." *Cell* **91(7)**: 995-1005.
- Grilley, M., J. Griffith & P. Modrich (1993).** "Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair." *Journal of Biological Chemistry* **268(16)**: 11830-7.
- Harfe, B. D. & S. Jinks-Robertson (2000).** "DNA mismatch repair and genetic instability." *Annu Rev Genet* **34**: 359-399.
- Hunter, W. N., T. Brown, G. Kneale, N. N. Anand, D. Rabinovich & O. Kennard (1987).** "The structure of guanosine-thymidine mismatches in B-DNA at 2,5 Å resolution." *J. Biol. Chem.* **262**: 9962-9970.
- Iaccarino, I., G. Marra, F. Palombo & J. Jiricny (1998).** "hMsh2 and hMsh6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α ." *Embo J* **17(9)**: 2677-86.
- Jiricny, J. (1998).** "Replication errors: challenging the genome." *EMBO J.* **17(22)**: 6427-36.
- Jiricny, J. (2000).** "Mismatch repair: the praying hands of fidelity." *Curr Biol* **10(21)**: R788-90.

- Jiricny, J. & G. Marra (2003).** "DNA repair defects in colon cancer." *Curr Opin Genet Dev* **13(1)**: 61-9.
- Joshi, A. & B. J. Rao (2002).** "ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex: a case for MutS treadmilling?" *Biochemistry* **41(11)**: 3654-66.
- Junop, M. S., G. Obmolova, K. Rausch, P. Hsieh & W. Yang (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.
- Kirsch, R. D. & 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.
- Kunkel, T. A. (1992).** "DNA replication fidelity." *J Biol Chem* **267(26)**: 18251-4.
- Kunkel, T. A. & K. Bebenek (2000).** "DNA replication fidelity." *Annu Rev Biochem* **69**: 497-529.
- Lahue, R. S., K. G. Au & P. Modrich (1989).** "DNA mismatch correction in a defined system." *Science* **245(4914)**: 160-164.
- Lahue, R. S., S. S. Su & P. Modrich (1987).** "Requirement for d(GATC) sequences in Escherichia coli mutHLS mismatch correction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84(6)**: 1482-6.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind & T. K. Sixma (2000).** "The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch." *Nature* **407(6805)**: 711-717.
- LeClerc, J. E., B. Li, W. L. Payne & T. A. Cebula (1996).** "High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens." *Science* **274(5290)**: 1208-11.
- Malkov, V. A., I. Biswas, R. D. Camerini-Otero & P. Hsieh (1997).** "Photocross-linking of the NH₂-terminal region of Taq MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA." *Journal of Biological Chemistry* **272(38)**: 23811-7.
- Marra, G. & P. Schär (1999).** "Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system." *Biochem J* **338(Pt 1)**: 1-13.
- Mechanic, L. E., B. A. Frankel & S. W. Matson (2000).** "Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA." *J Biol Chem*.
- Modrich, P. (1987).** "DNA mismatch correction." *Annual Review of Biochemistry* **56**: 435-66.
- Modrich, P. (1991).** "Mechanisms and biological effects of mismatch repair." *Annu Rev Genet* **25**: 229-253.
- Modrich, P. (1994).** "Mismatch repair, genetic stability, and cancer." *Science* **266(5193)**: 1959-60.
- Modrich, P. (1997).** "Strand-specific mismatch repair in mammalian cells." *Journal of Biological Chemistry* **272(40)**: 24727-30.
- Modrich, P. & R. Lahue (1996).** "Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology." *Annual Review of Biochemistry* **65**: 101-133.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona (1987).** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Obmolova, G., C. Ban, P. Hsieh & W. Yang (2000).** "Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA." *Nature* **407(6805)**: 703-710.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley & T. Gray (1995).** "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Sci* **4(11)**: 2411-2423.
- Pingoud, A. & C. Urbanke (1997). *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Berlin, de Gruyter.

- Pingoud, V., C. Conzelmann, S. Kinzebach, A. Sudina, V. Metelev, E. Kubareva, J. M. Bujnicki, R. Lurz, G. Luder, S. Y. Xu & A. Pingoud (2003).** "PspGI, a type II restriction endonuclease from the extreme thermophile *Pyrococcus* sp.: structural and functional studies to investigate an evolutionary relationship with several mesophilic restriction enzymes." *J Mol Biol* **329(5)**: 913-29.
- Pingoud, V., E. Kubareva, G. Stengel, P. Friedhoff, J. M. Bujnicki, C. Urbanke, A. Sudina & A. Pingoud (2002).** "Evolutionary relationship between different subgroups of restriction endonucleases." *J Biol Chem* **277(16)**: 14306-14.
- Sancar, A. & J. E. Hearst (1993).** "Molecular matchmakers." *Science* **259(5100)**: 1415-20.
- Schofield, M. J., S. Nayak, T. H. Scott, C. Du & P. Hsieh (2001).** "Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch." *J Biol Chem* **276(30)**: 28291-9.
- Seidman, M. M. & P. M. Glazer (2003).** "The potential for gene repair via triple helix formation." *J Clin Invest* **112(4)**: 487-94.
- Smith, J. & P. Modrich (1996).** "Mutation detection with MutH, MutL, and MutS mismatch repair proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(9)**: 4374-9.
- Spampinato, C. & P. Modrich (2000).** "The MutL ATPase Is Required for Mismatch Repair." *J. Biol. Chem.* **275(13)**: 9861-9869.
- Strick, T., J. Allemand, V. Croquette & D. Bensimon (2000).** "Twisting and stretching single DNA molecules." *Prog Biophys Mol Biol* **74(1-2)**: 115-40.
- Thomas, E., A. Pingoud & P. Friedhoff (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.
- Toedt, G., R. Krishnan & P. Friedhoff (2003).** "Site-specific protein modification to identify the MutL interface of MutH." *Nucleic Acids Res* **31(3)**: 819-825.
- Viswanathan, M. & S. T. Lovett (1999).** "Exonuclease X of *Escherichia coli*. A novel 3'-5' DNase and Dnaq superfamily member involved in DNA repair." *J Biol Chem* **274(42)**: 30094-100.
- Wang, H. & J. B. Hays (2004).** "Signaling from DNA mispairs to mismatch-repair excision sites despite intervening blockades." *Embo J* **23(10)**: 2126-33.
- Willis, M. C., B. J. Hicke, O. C. Uhlenbeck, T. R. Cech & T. H. Koch (1993).** "Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins." *Science* **262(5137)**: 1255-7.
- Wu, T. H., T. Loh & M. G. Marinus (2002).** "The function of Asp70, Glu77 and Lys79 in the *Escherichia coli* MutH protein." *Nucleic Acids Res* **30(3)**: 818-822.
- Viswanathan, M. & S. T. Lovett (1999).** "Exonuclease X of *Escherichia coli*. A novel 3'-5' DNase and Dnaq superfamily member involved in DNA repair." *J Biol Chem* **274(42)**: 30094-100.
- Wu, T. H., T. Loh & M. G. Marinus (2002).** "The function of Asp70, Glu77 and Lys79 in the *Escherichia coli* MutH protein." *Nucleic Acids Res* **30(3)**: 818-822.