

Biochemische Charakterisierung der Helikasen AtRECQ2 und AtRECQ3 von *Arabidopsis thaliana*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biotechnologin Daniela Kobbe

aus Karlsruhe, Deutschland

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter
Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2008

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Puchta danken, der mich „von der unbekanntem Welt außerhalb der Universität Karlsruhe“ in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Ich bin sehr dankbar für die Möglichkeiten, die er mir eröffnet hat. Das war zunächst die Möglichkeit ein überaus interessantes und anspruchsvolles Thema zu bearbeiten, und ich bedanke mich für die vielen Strategiediskussionen und die erlebte Begeisterung über die gewonnenen Daten. Zum anderen durfte ich von Beginn an, an der Ausbildung von Biologielaboranten und Diplomanden mitwirken. Ich bedanke mich nicht nur für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit diese Fertigkeiten zu üben, sondern auch für die dadurch erhaltene Unterstützung. Außerdem bedanke ich mich für die Einblicke in die (Universitäts)politik und die Möglichkeit, durch die Mitarbeit im Rahmen des CFN-Projekts C5, meinen Horizont zu erweitern. Schließlich möchte ich mich für die Lehreinheit „Verkaufsaspekte in der Wissenschaft“ bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Tilman Lamparter bedanke ich mich für die Übernahme der Aufgabe des Korreferenten.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Manfred Focke. Sein riesiger Wissensschatz, seine hervorragenden Ideen, seine Hilfsbereitschaft und einfach seine Art, machen ihn nicht nur zu einem Vorbild, sondern kamen mir v.a. in der Anfangsphase meiner Doktorarbeit sehr zu Gute. Auch möchte ich mich herzlich für das Korrekturlesen dieses Manuskripts bedanken.

Weiterhin möchte ich Frau Dipl. Biol. Sandra Blanck und Frau Katharina Demand für die hervorragende Zusammenarbeit während ihrer Diplom- bzw. Staatsexamensarbeit danken, die der vorliegenden Arbeit zu Gute kamen, und dafür, dass sie auch weiterhin immer für fachliche und persönliche Gespräche und Diskussionen da waren (und hoffentlich auch sind).

Für die exzellente technische Unterstützung und die gute Atmosphäre möchte ich mich bei der Biologielaborantin Frau Sabrina Hettinger und der Biologielaboranten-Auszubildenden Frau Carina Moock herzlich bedanken. Weiterhin ein Dankeschön an die Biologielaboranten-Auszubildende Frau Marion Förschle für das „Tip-Top-Halten“ des Biochemielabors, ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit, die zu einer guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Auch Frau Renate Kirchenbauer möchte ich für ihre Unterstützung bei der Insektenzellkultur zu Beginn meiner Doktorarbeit danken.

Frau Dipl. Biotech. Céline Be und Herrn Shaun Lampi bin ich dankbar für ihre Einbringung bei der Korrektur des Résumés bzw. der Summary.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Frank Hartung für fruchtbare Diskussionen und bei Herrn Dipl. Biol. Alexander Knoll für das überaus erfolgreiche Projektpraktikum und darüber hinausgehenden Input bedanken.

Auch allen anderen wissenschaftlichen und technischen Kräften des Lehrstuhls Botanik II, v.a. Frau Dipl. Biol. Verena Geuting und Frau Dipl. Biol. Karin Fengler, sowie unseren Computer-HiWis Herrn Francois Blassmann und Herrn Florian Faion, sei gedankt für die gute Atmosphäre und den reibungslosen Ablauf.

Herrn Dipl. Ing. Herbert Paus aus der Abteilung für Arbeitssicherheit und Umweltschutz danke ich für die gute Kooperation im Strahlenschutz und für die Möglichkeit am, zur Erlangung der Fachkunde im Strahlenschutz nötigen, Kurs teilzunehmen.

Herrn Dipl. Wi.-Ing. Thomas Gottfried gebührt nicht nur Dank für das Schreiben des Computerprogramms „pipett“, das mir die Arbeit erleichterte, sondern auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die Verarbeitung des täglichen Geschehens im Labor im Gespräch und natürlich für die Motivation im Falle von Frustrationen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für die Unterstützung danken. Vor allem Frau Dipl. Biol. Tina Bergmann und Frau Dipl. Biol. Stephanie van Venrooy bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mich auf die Doktorandenstelle in der Botanik II aufmerksam gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Danksagung | II |
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | VIII |
| Tabellenverzeichnis | XI |
| Abkürzungsverzeichnis | XII |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Wege der Funktionsaufklärung | 2 |
| 1.2. Strukturelle Organisation der RECQ-Helikasen | 4 |
| 1.2.1. Struktur des Prototyps der RecQ-Helikasen: EcRECQ..... | 4 |
| 1.2.2. RecQ-Homologe in anderen Organismen, speziell auch in Arabidopsis | 4 |
| 1.3. Ausgewählte RecQ-Homologe und ihre Funktionen | 7 |
| 1.3.1. Die RecQ-Helikase von <i>E. coli</i> | 7 |
| 1.3.2. Die RecQ-Helikase von <i>S. cerevisiae</i> (ScSGS1) | 10 |
| 1.3.3. Die menschlichen RecQ-Helikasen..... | 13 |
| 1.4. Spezies-übergreifende Zuordnung funktioneller Homologe..... | 19 |
| 1.4.1. Bedeutung von Komplementationsstudien..... | 19 |
| 1.4.2. Bedeutung des Interaktoms | 20 |
| 1.5. Analyse der RecQ-Helikasen von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 21 |
| 1.5.1. Gründe für die Analyse von AtRecQ-Helikasen..... | 21 |
| 1.5.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> als Modellorganismus | 22 |
| 1.5.3. Veröffentlichte Daten über AtRecQ-Helikasen | 23 |
| 1.6. Biochemische Charakterisierung von RECQ-Helikasen..... | 24 |
| 1.6.1. Bedeutung der Biochemie | 24 |
| 1.6.2. Mögliche Vorgehensweisen für die Gewinnung des Zielproteins | 25 |
| 1.6.3. Grundlegende biochemische Charakterisierung..... | 25 |
| 1.6.4. Substrate für RECQ-Helikasen | 26 |
| 2. Zielsetzung | 27 |
| 3. Material und Methoden | 28 |
| 3.1. Material | 28 |
| 3.1.1. <i>Escherichia coli</i> Stämme | 28 |
| 3.1.2. Plasmide | 28 |
| 3.1.3. Oligonukleotide..... | 29 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.1.3.1. | Primer für die Klonierungen und Sequenzierungen..... | 29 |
| 3.1.3.2. | Oligonukleotide für ATPase- und Helikase-Assays..... | 30 |
| 3.1.4. | Ausgewählte Chemikalien..... | 31 |
| 3.1.5. | Marker, Enzyme und Kits | 32 |
| 3.1.6. | Ausgewähltes Verbrauchsmaterial..... | 33 |
| 3.1.7. | Ausgewählte Geräte und Software..... | 33 |
| 3.1.8. | Medien, Puffer und Lösungen..... | 34 |
| 3.2. | Methoden..... | 37 |
| 3.2.1. | Klonierungen..... | 37 |
| 3.2.2. | Herstellung von M13mp18 ssDNA..... | 41 |
| 3.2.3. | Expression und Protein-Aufreinigungen..... | 41 |
| 3.2.3.1. | Expression | 41 |
| 3.2.3.2. | Aufreinigung | 42 |
| 3.2.3.3. | Proteinquantifizierung und –lagerung..... | 44 |
| 3.2.3.4. | SDS-PAGE und Western-Blots..... | 44 |
| 3.2.4. | ATPase Assay | 45 |
| 3.2.5. | Helikase-Assay..... | 45 |
| 3.2.5.1. | Prinzip | 45 |
| 3.2.5.2. | Herstellung der DNA-Substrate für den Helikase-Assay..... | 47 |
| 3.2.5.3. | Quantifizierung der DNA-Substrate für den Helikase Assay | 48 |
| 3.2.5.4. | Durchführung und Auswertung des Helikase-Assays..... | 50 |
| 4. | Ergebnisse | 52 |
| 4.1. | Klonierung der verwendeten Konstrukte | 52 |
| 4.2. | Expressionsoptimierung..... | 54 |
| 4.2.1. | Expressionsoptimierung AtRECQ3 | 54 |
| 4.2.2. | Expressionsoptimierung AtRECQ2 | 55 |
| 4.3. | Optimierung der Aufreinigungen..... | 56 |
| 4.3.1. | Aufreinigung von AtRECQ3..... | 56 |
| 4.3.1.1. | Aufreinigung von AtRECQ3 mit CBP-Tag..... | 56 |
| 4.3.1.2. | Aufreinigung von AtRECQ3 über Ni-IMAC..... | 58 |
| 4.3.2. | Aufreinigung von AtRECQ2..... | 60 |
| 4.3.3. | Aufreinigung von EcRECQ | 61 |
| 4.4. | Nachweis der Helikase-Aktivität | 61 |
| 4.5. | Quantifizierung der verwendeten Proteinproben | 63 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.6. | Nachweis und Analyse der ATPase-Aktivität..... | 64 |
| 4.7. | Grundlegende biochemische Analysen | 65 |
| 4.7.1. | pH-Optimum | 66 |
| 4.7.2. | Optimum der Konzentration einwertiger Kationen (Salze) | 66 |
| 4.7.3. | Zweiwertige Metall-Cofaktoren..... | 67 |
| 4.7.4. | Nukleosidtriphosphat (NTP)-Cosubstrate | 68 |
| 4.7.5. | Direktionalität..... | 69 |
| 4.8. | Einfluss der Länge des Duplexbereichs auf die Entwindung..... | 70 |
| 4.9. | Einfluss der freien Magnesiumionen-Konzentration auf die Strangentwindungsaktivität..... | 71 |
| 4.10. | Anforderungen an den 3' Überhang bei einem partiellen Duplex | 72 |
| 4.11. | Umsatz verschiedener D-Loop-Strukturen..... | 73 |
| 4.12. | Umsatz einer partiell mobilen Holliday-Junction | 77 |
| 4.13. | Umsatz einer Modell-Replikationsgabel..... | 80 |
| 5. | Diskussion | 84 |
| 5.1. | Klonierung, Expression und Aufreinigung von AtRECQ2 und AtRECQ3 | 85 |
| 5.1.1. | Optimierung der Expression..... | 85 |
| 5.1.2. | Tags, Aufreinigung & Bedeutung von Konstrukten mit eingeführten Mutationen im Walker A Motiv | 87 |
| 5.2. | Klonierung, Expression und Aufreinigung von EcRECQ | 92 |
| 5.3. | Einordnung der untersuchten biochemischen Aktivitäten von AtRECQ2 und AtRECQ3 | 93 |
| 5.3.1. | Reaktionsoptima..... | 93 |
| 5.3.2. | Zweiwertige Metall-Cofaktoren (Me^{2+})..... | 94 |
| 5.3.3. | ATPase-Aktivität..... | 94 |
| 5.3.4. | Nukleosidtriphosphat (NTP)-Cosubstrate | 96 |
| 5.3.5. | Direktionalität..... | 96 |
| 5.3.6. | Verhältnis von Enzym zu Substrat..... | 96 |
| 5.3.7. | Umsatz von partieller Duplex-DNA | 98 |
| 5.3.8. | Umsatz verschiedener D-Loop Strukturen..... | 100 |
| 5.3.9. | Umsatz einer partiell mobilen Holliday-Junction | 103 |
| 5.3.10. | Umsatz einer Modell-Replikationsgabel..... | 105 |
| 5.3.11. | Bedeutung der Mg^{2+} -Konzentration in der Reaktion | 107 |
| 5.4. | Schlussfolgerungen | 108 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| 6. Ausblick..... | 109 |
| 7. Zusammenfassung..... | 110 |
| 8. Summary | 112 |
| 9. Résumé | 114 |
| 10. Referenzen..... | 116 |
| Erklärung..... | 126 |
| Lebenslauf..... | 127 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Mögliche Vorgehensweise zur Analyse der Funktion eines Gens/Proteins (Reverse Genetik)..... | 3 |
| Abbildung 2: Schematische Struktur des Prototyps der RecQ-Helikasen: EcRECQ. | 4 |
| Abbildung 3: Struktur ausgewählter RECQ-Proteine. | 6 |
| Abbildung 4: Initiation der Rekombination durch RECQ-Helikasen. | 7 |
| Abbildung 5: Induktion der SOS-Antwort durch RECQ-Helikasen an arretierten Replikationsgabeln..... | 8 |
| Abbildung 6: RECQ als Anti-Rekombinase. | 8 |
| Abbildung 7: Auflösung von Doppel-Holliday-Junctions durch RECQ. | 9 |
| Abbildung 8: RECQ-Helikasen als Pflug, für die Beseitigung von DNA-Blockaden vor der Replikationsmaschinerie, hier am Beispiel eines Quadruplex..... | 9 |
| Abbildung 9: Mögliche Funktionen des RECQ-Homologs SGS1 an arretierten Replikationsgabeln..... | 11 |
| Abbildung 10: Telomer-Erhalt durch RECQ-Helikasen..... | 16 |
| Abbildung 11: Auflösung eines präsynaptischen RAD51-Filaments durch Helikasen (HsBLM, HsRECQ5, ScSRS2)..... | 17 |
| Abbildung 12: Overlap-Extension-PCR zur Einführung von Punktmutationen..... | 38 |
| Abbildung 13: LIC mit pCAL-n-FLAG-c-HIS..... | 39 |
| Abbildung 14: Überblick und schematische Darstellung der verschiedenen Schritte, die im Rahmen des Helikase-Assays notwendig sind..... | 46 |
| Abbildung 15: Einfluss verschiedener Expressionsbedingungen auf die Ausbeute an löslichem AtRECQ2..... | 56 |
| Abbildung 16: Einfluss verschiedener Zusätze im Waschpuffer bei der CAC von AtRECQ3. | 57 |
| Abbildung 17: Einfluss der Kombination von EGTA und NaCl auf die Calmodulin Affinitätschromatographie mit AtRECQ3. | 58 |
| Abbildung 18: Reinigungserfolg von AtRECQ3 bzw. AtRECQ3-K64M über CAC und Ni-IMAC..... | 59 |
| Abbildung 19: Erfolg der AtRECQ-Aufreinigungen im Hinblick auf kontaminierende Enzymaktivitäten..... | 62 |
| Abbildung 20: Quantifizierung von EcRECQ, AtRECQ2 und AtRECQ3..... | 64 |
| Abbildung 21: ATPase Aktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3. | 65 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 22: Einfluss des pH-Werts und der Puffersubstanz auf die Strangentwindungsaktivität..... | 66 |
| Abbildung 23: Einfluss der Kalium-Acetat Konzentration auf die Strangentwindungs-Aktivität..... | 67 |
| Abbildung 24: ATP-Hydrolyse und DNA-Strangentwindung durch AtRECQ2 und AtRECQ3 in Gegenwart verschiedener Metallcofaktoren..... | 67 |
| Abbildung 25: Verwendung verschiedener Nukleosidtriphosphate als Energiequelle für die AtRECQ2- bzw. AtRECQ3-katalysierte DNA-Strang-Entwindung. | 68 |
| Abbildung 26: Direktionalität von AtRECQ2 – 23 bp-Substrat. | 69 |
| Abbildung 27: Direktionalität von AtRECQ2 und AtRECQ3 – 15 bp-Substrat..... | 69 |
| Abbildung 28: Einfluss der Länge des Duplexbereichs auf die Entwindungsaktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3. | 70 |
| Abbildung 29: Verschiedene Darstellungen des Umsatzes eines M13-basierten partiellen Duplexsubstrats bei verschiedenen ATP und Mg ²⁺ -Konzentrationen. | 71 |
| Abbildung 30: Abhängigkeit des Umsatzes verschiedener DNA-Strukturen von der freien Mg ²⁺ -Konzentration. | 72 |
| Abbildung 31: Abhängigkeit des Umsatzes eines partiellen Duplex-DNA-Substrats von der Länge des 3' Überhangs..... | 73 |
| Abbildung 32: Umsatz von verschiedenen D-Loop-Strukturen (mit Markierung des eindringenden Strangs) und einer Bubble-Struktur in Abhängigkeit der AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 Konzentration..... | 74 |
| Abbildung 33: AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 katalysierter Umsatz verschiedener D-Loop Strukturen mit markierten eindringenden Strängen und einer Bubble-Struktur als Funktion der Zeit. | 75 |
| Abbildung 34: AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 katalysierter Umsatz verschiedener D-Loop-Strukturen und einer Bubble-Struktur mit Markierung der Bubble-Struktur als Funktion der Zeit. | 76 |
| Abbildung 35: Schematische Darstellung der X12-HJ. | 78 |
| Abbildung 36: Umsatz der X12-HJ durch AtRECQ2 in Abhängigkeit der Enzymkonzentration. | 78 |
| Abbildung 37: Umsatz der X12-HJ durch AtRECQ2 als Funktion der Zeit. | 79 |
| Abbildung 38: Inkubation von AtRECQ3 mit der X12-HJ..... | 79 |
| Abbildung 39: Schema der verwendeten Replikationsgabel und mögliche Reaktionen. | 80 |
| Abbildung 40: Replikationsgabel-Regression durch AtRECQ2..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 41: Vergleich des Umsatzes der Replikationsgabel durch AtRECQ2 und AtRECQ3..... | 82 |
| Abbildung 42: Schematische Darstellung der Funktionsweise von aktiven und passiven Helikasen..... | 98 |
| Abbildung 43: Darstellung der wichtigsten Doppelstrangbruchreparatur-Modelle..... | 101 |
| Abbildung 44: Modell der Branch Migration in dieser Arbeit und durch den RuvAB-Komplex..... | 103 |
| Abbildung 45: Erweiterte Darstellung der möglichen Reaktionen an der Modell-Replikationsgabel..... | 107 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Merkmale von Erbkrankheiten, die durch Mutationen von RecQ-Helikasen ausgelöst werden..... | 13 |
| Tabelle 2: Interaktionspartner von RECQ-Helikasen. | 21 |
| Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit für Helikase-Assays verwendeten Oligonukleotide. | 30 |
| Tabelle 4: Expressionsbedingungen für AtRECQ2, AtRECQ3 und EcRECQ..... | 42 |
| Tabelle 5: Vorgehen bei der Standardaufreinigung von AtRECQ2, AtRECQ3 und EcRECQ. | 42 |
| Tabelle 6: Herstellung verschiedener DNA-Substrate. | 47 |
| Tabelle 7: Konstrukte. | 52 |
| Tabelle 8: Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt der aufgereinigten und charakterisierten Proteine. | 53 |
| Tabelle 9: Zusammensetzung der Duplexbereiche der 3' Überhangssubstrate (3' ÜS) und dem M13-basierten Standardsubstrat (M13-PD) (A und T- vs. G und C-Gehalt) | 70 |
| Tabelle 10: Qualität der verwendeten D-Loop-Strukturen in dieser Arbeit (bezogen auf Intaktheit zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit im Ansatz ohne Enzym)..... | 77 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Ac | Acetat (CH ₃ COO ⁻) |
| At | Arabidopsis thaliana |
| BER | Basen-Excisions-Reparatur |
| bp | Basenpaar |
| BRI | Bimolekulare Rekombinationsintermediate |
| BS | Bloom's Syndrom |
| CAC | Calmodulin-Affinitätschromatographie |
| CBP | Calmodulin-Bindepeptid |
| dHJ | doppelte Holliday-Junction |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| DSBR | Doppelstrangbruch-Reparatur |
| Ec | Escherichia coli |
| HJ | Holliday Junction |
| HR | Homologe Rekombination |
| HRDC | Helicase and RNase D C-terminal |
| Hs | Homo sapiens |
| HU | hydroxyurea – Hydroxyharnstoff |
| IDA | Immino-di-Essigsäure |
| IMAC | Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography |
| K | Lysin |
| LF | Lösliche Fraktion / Ladefraktion |
| LIC | Ligation Independent Cloning |
| LSC | Liquid Scintillation Counter = Liquid Scintillation Analyzer |
| NER | Nukleotid-Excisions-Reparatur |
| NHEJ | Nonhomologous endjoining – Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung |
| nt | Nukleotid |
| M | Methionin |
| Me ²⁺ | zweiwertige Metalle z.B. Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , ... |
| Mm | Mus musculus (Maus) |
| MMC | Mitomycin C |
| MMR | Mismatch Reparatur |
| MMS | Methyl-Methan-Sulfonat |
| NTA | Nitrilo-tri-Essigsäure |

| | |
|------|--|
| ORF | Open reading frame (offener Leserahmen) |
| PNK | Polynukleotidkinase |
| RPA | Replication Protein A (SSB-Homolog der Eukaryoten) |
| RT | Raumtemperatur |
| RTS | Rothmund-Thomson-Syndrom |
| Sc | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SCE | Sister Chromatid Exchange (Austausch des Erbmaterials zwischen Schwesterchromatiden) |
| SDSA | Synthesis Dependent Strand Annealing |
| SDA | Strand Displacement Assay |
| SSB | Single Strand Binding Protein |
| UBA | Ubiquitin associated |
| TLD | thymineless death (Zelltod bei Thymin-Mangel bei thyminauxotrophen Organismen, bzw. Thymidin Nachschub Mangel) |
| WH | Winged Helix |
| Zn | Zink |

1. Einleitung

Der Erhalt der genomischen Stabilität ist für das Überleben jeder Zelle notwendig. Natürlich ist sie auch für den Gesamtorganismus essentiell, gerade im Hinblick auf die Weitergabe der genetischen Information zum Erhalt der Art. Für viele DNA-Schäden, die generell endo- oder exogenen Ursprungs sein können, hat die Zelle daher spezialisierte Reparaturwege. Beispielfhaft seien an dieser Stelle die Basen-Excisions-Reparatur (BER), die Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER), die Mismatch-Reparatur (MMR), sowie für Strangbrüche die Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ - non-homologous endjoining) und die homologe Rekombination (HR) genannt.

Für den Menschen ist jedoch das Überleben maligner Krebszellen nicht wünschenswert. Ein Angriffspunkt der Krebstherapie ist hier tatsächlich die Induktion von Genom-Instabilität. Dies erreicht man z.B. über die Chemotherapie-Agenzien Methotrexate oder 5-Fluorouracil. Diese beiden Stoffe bewirken, dass die Synthese des Thymidin-Nachschubs unterdrückt wird. Hier kommt dann ein in der Biologie einzigartiges Phänomen zu tragen, das man Thymineless Death (TLD) nennt. Im Gegensatz zu anderen Nährstoffen oder Vitaminen, die bei einem zeitweiligen Fehlen das Wachstum zum Stillstand kommen lassen, löst das Fehlen des Thymidin-Nachschubs den Zelltod aus. Der TLD ist ein komplizierter, leider bisher noch nicht vollständig verstandener Prozess (Ahmad *et al.*, 1998). Im Allgemeinen kommt es zu induzierten Veränderungen des Zellstoffwechsels und damit verbunden zu spezifischen DNA-Schäden, wie zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, sowie zu einer Akkumulierung von Y- und X-förmigen Strukturen und längeren Einzelstrangbereichen (Nakayama *et al.*, 1994). Vermutlich sind diese irreparablen DNA-Schäden für den Zelltod verantwortlich (selbst wenn wieder Thymin zur Verfügung steht, kann sich die Zelle davon nicht erholen).

Das TLD-Phänomen kann besonders gut an Zellen analysiert werden, die Thymin nicht (mehr) selber synthetisieren können, sondern auf die äußere Zufuhr von Thymin angewiesen sind (Thymin-auxotrophe Zellen). Es ist zunächst nicht erstaunlich, dass der Entzug von Thymin bei Thymin-auxotrophen *E. coli* Zellen, die zusätzlich Mutationen in einem von vielen DNA-Replikations- oder Reparaturgenen haben (wie z.B. *polA*, *lig*, *uvrD*, *recBC* oder *rep*) drastischer ist (TLD-Hypersensitivität), als bei Thymin-auxotrophen Zellen ohne Mutation (Ahmad *et al.*, 1998).

Jedoch wurde interessanterweise im Jahr 1984 bei einem Screen nach Mutationen, die das TLD-Phänomen abmildern, in *E. coli* das *RECQ1*-Gen entdeckt (Nakayama *et al.*, 1984). *RECQ1*, auch als *RECQ* bezeichnet, wurde dem RecF-Rekombinationsweg zugeordnet.

Vermutlich trägt RECQ zum Entstehen der aberranten, „verwobenen“ Strukturen bei (Nakayama, 2005). Mittlerweile wurden in allen untersuchten Lebewesen RecQ-Homologe gefunden, die zusammen die RecQ-Familie bilden. Beim Menschen sind drei der fünf vorhandenen RecQ-Homologe mit Erbkrankheiten verknüpft. Bei Mutationen in *HsRECQ4* kommt es z.B. zum Rothmund-Thomson-Syndrom, sind die RecQ-Gene *HsWRN* oder *HsBLM* betroffen, leiden die entsprechenden Patienten unter Werner- bzw. Bloom's-Syndrom. Bei allen diesen Krankheiten ist die Stabilität des Genoms reduziert, was man u.a. am Auftreten von Krebs erkennen kann. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* hat sogar sieben Vertreter der RecQ-Familie. In dieser Arbeit werden zwei dieser Vertreter biochemisch analysiert. Auf den folgenden Seiten soll beispielhaft aufgezeigt werden, was über die Funktion von verschiedenen RecQ-Homologen bekannt ist. Dabei wird die außerordentliche Bedeutung der RecQ-Homologe für den Organismus deutlich. Außerdem wird gezeigt, warum die RecQ-Homologe aus Pflanzen besondere Beachtung verdient haben und welche Möglichkeiten die biochemische Charakterisierung bietet.

1.1. Wege der Funktionsaufklärung

Ausgangspunkt für die Entdeckung des ersten RecQ-Gens war eine Zufalls-Mutagenese von Thymin-auxotrophen *E. coli*-Zellen. Diesen wurde anschließend mehrfach Thymin entzogen. Zellen, die das überlebten, waren durch die Mutagenese TLD insensitiv geworden. Durch genetische Analysen gelang schließlich das sogenannte „Mapping“, das Kartieren des verantwortlichen Gens (Nakayama *et al.*, 1984). Diese „vom Phän zum Gen“-Strategie wird heutzutage durch die Sequenzierung zahlreicher Genome oft von der reversen Genetik abgelöst, wo man, wie in dieser Arbeit auch, gezielt die Frage stellt: welche Funktion hat dieses Gen?

Abbildung 1 zeigt beispielhaft auf, welche Möglichkeiten sich nach der Identifikation eines Zielgens bzw. -proteins ergeben, um die Funktion aufzuschlüsseln. Ein wichtiger Aspekt ist die vergleichende Analyse des Gens/Proteins in nativer Form mit dem Gen/Protein mit eingefügten Punktmutationen, größeren Deletionen und ähnlichem, v.a. in der *in vivo*-Analytik. Versucht man die Funktion über den Mechanismus eines Proteins zu verstehen, spielen v.a. die Biochemie und die Strukturauflösung eine große Rolle.

Häufig gibt es auch Informationen über Homologe in anderen Organismen, was zum einen oft einen Anhaltspunkt für die Funktion gibt. Zum anderen, können sich jedoch, gerade wenn es sich um größere Proteinfamilien handelt, funktionelle Verschiebungen ergeben haben, was

wiederum dazu führt, dass die Evolution der Proteine analysiert werden kann (siehe auch Kapitel 1.4).

Am umfassendsten kann man ein Gen/Protein verstehen, wenn Aspekte aus allen Bereichen analysiert werden. Um den Rahmen dieser Einleitung nicht zu sprengen, können nicht alle Informationen, die über RecQ-Proteine, genauer RecQ-Helikasen, bekannt sind, dargestellt werden. Begonnen werden soll jedoch mit einigen Erkenntnissen aus u.a. der Bioinformatik.

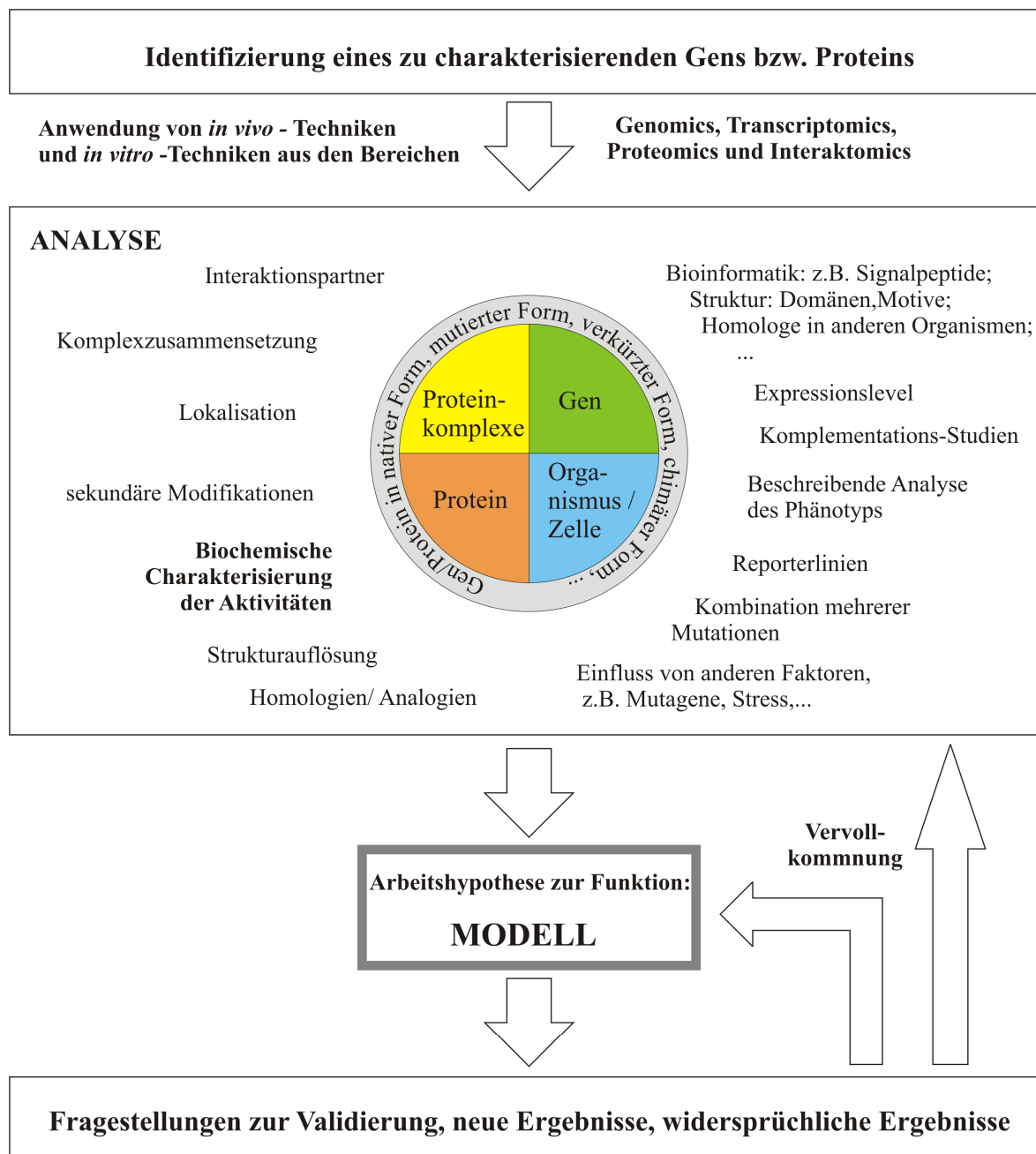


Abbildung 1: Mögliche Vorgehensweise zur Analyse der Funktion eines Gens/Proteins (Reverse Genetik). Zur Modellbildung sollten Aspekte der *in vivo* Funktionsanalysen auf Zell- bzw. Organismusebene genauso in Betracht gezogen werden, wie *in vitro* Analysen auf Gen-, Protein- und Proteinkomplex-Ebene. Dazu ist es oft notwendig, native und veränderte Formen zu vergleichen.

1.2. Strukturelle Organisation der RECQ-Helikasen

1.2.1. Struktur des Prototyps der RecQ-Helikasen: EcRECQ

Durch eine Vielzahl von charakterisierten Proteinen und Genen war es möglich Algorithmen zu entwickeln, die Domänen und Motive definieren. Die schematische Struktur von EcRECQ ist in Abbildung 2 gezeigt.

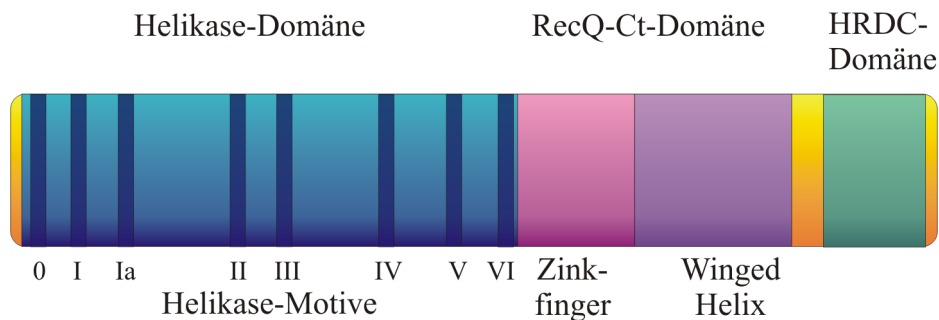


Abbildung 2: Schematische Struktur des Prototyps der RecQ-Helikasen: EcRECQ.

EcRECQ weist drei Domänen auf: die (eigentlich aus 2 strukturellen Subdomänen bestehende) Helikasedomäne mit den Helikase-Motiven, die RecQ-Ct-Domäne und die HRDC (Helicase and RNaseD C-terminal)-Domäne. Die RecQ-Ct-Domäne setzt sich aus einem speziellen Zinkfinger und einer Winged Helix (WH) (einer Helix-Turn-Helix-Struktur) zusammen. Die Funktionen der einzelnen Domänen werden im nächsten Abschnitt kurz angerissen.

1.2.2. RecQ-Homologe in anderen Organismen, speziell auch in Arabidopsis

Ausgehend von der EcRECQ-Helikase-Domäne wurden mit Hilfe der Bioinformatik Homologe in anderen Organismen identifiziert bzw. zugeordnet. RecQ-Homologe konnten in allen bisher daraufhin analysierten Lebewesen, und damit auch in allen Reichen des Lebens, gefunden werden. Dabei ist in unizellulären Organismen meist nur ein Homolog zu finden, wohingegen die Anzahl der Homologe in mehrzelligen Organismen variiert. Abbildung 3 zeigt die RecQ-Homologe von *E. coli*, *S. cerevisiae* (SGS1), dem Menschen und der Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana*. Neben der Tatsache, dass die Organismen eine unterschiedliche Anzahl von RecQ-Homologen aufweisen, haben diese unterschiedliche Proteingrößen, unterschiedliche Domänen-Zusammenstellungen und zum Teil alleinstellende Motive.

Zunächst werden die Funktionen der gemeinsamen Domänen kurz erläutert. Details hierzu sind in einem Review von Killoran und Keck, 2006 zusammengefasst.

Die Helikase-Domäne ist in die Kopplung der NTP-Hydrolyse mit der DNA-Doppelstrang-Entwindung involviert. Motiv 0 (Bernstein und Keck, 2003) ist RecQ-spezifisch und interagiert mit dem NTP. Weiterhin ist für diese Arbeit das Helikase-Motiv I, auch Walker A Motiv genannt, wichtig. Dieses trägt zur ATP-Bindung und Hydrolyse bei, speziell ein konserviertes Lysin. Genauere Informationen zu den Helikase-Motiven können z.B. auch bei Tuteja und Tuteja, 2004 gefunden werden.

Der RecQ-Ct-Domäne, aufgebaut aus dem RecQ-spezifischen Zink-Finger (Bernstein *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004) und der Winged Helix, werden Protein-Protein-Interaktionen und struktur-spezifische DNA-Interaktionen zugesprochen. Dieses gilt auch für die HRDC-Domäne.

Neben EcRECQ und ScSGS1 besitzen auch HsWRN, HsBLM sowie auf Pflanzenseite AtRECQ2, AtRECQ4A und AtRECQ4B den kompletten „typischen“ Domänensatz aus diesen drei Domänen (Helikase-, RecQ-Ct- und HRDC-Domäne). Vielen anderen Vertretern fehlt die HRDC-Domäne oder auch die RecQ-Ct-Domäne ist nicht oder nicht vollständig zu finden. Die unterschiedliche Domänenzusammenstellung von AtRECQ2 und AtRECQ3 ist ein Grund, die beiden in dieser Arbeit vergleichend zu analysieren.

Das menschliche WRN-Protein hebt sich durch eine (funktionelle) Exonuklease-Domäne hervor. Interessanterweise konnte im Genom von *Arabidopsis* ein zu dieser Domäne homologes Protein gefunden werden: AtWRNexo (Hartung *et al.*, 2000), das auch in Abbildung 3 dargestellt ist.

AtRECQ4A und AtRECQ4B sind zu 70 % identisch, sogar auf DNA-Ebene. Die beiden entsprechenden Gene gibt es nur bei den Dikotyledonen und unterscheiden sich in ihrer biologischen Funktion (Kapitel 1.5.3). Nur in AtRECQ4A ist ein EF-Hand-Motiv zu finden.

Die pflanzliche RecQ-Helikasen-Familie weist noch einen weiteren Vertreter mit Besonderheit auf: AtRECQsim, bei dem zwischen den beiden Subdomänen der Helikase-Domäne ein etwa 100 Aminosäuren langer Einschub mit einem hohen Anteil saurer Aminosäuren zu finden ist. Der Einfluss dieser Insertion auf die Helikase-Aktivität ist bisher noch nicht geklärt. Am N-Terminus findet man eine Homologie zu einer Ubiquitin-assoziierten Domäne. Dies ist ein Motiv einer Vielzahl von Proteinfamilien. Vertreter dieser Familien spielen nicht nur bei der Protein-Degradation, sondern auch bei der Zellzyklus-Kontrolle und der DNA-Reparatur eine Rolle (Mueller *et al.*, 2004).

Neben der schematischen Struktur konnte auch die Protein-Struktur von einigen RecQ-Helikasen gelöst werden. Dazu gehören z.B. der Zentralkomplex aus Helikase- und RecQ-Ct-Domäne von EcRECQ (Bernstein *et al.*, 2003), sowie die komplette Struktur von HsRECQ1

(PDB 2V1X) (Pike *et al.*, noch nicht veröffentlicht). Die Struktur der HRDC-Domäne konnte für ScSGS1 (Liu *et al.*, 1999), EcRECQ (Bernstein und Keck, 2005) und HsWRN (Kitano *et al.*, 2007) gelöst werden, und auch die Struktur der WH-Subdomäne von HsWRN (Hu *et al.*, 2005a). Ebenso ist die Struktur der WRN-Exonuklease-Domäne von HsWRN (Perry *et al.*, 2006) und MmWRN (PDB 2E6L) (Cho und Choi, noch nicht veröffentlicht) beschrieben worden.



Abbildung 3: Struktur ausgewählter RECQ-Proteine.

Dargestellt ist die Domänenstruktur und ausgewählte Motive der RecQ-Homologe aus *Escherichia coli* (Ec), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Homo sapiens* (Hs) und *Arabidopsis thaliana* (At). Die zwei Subdomänen der RecQ-Ct-Domäne, Zn (Zink)-Finger und WH (Winged Helix) sind dargestellt. Für EcRECQ wurde die Größe des muren Proteins angegeben. Auf die Proteinsequenzen kann über die NCBI-Protein-Datenbank zugegriffen werden. Domänen wurden entweder über die ProDom-Einträge PD209099, PD215317, Pfam-Einträge oder manuell identifiziert. UBA – Ubiquitin-associated domain

1.3. Ausgewählte RecQ-Homologe und ihre Funktionen

Anhand verschiedenartiger Analysen (siehe Abbildung 1) wurden Funktionsmodelle für RecQ-Helikasen entwickelt, die im Folgenden für die RecQ-Homologe von *E. coli*, *S. cerevisiae* und für die des Menschen vorgestellt werden.

1.3.1. Die RecQ-Helikase von *E. coli*

EcRECQ ist das einzige RecQ-Homolog in *E. coli*, nach dem auch die RecQ-Familie benannt wurde. Es repräsentiert hier das Reich der Prokaryoten. Ein Ausfall des RecQ-Gens wird erst im Zusammenhang mit dem Ausfall anderer Gene, z.B. bei Zellen mit transduzierenden λ -Phagen und im Hinblick auf Stress-Situationen wie UV-Strahlung, deutlich.

Verschiedene Untersuchungen, auch die Biochemie (Harmon und Kowalczykowski, 1998), zeigten, dass EcRECQ bei der Rekombination entgegengesetzte Effekte katalysieren kann, die jedoch beide zum Erhalt eines stabilen Genoms beitragen können.

Einerseits kann EcRECQ die **Rekombination initiieren** (schematisch in Abbildung 4). Das ist v.a. in Zellen zu beobachten, in denen der Hauptweg der Rekombinationsinitiation, der RecBCD-Weg, ausgeschaltet ist und manifestiert sich z.B. in *recQ recBC sbcB* Stämmen durch eine Defizienz bei der bakteriellen Konjugation und durch erhöhte UV-Sensitivität (Nakayama *et al.*, 1984; Nakayama *et al.*, 1985). Magner *et al.*, 2007 beobachten die *in vivo* Netto-Akkumulation von bimolekularen Rekombinationsintermediaten (BRI) durch EcRECQ in *ruv uvrD* Zellen. Werden BRIs nicht aufgelöst, wie z.B. in *ruv* Zellen, kommt es zum Zelltod. Dies entspricht im Wesentlichen der „Bulk“-Erklärung von Nakayama, 2005 für das TLD-Phänomen, das in den einleitenden Sätzen beschrieben wurde.

Initiation der Rekombination

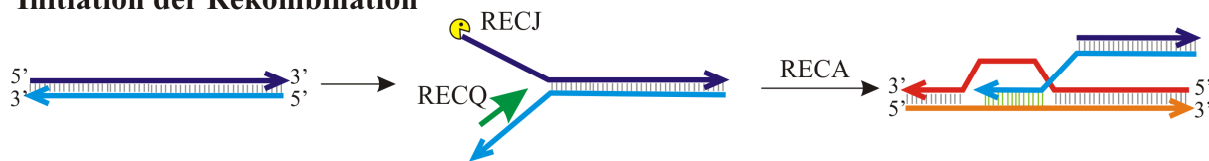


Abbildung 4: Initiation der Rekombination durch RECQ-Helikasen.

Bei einem Doppelstrangbruch (oder auch Lücken (gaps)) kann RECQ als 3'-5'-Helikase (durch dunkelgrünen Pfeil symbolisiert) die Stränge voneinander trennen. RECJ kann einen Strang vom 5' Ende abbauen, so dass ein Strang mit freiem 3' Ende entsteht, der, mit RECA beladen, in einen homologen Bereich invadieren kann. Dabei entsteht ein D-Loop (neu aufgebaute Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen sind grün markiert), der verschieden weiter prozessiert werden kann. Abbildung nach Heyer, 2004

Auch nach einem Modell von Magner *et al.*, 2007 ist EcRECQ in Zusammenarbeit mit RECJ, RECA aber auch RECFOR an der Initiation eines D-Loops beteiligt. Im Unterschied zum dargestellten Modell ist diese Initiation aber ausgehend von einer Replikationsgabel mit einer Läsion im parentalen Rückwärtsstrang.

Betrachtet man die Funktion von EcRECQ als Mit-Initiator der Rekombination genauer, so ist zu erkennen, dass es auf die jeweilige Situation der Zelle ankommt, ob diese Reaktion für die genomische Stabilität zu- oder abträglich ist.

Weiterhin wird EcRECQ eine Rolle bei der Induktion der **SOS-Antwort** zugeteilt. Auch dies kann die erhöhte UV-Sensitivität von *recQ*-Mutanten erklären und spricht für eine Rolle von *RECQ* bei der Stabilisation des Genoms. Die Ausgangssituation ist, ähnlich wie bereits in Abbildung 4 B dargestellt, eine arretierte Replikationsgabel, die in Abbildung 5 schematisch mit einer Läsion am Vorwärtsstrang und einer entkoppelten DNA-Synthese dargestellt ist. Anstelle der D-Loop-Bildung wirkt in diesem Modell der RecA-beladene Einzelstrang als Signal für die SOS-Induktion (Hishida *et al.*, 2004) (Abbildung 5). Dies bedeutet, dass die Zellteilung inhibiert und DNA-Reparatur-Gene induziert werden (Humayun, 1998). Die Rolle von *RECQ* ist vermutlich die Freilegung von einzelsträngiger DNA, so dass das RECA-Filament gebildet werden kann (Hishida *et al.*, 2004). Weiterhin wird *RECQ* auch bei der SOS-Antwort induziert (Irina *et al.*, 1986). Die DNA-Replikation kann schließlich nach direkter oder auch hier rekombinationsabhängiger Reparatur oder durch Transläsions-DNA-Synthese wieder aufgenommen werden.

SOS-Induktion

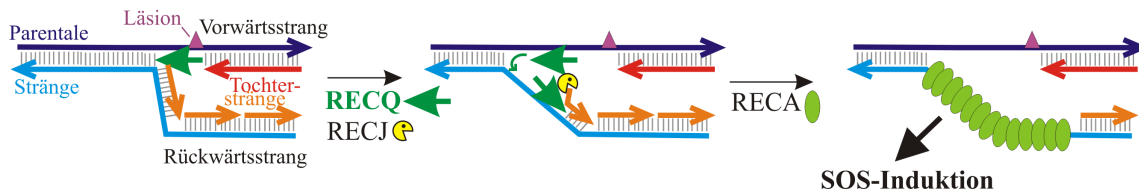


Abbildung 5: Induktion der SOS-Antwort durch RECQ-Helikasen an arretierten Replikationsgabeln.

RECQ bindet an einer einzelsträngigen Stelle des Vorwärtsstrangs im Bereich der Läsion und entwindet als 3' 5' Helikase den DNA-Doppelstrang in Richtung der Gabel. Anschließend wechselt RECQ den Strang und entwindet Tochterstrang-Okazaki-Fragmente und parentalen Rückwärtsstrang. In Zusammenarbeit mit der Exonuklease RECJ entsteht Einzelstrang-DNA, die in 3' 5' Richtung mit RECA beladen wird. Dieses RECA-Filament leitet die SOS-Induktion ein. Abbildung verändert nach Heyer, 2004 und Hishida *et al.*, 2004.

Neben der Funktion als Initiator der Rekombination wirkt EcRECQ auch als **Anti-Rekombinase**, jedoch der illegitimen Rekombination, die nur auf kurzen Homologiebereichen beruht und zu aberranten Rekombinationsereignissen führt (Hanada *et al.*, 1997; Harmon und Kowalczykowski, 1998) (Abbildung 6); folglich ist in der Regel auch diese Funktion für den Erhalt eines stabilen Genoms förderlich.

Anti-Rekombinase



Abbildung 6: RECQ als Anti-Rekombinase.

RecA-vermittelte D-Loops können durch die RecQ-Helikase wieder aufgelöst werden. Abbildung nach Heyer, 2004.

Einem weiteren Modell zufolge, könnte EcRECQ in Zusammenarbeit mit der Typ I Topoisomerase TOPOIII die **Auflösung von Doppel-Holliday-Junctions**, wie in Abbildung 7 gezeigt, katalysieren (Heyer, 2004). Obwohl dies für andere RecQ-Homologe wie z.B. ScSGS1 eine sehr wahrscheinliche Funktion ist, wurde speziell für EcRECQ bisher nur die gegenteilige Reaktion, die Katenierung von dsDNA (in Zusammenarbeit mit TOPOIII), gezeigt (Harmon *et al.*, 1999).

Auflösung von doppelten Holliday-Junctions (dHJ)

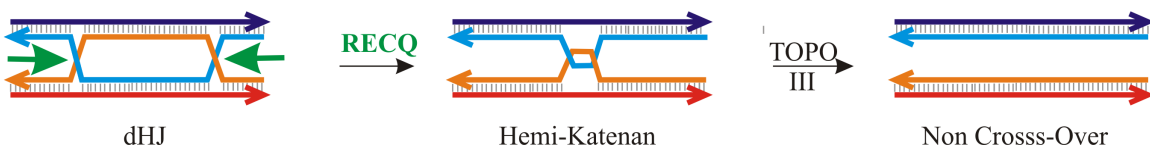


Abbildung 7: Auflösung von Doppel-Holliday-Junctions durch RECQ.

In diesem Nuklease-unabhängigen Alternativweg zur Auflösung von Doppel-Holliday-Junctions katalysiert RECQ die Branch Migration der Holliday-Junctions. Die Dekatenierung erfolgt in Zusammenarbeit mit TOPO III. Auf diesem Weg kommt es immer zur Konversion und nie zum Cross-Over. Abbildung nach Heyer, 2004.

Werden dHJs auf diese Weise, auch „Dissolution“ genannt, aufgelöst, können keine Cross-Over-Ereignisse auftreten, was der Stabilität des Genoms zuträglich ist.

Eine weitere wichtige Funktion, die RECQ-Helikasen im Allgemeinen zugeordnet wird, wird aus der Biochemie abgeleitet, nämlich RECQ als Pflug (in Veröffentlichungen als „**Roadblock-Remover**“ bezeichnet) vor der Replikations-Maschinerie, der die parentalen DNA-Stränge von aberranten DNA-Strukturen befreit, die sonst Blockaden für die Replikation darstellen würden. Diese Funktion ist in Abbildung 8 beispielhaft für eine intramolekulare Quadruplex-Struktur im Vorwärtsstrang dargestellt, die EcRECQ entwinden kann (Wu und Maizels, 2001). Jedoch könnten auch andere aberrante Strukturen wie z.B. Hairpins oder auch intermolekulare Strukturen wie z.B. eine Triple-Helix aufgelöst werden, die auch nicht nur auf den Vorwärtsstrang beschränkt sein müssen (Oakley und Hickson, 2002). Diese Funktion könnte auch die von Cromie *et al.*, 2000 erhaltenen Ergebnisse erklären (Überwindung palindromischer Hairpin-Sequenzen während der Replikation).

Auflösung von aberranten Strukturen

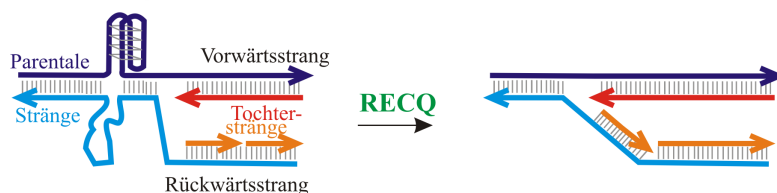


Abbildung 8: RECQ-Helikasen als Pflug, für die Beseitigung von DNA-Blockaden vor der Replikationsmaschinerie, hier am Beispiel eines Quadruplex.

Abbildung verändert nach Bachrati und Hickson, 2003.

1.3.2. Die RecQ-Helikase von *S. cerevisiae* (*ScSGS1*)

Nach EcRECQ als Beispiel eines RecQ-Homolog eines Prokaryoten, werden im Folgenden die Funktionen eines RecQ-Homologs eines einzelligen Eukaryoten aus dem Reich der Pilze, dem einzigen RecQ-Homolog der Bäckerhefe, ScSGS1, erläutert.

Im Gegensatz zu *EcRECQ* wird der Ausfall von *ScSGS1* in den Hefezellen auch ohne weitere Mutationen sichtbar. Dazu gehört z.B. ein langsames Wachstum bzw. eine verkürzte Lebensdauer (Sinclair *et al.*, 1997; Mankouri und Morgan, 2001). Außerdem zeigt sich eine Erhöhung der Rate von nicht getrennten Chromosomen in der Mitose und Meiose (Fehlsegregation), verknüpft mit der Entstehung nicht lebensfähiger Sporen (Watt *et al.*, 1995). Besonders auffällig ist die Hyperkombination, v.a. die deutlich erhöhte Rate des Austauschs von genetischem Material von Schwesterchromatiden (SCE – Sister chromatid exchange) (Watt *et al.*, 1996; Onoda *et al.*, 2000). Weiterhin reagieren *sgs1*-Zellen sensitiver als Wildtyp-Zellen auf verschiedene Mutagene wie UV-Strahlung (Bewirkung von Strangbrüchen) (Gangloff *et al.*, 2000; Saffi *et al.*, 2000; Bachrati und Hickson, 2003), Hydroxyharnstoff (Inhibitor der dNTP-Synthese und damit der Replikation) und Methylmethansulfonat (Methylierungsgenz) (MMS) (z.B. Miyajima *et al.*, 2000). Allerdings scheint das Ausmaß dieser Sensitivitäten von den verwendeten Stämmen und dem Ploidie-Zustand abzuhängen.

ScSGS1 können verschiedene Rollen im DNA-Metabolismus zugeteilt werden, und es konnte gezeigt werden, dass nicht für alle Funktionen die Helikase-Aktivität benötigt wird (Übersicht in Lo *et al.*, 2006). Allen Modellen ist gemeinsam, dass die Funktionen von ScSGS1 im Normalfall dem Erhalt eines stabilen Genoms dienen.

Eine Funktion ist die **Aufrechterhaltung arretierter Replikationsgabeln**. ScSGS1 kann dies zum einen in Zusammenarbeit mit RAD51, TOP3 und RMI1 bewirken. Der von Bjergbaek *et al.*, 2005 vorgeschlagene Weg ist in Abbildung 9, über Intermediat 6, dargestellt. Es erfolgt die Auflösung von RAD51 (dem RECA-Homolog) vermittelten dHJs, ohne dass DNA-Brüche entstehen. Notwendige Interaktionspartner sind hierfür TOP3 und RMI1 (Mullen *et al.*, 2005). Ausfall von diesen Genen führt zum gleichen Phänotyp wie der Ausfall von *SGS1* (Mullen *et al.*, 2005). Speziell die Auflösung von dHJs entspricht der Darstellung in Abbildung 7.

Außerdem erfolgt durch ScSGS1 bei arretierten Replikationsgabeln eine Aktivierung des Intra-S-Phase-Zell-Zyklus-Kontrollpunkts (Frei und Gasser, 2000).

In Abbildung 9 sind auch andere denkbare Möglichkeiten für ScSGS1 vermittelte Reaktionen an der Replikationsgabel, wie Replikationsgabel-Regression und -Reversion, dargestellt.

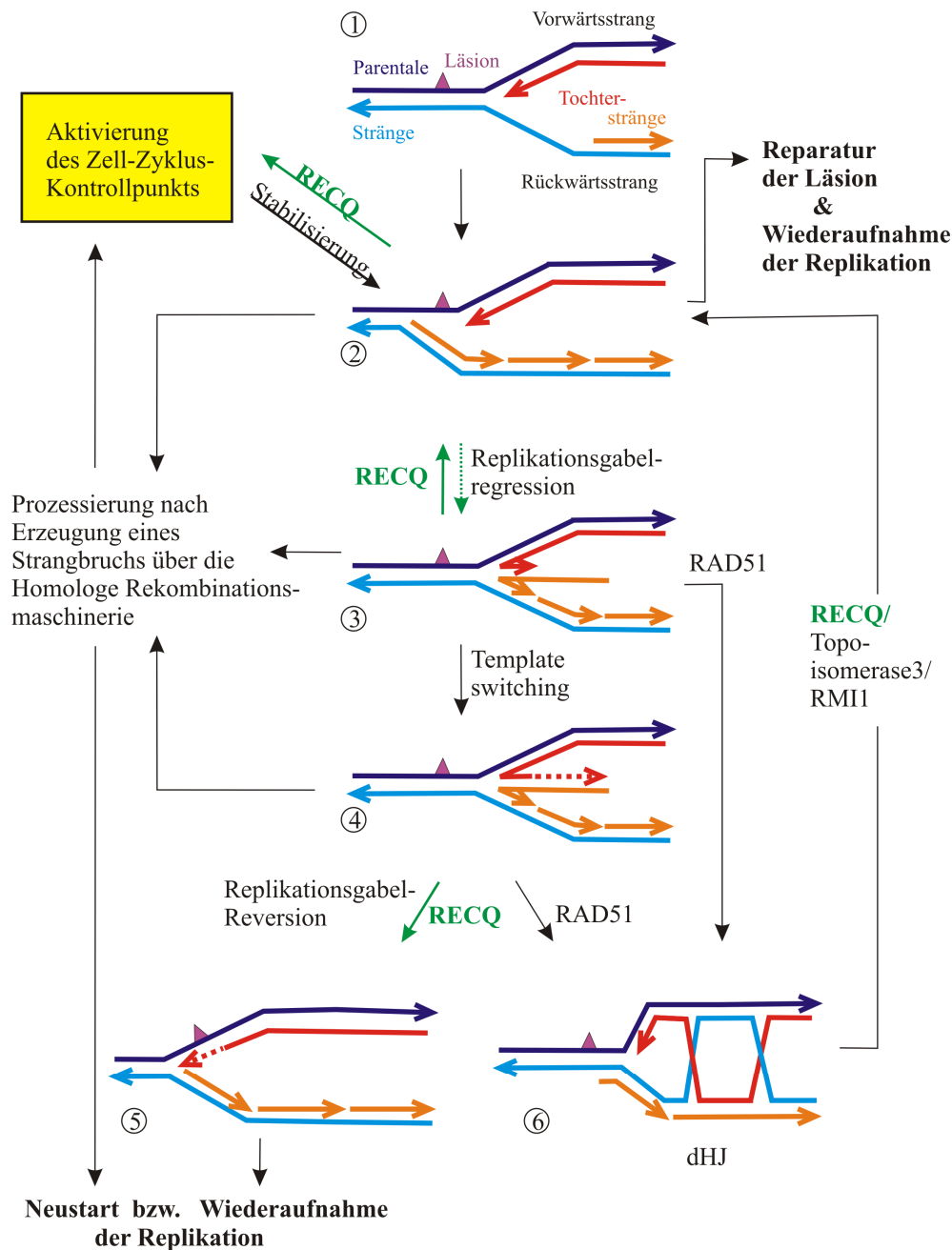


Abbildung 9: Mögliche Funktionen des RECQ-Homologs SGS1 an arretierten Replikationsgabeln.

Durch eine Läsion oder dem Mangel an dNTPs kommt es zum Stehenbleiben der Replikationsgabel. Falls es sich um eine Läsion im Vorwärtsstrang handelt, kann die DNA-Synthese der beiden Tochterstränge entkoppelt werden (2). Diese Replikationsgabel kann jetzt stabilisiert werden, was im Allgemeinen für die Genomstabilität zuträglich ist, oder prozessiert werden. Die Stabilisierung kann zum einen direkt oder indirekt erfolgen, zum anderen durch Prozesse nach der Aktivierung des Zell-Zyklus-Kontrollpunkts. Nachdem die Läsion repariert wurde (oder wieder dNTPs zur Verfügung stehen) kann die Replikation fortgesetzt werden. Kommt es zur Prozessierung, so kann die Replikation dennoch auf mehreren Wegen wieder aufgenommen werden, die keine rekombinationsabhängigen Reparaturen benötigen. Hierfür können einige RecQ-Helikasen vermutlich sowohl eine Replikationsgabel-Reversion als auch die Wiederherstellung der eigentlichen Gabel durch die Replikationsgabel-Reversion katalysieren. Kommt es zu einer Regression, entsteht eine Struktur, die auch als Chicken-Foot bekannt ist (3). Der orange gezeichnete Rückwärts-Tochterstrang kann bei einem so genannten Template-Switching der Polymerase als Matrize dienen, so dass der Vorwärtsstrang mit dieser Hilfe über die Läsion hinweg synthetisiert werden kann (4). Kommt es jetzt zur Reversion, kann die Replikation fortgesetzt werden (5). Andererseits kann die Replikationsgabel RAD51-vermittelt stabilisiert werden (6). Zur Auflösung dieser Struktur wird ein Komplex aus SGS1, TOP3 und RMI1 benötigt. Alternativ können verschiedene Strukturen von Nukleasen prozessiert werden, was allerdings eine rekombinationsabhängige Reparatur bedeutet. Abbildung kombiniert und verändert nach Bjergbaek *et al.*, 2005 und Mankouri und Hickson, 2007.

Je nachdem, um welche Art von Läsionen es sich handelt, ist zudem denkbar, dass ScSGS1 sie als Roadblock-Remover auflöst (gemäß Abbildung 8).

Cobb *et al.*, 2005, schlagen weiterhin vor, dass ScSGS1 auch durch Interaktion mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA (analog zum large T antigen), dessen DNA-Binde-Modus beeinflussen kann, so dass die Interaktion mit der Polymerase α gefördert wird, was zur Bildung eines funktionellen Primosoms führt und damit der Stabilisierung der Replikationsgabel dient.

Die bereits im Kontext der Replikationsgabel erwähnte **Prozessierung von dHJs** (Abbildung 7) durch ScSGS1 (zusammen mit TOP3 und RMI1) ohne Cross-Overs ist vermutlich auch für die Unterdrückung von Cross-Over-Ereignissen **bei der Doppelstrangbruch-Reparatur** (Ira *et al.*, 2003), und **beim Zusammenlaufen von zwei in entgegengesetzten Richtungen fortschreitenden Replikationsgabeln** (Mankouri und Hickson, 2007) wichtig.

In diesem Kontext soll erwähnt sein, dass die Interaktion zwischen SGS1 und TOP3, ausgehend von *S. cerevisiae top3*-Mutanten, zur Entdeckung von *ScSGS1* geführt hat. Durch den Ausfall von sowohl *SGS1* als auch *TOP3* kommt es zu einer Aufhebung des Phänotyps von *top3* (langsames Wachstum und erhöhte Genominstabilität). Daher stammt auch der Name *SGS1*, für Slow Growth Suppressor (Gangloff *et al.*, 1994). Neben TOP3 interagiert ScSGS1 aber auch mit TOPO II (Watt *et al.*, 1995).

Das multifunktionelle SGS1 wird außerdem für einen **Telomerase-unabhängigen Weg für die Verlängerung der Telomere** benötigt, einem Weg ähnlich zum sogenannten ALT (alternative lengthening of telomers)-Weg, der in Menschen gefunden wurde und der über Rekombination funktioniert. SGS1 könnte dies z.B. zum einen, über Einfluss auf einen Zellzyklus-Kontrollpunkt und zum anderen, über die Entwindung von Quadruplex-Strukturen, bewirken (Johnson *et al.*, 2001) (siehe auch Abbildung 10).

Das Potential zur Bildung von Quadruplexen ist v.a. im Telomerbereich, aber z.B. auch bei rDNA gegeben (Maizels, 2006). Bei Quadruplexen sind Hoogsteen-Basenpaarungen zwischen vier Guaninen beteiligt. Für ScSGS1 wurde eine „Roadblock-Remover“-Funktion vorgeschlagen (Huber *et al.*, 2002), ähnlich wie in Abbildung 8 und in Abbildung 10 schematisch dargestellt, da ScSGS1 G4-Quadruplex-Strukturen auflösen kann. Im Kontext von Telomeren könnten also für ScSGS1 die Roadblock-Remover-Funktion und die Funktion beim Erhalt von Telomeren zusammenfallen. ScSGS1 löst auch rekombinierende Telomere auf (Lee *et al.*, 2007).

1.3.3. Die menschlichen RecQ-Helikasen

Wie bereits mehrfach erwähnt und in Abbildung 3 ersichtlich, konnten im Menschen fünf unterschiedliche RecQ-Homologe gefunden werden, wobei es für *HsRECQ5* zusätzlich verschiedene Spleiß-Formen gibt.

Die fünf RecQ-Helikasen des Menschen haben keine redundanten Funktionen, was bedeutet, dass der Ausfall einer Helikase nicht unbedingt von den anderen aufgefangen werden kann. Es kommt im Gegenteil sogar bei Mutationen einzelner RecQ-Gene zu schwerwiegenden, rezessiv vererbten Krankheiten. Diese sind Bloom's Syndrom (BS) im Falle von bestimmten Mutationen in *HsBLM*, Werner Syndrom bei *HsWRN* und z.B. Rothmund-Thomson-Syndrom bei *HsRECQ4*. Diese Krankheiten haben z.B. eine Krebs-Prädisposition gemeinsam. Jedoch zeigen sich differenzierte Krankheitsbilder (Tabelle 1), was neben dem Fakt der fehlenden Redundanz ein weiterer Hinweis auf spezialisierte Funktionen ist.

Tabelle 1: Merkmale von Erbkrankheiten, die durch Mutationen von RecQ-Helikasen ausgelöst werden. verändert nach Oakley und Hickson, 2002 mit weiteren Informationen aus Harrigan und Bohr, 2003 sowie Bachrati und Hickson, 2003

| | Bloom's Syndrom | Werner Syndrom | Rothmund-Thomson-Syndrom |
|---|--|--|--|
| Abnormalitäten im Skelettbau, Kleinwuchs | Proportionaler Zwergwuchs | Ja (++) | Ja (++) , Radiale Klumphand |
| Ausschlag in Folge von Sonnenlicht | (+/-) | Nein | Ja (++) |
| Fehlpigmentierung der Haut (Poikiloderma) | (+/-) | Nein | Ja (++) |
| Immunodefizienz | Ja (++) | Nein | ? |
| Fertilität reduziert | Ja (++) , Männer unfruchtbar | Ja (++) | Ja (++) |
| Vorzeitiges Altern | (+) | Kennzeichnendes Merkmal | Ja (++) |
| Diabetes vom Typ II | (+) | Kennzeichnendes Merkmal | Nein |
| Frühe Augenlinsentrübung (Katarakte) | (+) | Ja (++) | Ja (++) |
| Tumor-Prädisposition | Kennzeichnendes Merkmal (alle Typen, dabei wenig Lungen- und Prostata-Krebs) | Ja (++) v.a. Sarkome (Tumore ausgehend vom Mesoderm) | Ja (++) v.a. Osteosarkome (Knochenkrebs) |
| Genetische Instabilität auf zellulärer Ebene | Ja (++) | Ja (++) | Ja (++) |
| Austausch von Schwesterchromatid-Erbmaterial (SCE) | Kennzeichnendes Merkmal (10-fach erhöht) | Nein | (+/-) i.d.R. eher Chromosomen-Mutationen |

Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Bildung mancher Tumore (in nicht Werner-Syndrom-Patienten) und das Ausschalten der Expression von *HsWRN* durch Promoter-CpG-Island-Methylierung korrelieren (Esteller, 2007).

Allgemein sollte aber noch gesagt sein, dass die Expression der RecQ-Helikasen ein Profil zeigt, das von der entsprechenden Helikase, vom Zellzyklus und vom Organ abhängig ist (Larizza *et al.*, 2006).

Der Ausfall von *HsRECQ1* und *HsRECQ5* alleine, löst keine Krankheit aus. Fallen jedoch *BLM* und *RECQ5* gleichzeitig aus, ist die Rate an SCE zusätzlich erhöht (Wang *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005b). In der Maus sind auch der Ausfall von *RECQ1* oder *RECQ5* mit genomischer Instabilität und SCE auf Zellebene verbunden (Brosh und Bohr, 2007).

Je mehr Forschung betrieben wird, desto mehr Aspekte eröffnen sich, bei denen ein Hinweis auf die Beteiligung einer RecQ-Helikase gegeben ist. Dies ist v.a. in Hinblick auf das Interaktom zu sehen (siehe auch Kapitel 1.4.2). Die Funktionen der einzelnen RecQ-Helikasen sind weder klar definiert, noch klar voneinander abgegrenzt. Natürlich ist aber auch zu erwarten, dass die RecQ-Helikasen z.T. redundante Funktionen haben. Soweit möglich, wird versucht, spezifische Aufgaben darzustellen, wobei erst die weitere Forschung die Gewissheit bringen wird, ob die Zuordnungen richtig sind.

RECQ1 der Ratte wurde bei der Fraktionierung von piRNA mitaufgereinigt (Lau *et al.*, 2006). piRNA ist neben siRNA und miRNA eine weitere Klasse von kleinen RNAs. Solche kleinen RNAs sind für das Gene-Silencing wichtig. Die Wahrscheinlichkeit, dass HsRECQ1 an einem **Gene-Silencing-Prozess** beteiligt ist, steigt durch übereinstimmende Beobachtungen für ein RecQ-Homolog des Pilzes *Neurospora crassa* (Cogoni und Macino, 1999). RECQ1 könnte z.B. an der Entstehung (Synthese) der piRNAs beteiligt sein (Bateman und Wu, 2007).

HsWRN ist ein multifunktionelles Protein. Neben dem Fakt, dass in einer Polypeptidkette Exonuklease- und Helikasefunktionen vereint sind, finden sich viele Interaktionspartner (Kapitel 1.4.2). Szenarien für eine **Zusammenarbeit der beiden Funktionen (3'-5' Helikase und 5'-3' Exonuklease)** ist in der Diskussion des Papers von Machwe *et al.*, 2002 dargestellt. Kürzlich wurde beobachtet, dass eine Kooperation zu einer verbesserten Replikationsgabel-Regression führt (siehe Abbildung 9, Klein-Bild 3) (Machwe *et al.*, 2007). Auch *in vivo* Daten deuten auf eine biologisch signifikante Kooperation (Chen *et al.*, 2003).

Allgemein hat HsWRN vermutlich eine übergreifende Rolle, da alternative DNA-Strukturen aufgelöst werden können, die in einer Vielzahl von Stoffwechselwegen wie z.B. **Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur** vorkommen (Ozgen und Loeb, 2005) (siehe hierzu auch Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). Für jedes Feld gibt es zahlreiche Interaktionspartner, die für eine Beteiligung sprechen (Kapitel 1.4.2). **Speziell** für HsWRN wird aber **auch** eine Beteiligung an der (long patch) **Basen-Excisions-Reparatur** angenommen (Ahn *et al.*, 2004; Brosh und Bohr, 2007), und im Gegensatz zu BLM auch beim **NHEJ** (Chen *et al.*, 2003).

Eine weitere Funktion, bei der HsWRN die bedeutsamste RecQ-Helikase ist, ist beim **Erhalt der Telomere** zu sehen (Khakhar *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2006; Brosh und Bohr, 2007; Crabbe *et al.*, 2007). Dies könnte, wie in Abbildung 10 dargestellt, auf verschiedenen Ebenen passieren; z.B. erleichtert HsWRN einen alternativen Telomer-Verlängerungs-Weg, den ALT-Weg. Die dazu nötige Entwindung verschiedener D-Loops (am Ursprungs t-Loop, sowie auch bei intra- oder inter-telomerischer D-Loop Bildung) und einer möglichen Quadruplex-Struktur durch HsWRN sind in Abbildung 10 schematisiert.

Allerdings ist das Bild von HsWRN gerade durch die Vielzahl an Interaktionspartnern, wozu z.B. auch p53 (Comai und Li, 2004) und die Zell-Zyklus-Kontrollpunkt-Kinase ATR (Otterlei *et al.*, 2006) gehören, sowie durch Sekundärmodifikationen an HsWRN und durch solche, die HsWRN bewirkt, sehr komplex und die Funktion von HsWRN noch nicht wirklich verstanden. Ebenso übernimmt HsWRN auch Funktionen, bei denen der strukturelle Charakter entscheidend ist, die also nicht von der Helikase- und Nuklease-Funktion abhängen (Chen *et al.*, 2003).

HsBLM und HsWRN haben z.T. ähnliche Funktionen, ko-lokalisieren teilweise und interagieren sogar miteinander, so dass es denkbar wäre, dass diese beiden, unter bestimmten Bedingungen, kooperieren oder bei manchen Antworten auf Schäden Backup-Funktionen bieten (Otterlei *et al.*, 2006).

Auch HsBLM ist vermutlich auch am **Telomer-Erhalt** beteiligt, zumindest ist eine Telomerassoziation zu beobachten (Yankiwski *et al.*, 2000), die biochemischen Grundvoraussetzungen sind gegeben (wie die Entwindung von Quadruplex-Strukturen (Sun *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2002) und D-Loops (Opresko *et al.*, 2005)), in *SGS1* und Telomerase defizienten Bäckerhefezellen bewirkt *HsBLM* eine Komplementation des Defekts der Telomerverlängerung (Lillard-Wetherell *et al.*, 2005) und HsBLM interagiert mit Telomer-assoziierten Proteinen (Lillard-Wetherell *et al.*, 2004).

Telomer-Erhalt

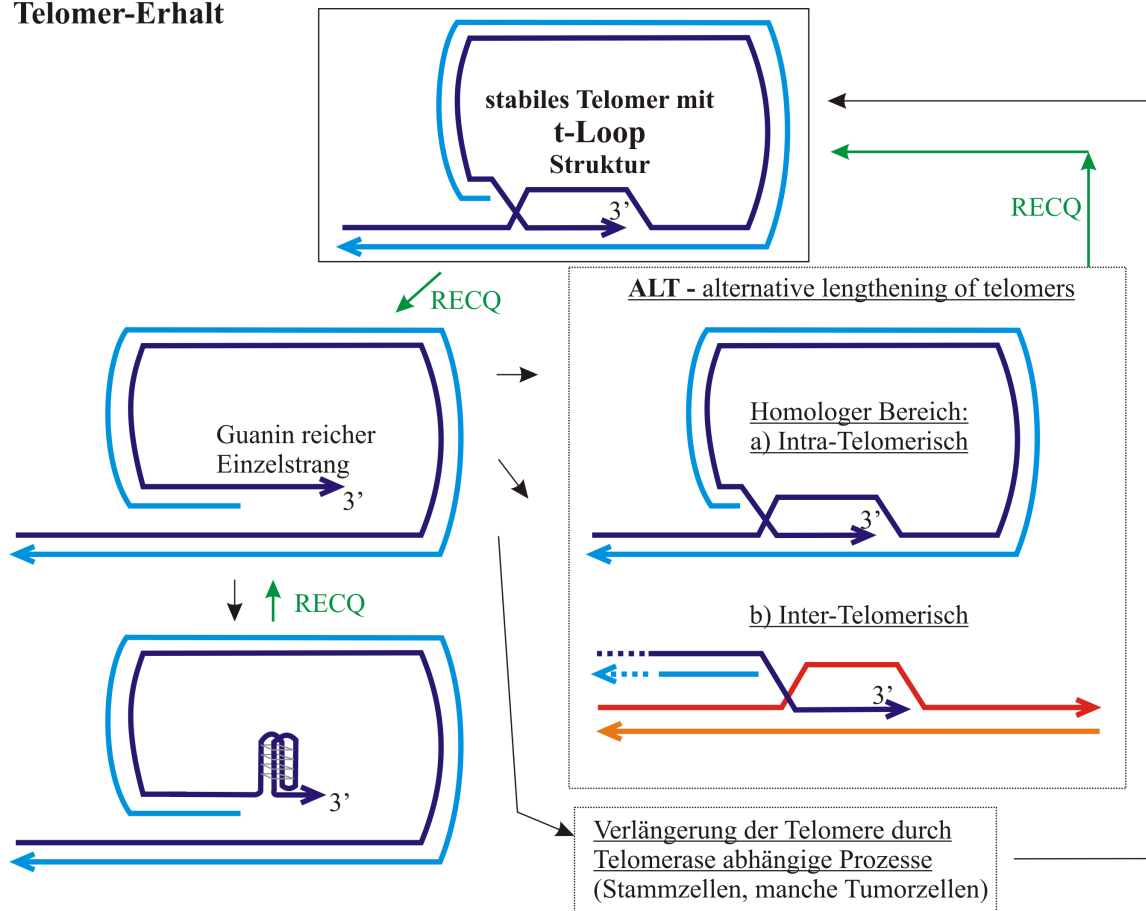


Abbildung 10: Telomer-Erhalt durch RECQ-Helikasen.

Das Chromosomenende ist ein spezialisierter Nucleoprotein-Komplex, das Telomer. Die Sequenz der Telomere zeichnet sich durch sogenannte „telomeric repeats“ aus, z.B. (TTAGGG)_n. Diese Sequenz kann von sogenannten Shelterinen gebunden werden (z.B. TRF1, TRF2, POT1, siehe auch Kapitel 1.4.2). Aufgrund der Problematik bei der Replikation von linearer DNA ist außerdem ein ungepaarter 3' Überhang zu finden. Zwei mögliche Schutz-Strukturen von Telomeren sind dargestellt: der t-Loop (oben) und eine Quadruplexformation (links unten). Die in der Mitte links dargestellte Struktur kann zu Genominstabilitäten führen, da sie unter Umständen fälschlicherweise als Doppelstrangbruch erkannt werden kann. Auch viele weitere Proteine sind an den Telomeren assoziiert, wenn sie auch nicht spezifisch nur dort gefunden werden (z.B. Ku 70/80, ATM, NBS, PARP-1, RAD51, RAD52, RPA, p53; siehe auch Kapitel 1.4.2). Telomere können entweder durch eine Telomerase verlängert werden, oder über den alternativen ALT-Weg. Dieser ALT-Weg ist mit der homologen Rekombinationsmaschinerie verknüpft; der homologe Bereich kann (aufgrund der telomeric repeats) entweder am gleichen Telomer, bei einem anderen Telomer (beides schematisch dargestellt) oder bei extrachromosomaler DNA gefunden werden. Die Möglichkeiten, wie RECQ-Helikasen durch ihre Strangentwindungsaktivität zum Telomer-Erhalt beitragen könnten, sind schematisch dargestellt.

Wie bei ScSGS1 und HsWRN gesehen, haben auch BLM-Proteine, die durch eingeführte Punktmutationen keine Helikasefunktion mehr haben, Funktionen. BLM kann Proteine rekrutieren, die in der Antwort auf DNA-Schäden beteiligt sind (Davalos *et al.*, 2004). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass BLM mit den **Zellzyklus-Kontrollpunkt-Kinasen** ATM und ATR interagiert (Beamish *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2004) und positiv auf die Phosphorylierung von ATM wirkt (Davalos *et al.*, 2004). Zusammenfassend erleichtert also HsBLM die Kontrollpunkt-Signalkaskade (Mankouri und Hickson, 2007).

HsBLM spielt auch eine Rolle bei der **Replikation**. Für mögliche Rollen sei hier auf Kapitel 1.3.2, Abbildung 9, verwiesen (siehe z.B. Mankouri und Hickson, 2007).

Für HsBLM konnte eine ähnliche Funktion gezeigt werden wie für ScSRS2 (und HsRECQ5 β (siehe weiter unten)) (Bugreev *et al.*, 2007). SRS2 ist eine weitere Helikase, zu der im Genom des Menschen kein Homolog gefunden werden konnte (wohl aber im Genom von *Arabidopsis thaliana*), der v.a. eine Aktivität in der **Auflösung von RAD51-Filamenten** zukommt (Krejci *et al.*, 2003). RAD51-Nukleofilamente vermitteln die Invasion des Stranges in homologe doppelsträngige Bereiche, was somit einen frühen Schritt der homologen Rekombination darstellt, die dadurch eben durch Enzyme, die RAD51-Filamente auflösen, unterdrückt wird.

Auflösung von RAD51-Filamenten

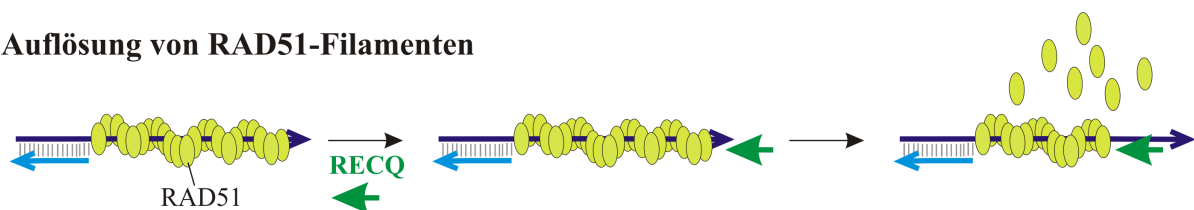


Abbildung 11: Auflösung eines präsynaptischen RAD51-Filaments durch Helikasen (HsBLM, HsRECQ5, ScSRS2).

RAD51 wird durch RPA ersetzt.

Eine wesentliche Aufgabe von HsBLM, die auch nicht von HsWRN, RECQ1 oder RECQ5 β übernommen werden kann, ist die **Auflösung von dHJ** (Dissolution) zu Non-Cross-Over Ergebnissen (Genkonversion) mit Hilfe von RMI1 und TOP3 α (Wu und Hickson, 2003; Plank *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Brosh und Bohr, 2007) (wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt). Ein Ausfallen dieser Funktion (wie z.B. in Bloom's Syndrom Zellen) führt vermutlich zu der erhöhten SCE-Frequenz. Da dies eine wichtige Funktion ist, soll sie hier genauer eingeordnet werden. Die freien DNA-Enden, die bei Doppelstrangbrüchen (und auch in der Meiose) auftreten können entweder über NHEJ oder homologe Rekombination repariert werden. Bei der homologen Rekombination unterscheidet man in Synthesis Dependent Strand Annealing (SDSA), in das klassische Doppelstrangbruchreparatur-(DSBR)-Modell und seit neuerem in dHJ-Dissolution (siehe auch Abbildung 43). Dabei kommt es beim SDSA-Modell zu einer Genkonversion. Bei den anderen beiden Modellen stellt die dHJ ein wichtiges Intermediat dar. Im DSBR-Modell wird diese dHJ durch einen Nuklease-Komplex aufgelöst, was zu einem Cross-Over führen kann. Bei der dHJ-Dissolution, bei der HsBLM eine wichtige Rolle spielt, hingegen (vgl. Abbildung 7) kommt es immer zur Genkonversion, was der Genomstabilität zuträglich ist (siehe z.B. Mankouri und Hickson, 2007).

In der Literatur werden **weitere Funktionen** von HsBLM diskutiert, dazu gehören natürlich alle Funktionen von ScSGS1. Außerdem wird z.B. eine Stimulation der DNA-Reparatur-Synthese (Bugreev *et al.*, 2007), oder eine Funktion bei Okazaki-Fragmenten (Bartos *et al.*, 2006) angenommen. Amor-Gueret, 2006 behauptet, dass ein Ausfall von BLM letal, aber die Lebensfähigkeit von BS-Zellen durch eine konstitutive Induktion von SOS-ähnlichen Antworten möglich ist. Wie auch für die bisher beschriebenen RecQ-Homologe (und auch die Folgenden), ist unser Bild der genauen von HsBLM noch sehr unvollständig.

Auch **HsRECQ4** ist ein wichtiges RecQ-Familienmitglied, wie aus dem korrelierten Krankheitsbild Rothmund-Thomson-Syndrom (RTS) hervorgeht. Für das Homolog von *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass es für die **Assemblierung der Replikationsmaschinerie** essentiell ist. Dafür ist der N-terminale Teil des Proteins wichtig, der eine Homologie zu den Hefeproteinen SLD2 und DRC1 aufweist. (Sangrithi *et al.*, 2005; Kellermayer, 2006; Matsuno *et al.*, 2006). Weiterhin könnte RECQ4 (u. U. mit seinen Interaktionspartnern UBR1 und UBR2) eine **Funktion bei der Chromosomensegregation** haben (Schwesterchromatid-Cohäsion), was auch mit dem Merkmal der Chromosomen-Mutationen (z.B. auch Mosaik-Trisomien) von RTS-Patienten übereinstimmt (zusammengefasst in Larizza *et al.*, 2006).

Andere Experimente deuten auf eine Funktion von HsRECQ4 als **Notssystem** hin, das, falls DNA-Schäden nicht behoben wurden und der Zellzyklus trotzdem in die S-Phase fortschreitet, einen Betrag zur Reparatur dieser Schäden leistet. Es ist nämlich zu beobachten, dass p53 die Expression von HsRECQ4 in der G1-Phase, aber nicht der S-Phase, unterdrückt (Sengupta *et al.*, 2005).

HsRECQ5 β wird als **ScSRS2-Ortholog** diskutiert (Hu *et al.*, 2007). Hu *et al.*, 2007 konnten, wie für HsBLM schon erwähnt, auch für HsRECQ5 eine Auflösung von RAD51-Filamenten zeigen (Abbildung 11). Dadurch können homologe Rekombinationsereignisse unterbunden werden; und RECQ5 kann damit unter anderem als Supressor der Aktivierung von Onkogenen gesehen werden.

1.4. Spezies-übergreifende Zuordnung funktioneller Homologe

Immer, wenn in unterschiedlichen Organismen unterschiedlich viele Homologe eines Proteins zu finden sind, kann es entweder sein, dass ein Organismus durch Duplikationsereignisse oder Gentransfer ein neues dazu gewonnen hat, oder dass der andere Organismus eines verloren hat. Solche Ereignisse sind im Licht der Evolution zu betrachten. Viele Generationen vergehen, neue Arten entstehen – verbunden mit dem Besetzen verschiedener Lebens-Nischen und damit unterschiedlichen Anforderungen. Der Selektionsprozess entscheidet, welche Mutationen für die Art förderlich sind; und dies werden solche sein, die früher oder später mit Funktionsänderungen einhergehen.

Zurück zur Familie der RecQ-Helikasen, ist es wahrscheinlich, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Pilze, Pflanzen und Tiere mehrere RecQ-Homologe besaß (vermutlich mit allen typischen Domänen) (Hartung und Puchta, 2006). Zum Verständnis der Evolution der RecQ-Proteine, speziell der funktionellen Evolution müssen RecQ-Homologe aus Organismen verschiedener Reiche, wie z.B. in dieser Arbeit aus dem Reich der Pflanzen, gründlich analysiert werden. Die Frage ist, welche Funktionen erhalten blieben und welche neu erschaffen wurden - mit der Hoffnung auf die Antwort nach dem Warum.

Für diese Funktions-Analyse, gilt primär das Schema, das in Abbildung 1 dargestellt ist. Wenn das Ziel ist, Funktionen vergleichend zu analysieren, um funktionelle Homologe zuordnen zu können, bieten sich natürlich Experimente an, die bereits für Homologe anderer Organismen schlüssige Ergebnisse gebracht haben. Dieser Ansatzpunkt wird z.B. in dieser Arbeit durch die biochemische Analyse der Funktionen verfolgt.

Im Folgenden sollen zwei weitere Analysemethoden herausgegriffen werden, die auch einen großen Beitrag zur Zuordnung funktioneller Homologe leisten können, die Komplementationstudien und Interaktom-Analysen.

1.4.1. Bedeutung von Komplementationstudien

Eine Art von Komplementationstudien besteht darin, z.B. das HsBLM-Gen in *S. cerevisiae* *SGS1*-Mutanten zu exprimieren, und zu beobachten, wie sich dieser „Ersatz“ auf den Organismus auswirkt. Interessanterweise konnte für speziell dieses Beispiel gezeigt werden, dass es zu einer Aufhebung von u.a. der Hydroxyharnstoff-Sensitivität, der Hyperrekombination und des vorzeitigen Alterns des *sgs1*-Mutantenphänotyps führte (Yamagata *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 1999). Außerdem kann *HsBLM* auch in Hefezellen die Telomerlänge in Telomerase-defizienten Zellen positiv beeinflussen. Dafür wird die Helikase-Aktivität benötigt (Lillard-Wetherell *et al.*, 2005). Dies spricht dafür, dass *ScSGS1* das

funktionelle Homologe zu *HsBLM* ist. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch *HsWRN* die Hyperrekombination in Hefe-*sgs1*-Zellen unterdrücken kann (Yamagata *et al.*, 1998), jedoch nicht wie *HsBLM* den *top3*-Phänotyp und nicht die Hydroxyharnstoff-Hypersensitivität (Yamagata *et al.*, 1998). Hier erkennt man deutlich eine Konservierung und gleichzeitige Spezialisierung von RecQ-Funktionen.

1.4.2. Bedeutung des Interaktoms

Da ein Organismus ein komplexes System ist, hat ein Protein im Allgemeinen keine Einzelspieler-Funktion, sondern ist ein Teil des Gefüges. Damit spielen funktionell homologe Proteine in ähnlichen Stoffwechselwegen eine Rolle und haben Interaktionspartner, die in den verschiedenen Organismen ebenfalls zueinander homolog sind. Auch die Interaktom-Daten stehen im Einklang mit einer funktionellen Homologie von *ScSGS1* und *HsBLM*. Jedoch ist der Vergleich der Interaktom-Daten deutlich interessanter, wenn Organismen mit mehreren RecQ-Homologe analysiert werden.

Weiterhin ist natürlich die Zuordnung funktioneller Homologe nicht der einzige Vorteil der Analyse des Interaktoms. Von noch größerer Bedeutung ist genau die Zuordnung von den Zielproteinen zu bestimmten Stoffwechselwegen. Diese Zuordnung kann auf dem Interaktom-Weg vorgeschlagen oder auch bestätigt werden.

In Tabelle 2 sind die bekannten Interaktionen der RecQ-Helikasen von *E. coli*, *S. cerevisiae* und dem Menschen aufgelistet. Bei einigen davon kommt es zu einer Funktionsmodellierung, entweder der RecQ-Funktion oder aber des Interaktionspartners.

In dieser Einleitung besteht aus Platzgründen nicht die Möglichkeit, die einzelnen Interaktionen genauer zu kommentieren. Den Daten kann entnommen werden, dass einige Interaktionen konserviert sind, auch innerhalb eines Organismus, wie z.B. die Interaktion mit Einzelstrangbindeproteinen (SSB bzw. RPA). Dann aber gibt es auch einige spezifische Interaktionen. *HsWRN* kann z.B. aufgrund der Interaktionen eine Beteiligung bei der Replikation (z.B. PCNA), der Homologen Rekombination (z.B. RAD52), der Nicht-homologen-End-zu-End-Verknüpfung (z.B. Ku70/80), der Basenexcisions-Reparatur und der Einzelstrangbruchreparatur (z.B. PARP-1) zugesprochen werden (Harrigan und Bohr, 2003). Zu diesen echten physikalischen/funktionellen Interaktionen kommen genetische Interaktionen dazu, die zeigen, ob Proteine im gleichen Pathway eine Rolle spielen, in verschiedenen Alternativwegen oder sich epistatisch verhalten. Als Beispiele seien für den

gleichen Weg die Zuordnung von EcRECQ in den RecF-Weg (Nakayama *et al.*, 1984), als Alternativweg die synthetische Letalität von Mutationen in sowohl *ScSGS1* als auch *ScSRS2* (siehe Kapitel 1.3.3 für die Funktion von SRS2) (Gangloff *et al.*, 2000) und für Epistasie *ScRAD51* und *ScSGS1* (Wu *et al.*, 2001) erwähnt.

Tabelle 2: Interaktionspartner von RECQ-Helikasen.

Informationen übernommen aus Sharma *et al.*, 2006 (siehe dort für Referenzen) und z.T. ergänzt nach Bachrati und Hickson, 2003 und Oakley und Hickson, 2002, weitere Referenzen direkt in der Tabelle. Es ist zu erwarten, dass mit der laufenden Forschung weitere Interaktionspartner gefunden werden; ebenso wird nicht der Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

| RECQ | Nachgewiesene Interaktionspartner (physikalisch und/oder funktionell) |
|-----------------|--|
| EcRECQ | TOPOIII, SSB |
| ScSGS1 | MLH1, PSO5/RAD16, RAD51, RMI1, RPA, TOP2, TOP3 |
| HsRECQ1 | EXO-1, MLH1, MSH2/6, QIP1 (IMPORTIN α), RCH1 (IMPORTIN α), RPA, TOP3 α |
| HsWRN | ATR, APE-1, BLM, c-ABL, DNA-PK, EXO-1, FEN-1, Ku70/80, MRN-Komplex (MRE11/RAD50/ NBS1), MutL α (MLH1/ PMS2), MutS α (MSH2/ MSH6), MutS β (MSH2/ MSH3) (Saydam <i>et al.</i> , 2007), p53, PARP-1, PCNA, PKA, PML (Vaitiekunaite <i>et al.</i> , 2007), POL β , POL δ , POT1 (Opresko <i>et al.</i> , 2005), RAD52, RAD54B (Otterlei <i>et al.</i> , 2006), RPA, SIRT1 (Vaitiekunaite <i>et al.</i> , 2007), SUMO-1, TOP1, TRF2, UBC9, VCP, WHIP=WRNIP1=MGS1 |
| HsBLM | ATM, ATR, BASC (BRCA1 associated genome surveillance complex), BRCA1, CAF-1, CHK1 (Tripathi <i>et al.</i> , 2007a), FA, FEN-1, MLH1, MUS81 (Zhang <i>et al.</i> , 2005), p53, PML, POT1 (Opresko <i>et al.</i> , 2005), RAD51, RMI1=BLAP75, RPA, SIRT1 (Vaitiekunaite <i>et al.</i> , 2007), SUV3 (Pereira <i>et al.</i> , 2007), TOP3 α , TRF2, WRN, 53BP1 (Tripathi <i>et al.</i> , 2007b) |
| HsRECQ4 | PML (Petkovic <i>et al.</i> , 2005), RAD51 (Petkovic <i>et al.</i> , 2005), (p53 (Repression der HsRECQ4 Expression) (Sengupta <i>et al.</i> , 2005)), UBR1 (Yin <i>et al.</i> , 2004), UBR2 (Yin <i>et al.</i> , 2004) |
| HsRECQ5 β | RPA, TOP3 α , TOP3 β |

1.5. Analyse der RecQ-Helikasen von *Arabidopsis thaliana*

1.5.1. Gründe für die Analyse von *AtRecQ*-Helikasen

Wie in Kapitel 1.4 geschrieben, kann durch die vergleichende Analyse von RecQ-Helikasen aus dem Reich der Pflanzen mit z.B. den RecQ-Helikasen des Menschen (als Vertreter des Reichs der Tiere) das Verständnis der **funktionellen Evolution** der RecQ-Helikasen gefördert werden.

In diesem Kontext soll noch einmal erwähnt sein, dass die RecQ-Helikasen von *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich ihres Aufbaus **Besonderheiten** zeigen, die die menschliche RecQ-Familie nicht zeigt (Abbildung 3). Daher sind, in diesem Fall diese Helikasen *per se* wissenschaftlich interessant.

Zudem hat das Aufschlüsseln der Funktion der RecQ-Helikasen aus Pflanzen auch noch einen Anwendungsbezug, der allerdings noch nicht unmittelbar vor der Anwendungsreife steht. Da, wie bereits für *E. coli*, *S. cerevisiae* und den Menschen gesehen, RecQ-Helikasen eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und der DNA-Rekombination spielen, ist RecQ-Grundlagenforschung im Bereich der Pflanzen im Hinblick auf die Schaffung neuer, besserer transgener Pflanzen von entscheidender Bedeutung. Es wäre wünschenswert, das pflanzliche Genom spezifisch verändern zu können – spezifische Ersetzungen vornehmen zu können (**Gene Targeting**). Für diesen Prozess braucht man die homologe Rekombination, deren Effizienz durch RecQ-Helikasen beeinflusst wird.

1.5.2. Arabidopsis thaliana als Modellorganismus

In dem Zusammenhang des Gene Targetings ist Arabidopsis als Pflanzen-Modellorganismus zu sehen – aus der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler), zu der z.B. auch die Nutzpflanze Raps gehört. *Arabidopsis thaliana* bietet z.B. folgende Vorteile: es wird verhältnismäßig wenig Platz benötigt und die Entwicklung ist verhältnismäßig schnell. Wichtiger ist jedoch, dass das Genom komplett sequenziert und mit etwa 115 Mbp (ca. 25,5 Tausend Genen) auf fünf Chromosomen relativ klein (mit verhältnismäßig wenig nicht kodierender DNA) ist. DNA-Schäden bzw. Mutationen können leicht durch Strahlung oder durch andere Mutagene, sowie durch Insertionen von T-DNA (mit Agrobakterium tumefaciens) erzeugt werden, wobei durch letzteres auch verhältnismäßig einfach transgene Pflanzen geschaffen werden können. In diesem Kontext soll noch einmal hervorgehoben werden, dass die homologe Rekombination bei der Integration von DNA in Pflanzen eine geringe Rolle spielt, so dass der gezielte Austausch einer Genkassette bisher nicht optimal möglich ist. Stattdessen findet eine im Wesentlichen zufällige Integration der T-DNA ins Genom statt. Allerdings wurden für Arabidopsis von verschiedenen Institutionen im großen Maßstab **T-DNA-Knockout Pflanzen** hergestellt und die Insertionen charakterisiert, so dass Arabidopsis-Samen mit T-DNA-Insertionen in definierten Genen bestellt werden können. Diese Gene sind durch die große Insertion nicht mehr funktionell. Ein weiterer Vorteil von Arabidopsis ist die große Nachkommenschaft. Dabei ist es möglich, durch Selbstbefruchtung schnell homozygote Nachkommen zu erhalten oder gezielt definierte Pflanzen miteinander zu kreuzen. Dies erlaubt z.B. das **Einkreuzen von anderen mutierten Genen**, oder von Reporter genen.

So wurden unter anderem **Reporterlinien** entwickelt, um die inter- und intrachromosomale Rekombination (relativ gesehen) zu quantifizieren (Swoboda *et al.*, 1994; Molinier *et al.*, 2004). Diesen Assaysystemen ist gemeinsam, dass durch ein jeweiliges Ereignis ein

funktionelles β -Glucuronidase-Gen entsteht, so dass bei Zugabe von X-Gluc blaue Punkte entstehen, die quantifiziert werden können.

Die Pflanzen solcher kombinierten Mutanten/Reporterlinien können nicht nur unter normalen Lebensbedingungen analysiert werden, sondern z.B. definierten Mutagenen ausgesetzt werden, die bestimmte Arten von DNA-Schäden bewirken (**Challenging**). So kann aufgrund einer Änderung der Sensitivität auf die (direkte oder indirekte) Beteiligung eines Gens bei einem bestimmten DNA-Reparaturweg geschlossen werden. Diese *in vivo* Daten, oder sogenannte „genetischen“ Daten, müssen aber durch *in vitro* Daten, wie in dieser Arbeit, verifiziert und präzisiert werden.

1.5.3. Veröffentlichte Daten über AtRecQ-Helikasen

Über die RecQ-Helikasen der Pflanzen ist deutlich weniger veröffentlicht, als z.B. über die RecQ-Helikasen des Menschen. Dabei handelt es sich v.a. um Expressionsstudien, Komplementationsstudien, Nachweise von Protein-Protein-Interaktionen und um einige Erkenntnisse aus der Mutantanalyse. Der strukturelle Aufbau der RecQ-Helikasen von *Arabidopsis thaliana* wurde bereits in Kapitel 1.2.2 dargestellt; einige andere Ergebnisse werden im Folgenden aufgeführt.

Mit Hilfe von Komplementationsstudien in *sgs1*-Hefezellen (siehe auch Kapitel 1.4.1) konnte gezeigt werden, dass nur *AtRECQsim* die MMS-Hypersensitivität reduzieren und *AtRECQ4A* diese aufheben kann, alle anderen AtRECQs erhöhten sie weiter oder hatten keinen Einfluss (Bagherieh-Najjar *et al.*, 2003; Bagherieh-Najjar, 2004). *AtRECQsim* kann also Teilfunktionen von *ScSGS1* übernehmen, allerdings konnte nur *AtRECQ4A* auch weiterhin den *sgs1*-Hyperrekombinationsphänotyp aufheben (Bagherieh-Najjar, 2004).

Auch *Arabidopsis*-Mutantanalysen ergaben, dass *AtRECQ4A* die homologe Rekombination unterdrücken kann und außerdem bei der Beseitigung bestimmter DNA-Schäden mitwirkt (Bagherieh-Najjar *et al.*, 2005).

Die Indizien sprechen also für eine funktionelle Homologie von *ScSGS1*, dem funktionellen Homolog *HsBLM* und *AtRECQ4A*. Auch Daten aus der genetischen Interaktion (siehe Kapitel 1.4.2) sprechen dafür: Zum einen sind Doppelmutationen von *AtRECQ4A* und *AtMUS81* letal (Hartung *et al.*, 2006), ebenso wie die entsprechenden „*RECQ*“/„*MUS81*“-Doppelmutationen in *S. pombe*, *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001; Trowbridge *et al.*, 2007). *MUS81* ist Teil einer strukturspezifischen Endonuklease, die an einem Alternativweg der Auflösung von Holliday-Junctions beteiligt ist.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass *Atrecq4A* den letalen Phänotyp der *Attop3 α* -Mutante aufheben kann (Hartung *et al.*, 2007). Ein ähnliches Phänomen wurde auch für *ScSGS1* beschrieben (siehe Kapitel 1.3.2).

Obwohl *AtRECQ4B* und *AtRECQ4A* sehr ähnlich sind, bewirkt ein Verlust von *AtRECQ4B* eine Abnahme der Homologen-Rekombinations-Rate. Folglich wirkt *AtRECQ4B*, ähnlich wie *EcRECQ* (Kapitel 1.3.1) förderlich auf die HR (Hartung *et al.*, 2007).

Für *AtRECQ2*, eines der Proteine, das in dieser Arbeit charakterisiert wurde, konnte weiterhin im Yeast-2-Hybrid-Assay gezeigt werden, dass es mit *AtWRNexo* interagiert (Hartung *et al.*, 2000). Dies ist ein Indiz für eine mögliche funktionelle Homologie zwischen dem Helikase-Teil von *HsWRN* und *AtRECQ2*. Es konnte bereits biochemisch gezeigt werden, dass *AtWRNexo* und *HsWRN* konservierte Funktionen haben (Plchova *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

1.6. Biochemische Charakterisierung von RECQ-Helikasen

1.6.1. Bedeutung der Biochemie

Biochemische Analysen sind notwendig, um *in vitro* zu zeigen, dass ein Protein tatsächlich bestimmte Reaktionen katalysieren kann. Zum Beispiel bedeutet alleinig die Gegenwart der Helikase-Motive nicht, dass das Protein tatsächlich doppelsträngige Nukleinsäuren entwinden kann. Als Beispiel hierfür sei *HsRECQ4* aufgeführt (siehe auch Abbildung 3), das die Helikase-Domäne hat, aber keine DNA-Entwindung zeigt (Macris *et al.*, 2006). Dennoch ist es ein wichtiges Mitglied der menschlichen RecQ-Familie (Kapitel 1.3.3).

Andersherum ist es eben auch Dank der Biochemie möglich, bestimmten Domänen eine Funktion zuzuordnen, und essentielle Aminosäuren für diese Funktion zu bestimmen.

Die wichtigste Bedeutung der Biochemie im Kontext dieser Arbeit ist jedoch, dass durch die Analyse von Substraten und Produkten eine funktionelle Einordnung des Proteins in den Stoffwechsel eines Organismus ermöglicht wird.

Werden Funktionsmodelle erstellt, liegt es nahe, biochemisch zu überprüfen, ob die vorgeschlagenen Schritte tatsächlich katalysiert werden können. Natürlich können auch andersherum beobachtete Aktivitäten zu einem Modell entwickelt werden.

Bei der Interpretation der biochemischen Ergebnisse muss man jedoch immer bedenken, dass eine bestimmte Aktion unter Umständen von z.B. anderen Proteinen (z.B. weil das Protein *in vivo* ein Teil eines Komplexes ist) oder Sekundärmodifikationen beeinflusst werden könnte, was im experimentellen Ansatz nicht berücksichtigt wurde. Indirekt auch damit verbunden ist

auch die zweite Einschränkung, dass nämlich nicht jedes *in vitro* beobachtete Verhalten *in vivo* eine Signifikanz haben muss. Auch wurde in Kapitel 1.3 gezeigt, dass RecQ-Helikasen kontrollierende Eigenschaften haben (Einfluss auf die Zell-Zyklus-Kontrollpunkt-Maschinerie). Obwohl auch solche Funktionen *in vitro* simuliert werden könnten, werden sie in der Regel nicht von der biochemischen Analyse erfasst.

Dennoch ist der biochemische Ansatz ein mächtiges Werkzeug bei der Analyse von Enzymfunktionen.

1.6.2. Mögliche Vorgehensweisen für die Gewinnung des Zielproteins

Um die Proteine charakterisieren zu können, kann man sie entweder aus dem Organismus isolieren, was den Vorteil bringt, dass sie bei einer geeigneten Isolationsmethode samt Original-Sekundärmodifikationen analysiert werden können, oder sie gezielt exprimieren. Dabei kann man den Ursprungsorganismus wählen, oder eine heterologe *in vitro* oder *in vivo* Expression anvisieren, was meist mit Vereinfachungen verbunden ist, da z.B. die Methoden für eine Expression in eukaryotischen Zellen wie Insektenzellen, oder in Bakterien als einfaches, schnelles, prokaryotisches System, etabliert sind.

Solche Methoden beinhalten oft eine kontrollierte Überexpression (Induktion). Auch stehen eine Vielzahl von Expressionsvektoren zur Verfügung mit deren Hilfe die Proteine mit einem oder mehreren Tags versehen werden können, über die das Protein mit Standardmethoden chromatographisch aufgereinigt oder z.B. im Western-Blot nachgewiesen werden kann.

1.6.3. Grundlegende biochemische Charakterisierung

Es ist aufgrund der Literaturlage zu erwarten, dass auch die RecQ-Proteine von *Arabidopsis* als DNA-Helikasen doppelsträngige Bereiche entwinden können, und hierfür Nukleosidtriphosphate hydrolysieren. Ein grundlegendes Merkmal von Helikasen ist die Direktionalität: Bindet z.B. eine Helikase an einen Strang und bewegt sich von 3' nach 5', so handelt es sich um eine 3'-5'-Helikase. Neben den bloßen Nachweisen der Strangentwindung, der NTP-Hydrolyse und der Direktionalität, ist es wichtig, Reaktionsbedingungen zu definieren, bei denen die Katalyse am besten abläuft. Damit wird zum einen verhindert, dass durch die Verwendung suboptimaler Bedingungen geschlossen wird, dass ein bestimmtes Substrat nicht umgesetzt werden, und zum anderen die Grundlagen für eine Analyse mehrerer Proteine in einer Reaktion gelegt. Denn für letzteres ist es wichtig, Bedingungen zu haben, in denen die einzelnen Partner funktionell sind.

1.6.4. Substrate für RECQ-Helikasen

Wie bereits in Kapitel 1.3 deutlich geworden ist, spielen RecQ-Helikasen wichtige Rollen beim DNA-Metabolismus. Ebenso konnte diesem Kapitel entnommen werden, dass RECQ-Substrate meist spezielle DNA-Strukturen sind (z.B. Replikationsgabel), die wiederum aber nicht unbedingt spezifisch mit z.B. einem bestimmten Reparaturweg verknüpft sein müssen. Bei der biochemischen Analyse der RecQ-Helikasen geht es zum einen, wie im ersten Abschnitt dieses Kapitels erläutert, um Ideen für eine Modell-Bildung oder um die Verifizierung bestimmter Vorstellungen. Zum anderen können natürlich einzelne RecQ-Proteine auf biochemischer Ebene differenziert werden, oder aber auch als funktionelle Homologe zugeordnet werden (siehe Kapitel 1.4).

Folgende DNA-Strukturen werden oft für die Charakterisierung von RecQ-Helikasen verwendet: Partielle Duplexe mit 3' oder 5' Überhängen sowie Doppelstrang-DNA ohne Überhänge (stumpf), Gabelungen (Splayed arm), Flap-Strukturen (3 Wege-Gabelungen) und Replikationsgabeln, D-Loop-Strukturen und Bubble-Strukturen, Holliday-Junctions und abberante Strukturen wie Triple-Helices und Quadruplexstrukturen.

Manche davon erlauben neben dem Nachweis der Strangentwindung auch den Nachweis einer sogenannten „Strand-Annealing“-Aktivität, bei der komplementäre Einzelstrangbereiche zusammen gebracht werden. Eine solche Aktivität konnte z.B. für alle menschlichen RECQ-Helikasen gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Strukturen werden im Ergebnisteil und in der Diskussion genauer erläutert. Ebenso werden in der Diskussion die bereits bekannten biochemischen Daten für RecQ-Homologe anderer Organismen dargestellt und gleichzeitig in Beziehung zur vorliegenden Arbeit gesetzt.

2. Zielsetzung

RecQ-Helikasen spielen eine wichtige Rolle beim Erhalt der genomischen Stabilität. Während *E. coli* nur ein einziges Homolog besitzt, findet man im Menschen fünf Homologe. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden sogar sieben RecQ-Homologe identifiziert. Mehrere Indizien deuten auf eine funktionelle Spezialisierung hin. Für ein tiefgehendes Verständnis der Evolution von RecQ-Homologen ist es unabdinglich, die Familienmitglieder aus verschiedenen Reichen des Lebens zu vergleichen, um zu sehen, welche Funktionen konserviert wurden und auch zu analysieren, ob gleichartige oder unterschiedliche Spezialisierungen zu finden sind.

Eine Zuordnung von pflanzlichen und menschlichen RecQ-Helikasen ist auf der Sequenzhomologie-Ebene nicht möglich. Auch zeigt die Bioinformatik interessante Motive und Domänenorganisationen bei den RecQ-Homologen von *Arabidopsis thaliana* auf, was auf pflanzenspezifische RecQ-Funktionen hindeuten könnte. Mit dem Ziel der Arbeitsgruppe, die Funktion der RecQ-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* aufzuklären, war das **Ziel dieser Arbeit** die DNA-Helikasen AtRECQ2 und AtRECQ3 biochemisch zu analysieren und Gemeinsamkeiten und Unterschiede in ihren Aktivitäten und im Vergleich zu bekannten RecQ-Proteinen anderer Organismen herauszuarbeiten.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollten zunächst AtRECQ2 und AtRECQ3 funktionell exprimiert und aufgereinigt werden. Dazu sollte ein Expressionssystem gewählt, und die nötigen DNA-Konstrukte kloniert werden. Durch die Einführung eines Aminosäureaustauschs im Walker A-Motiv der Helikasen sollte ein nicht funktionelles RecQ-Protein (hinsichtlich ATPase-Aktivität und Strang-Entwindung) geschaffen werden, das unter anderem als Negativkontrolle für die Aufreinigungen eingesetzt werden sollte. Es sollten aussichtsreiche Expressionsbedingungen gefunden werden und die Aufreinigung optimiert werden. Dazu sollten verschiedene Aufreinigungsmethoden analysiert und gegebenenfalls kombiniert werden.

Nach der Gewährleistung der Qualität der AtRECQ-Proteinproben, sollten die grundlegenden biochemischen Eigenschaften von AtRECQ2 und AtRECQ3, wie pH- und Salzabhängigkeit, mögliche Metall- und NTP-Cofaktoren und die Direktionalität analysiert werden. Weiterhin sollten die rekombinogenen Strukturen D-Loop, Holliday-Junction und eine Replikationsgabel hergestellt, und die durch AtRECQ2 und AtRECQ3 katalysierten Reaktionen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. *Escherichia coli* Stämme

Klonierungsstämme (bzw. F⁺-Stamm für die Gewinnung von M13mp18-DNA)

DH5 α , Genotyp: F⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r κ ⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

JM110, Genotyp: *rpsL* (*Str'*) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44* Δ (*lac-proAB*) [F' *traD36 proAB lacIqZAM15*] (Gene auf dem F-Plasmid sind Wildtyp)

Expressionsstämme

BL21(DE3), Stratagene, Genotyp: B F⁻ *dcm ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *gal* λ (DE3)

BL21(DE3) pLysS, Stratagene, Genotyp: B F⁻ *dcm ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *gal* λ (DE3)

[pLysS Cam^r]

BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL, Stratagene, Genotyp: B F⁻ *dcm*⁺ Tet^r *ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*argU proL* Cam^r] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]

Alle Expressionsstämme besitzen das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des Lac-Operators und das zugehörige Repressor-Gen LacI. Dadurch ist eine Induktion der T7-RNA-Polymerase durch IPTG möglich. Die Zielgene auf dem eingebrachten Expressions-Plasmid stehen wiederum unter Kontrolle des T7-Promotors, so dass die Expression induzierbar ist. Um eine striktere Kontrolle zu haben, haben viele Plasmide, auch die in dieser Arbeit verwendeten, ein zusätzliches LacI-Gen und einen kombinierten T7/lacO-Promotor.

3.1.2. *Plasmide*

pCAL-n-FLAG, Stratagene

pCAL-n-FLAG-AtRECQ2, Helena Plchova

pCAL-n-FLAG-AtRECQ3, Helena Plchova

pCAL-n-FLAG-c-HIS, in dieser Arbeit kloniert (Vektorkarte Kapitel 3.2, Abbildung 13)

pIEx-3, Novagen

pIEx-3-LK, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1, Novagen

pETDuet1-LK, in dieser Arbeit kloniert

3.1.3. Oligonukleotide

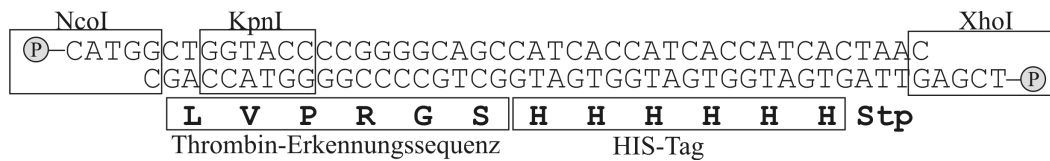
Die Oligonukleotide wurden über die Firmen Metabion, MWG und biomers.net bezogen.

3.1.3.1. Primer für die Klonierungen und Sequenzierungen

Oligonukleotide für Adaptoren:

für pIEx-3-LK und pETDuet1-LK:

- A1) P-CAT GGC TGG TAC CCC GGG GCA GCC ATC ACC ATC ACC ATC ACT AAC
 A2) P-TCG AGT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG CTG CCC CGG GGT ACC AGC



für pCAL-n-FLAG-c-HIS:

- A3) 5'-TTG TTC CTC GTG GAT CCC ATC ACC ATC ACC ATC ACT AAC
 A4) 5'-CAT GGT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG GAT CCA CGA GGA ACA A



Mutageneseprimer:

AtRECQ2-K117M - (Codon für Methionin in Fettschrift)

- M1-forw) 5'-GT GGT GGG **ATG** AGT CTT TG
 M2-rev) 5'-CA AAG ACT **CAT** CCC ACC AC

AtRECQ3-K64M - (Codon für Methionin in Fettschrift)

- M3-forw) 5'-GA GGA GGA **ATG** TCG ATT TG
 M4-rev) 5'-CA AAT CGA **CAT** TCC TCC TC

Klonierungsprimer:

AtRECQ2 in pCAL-n-FLAG-c-HIS - (LIC-Sequenzen unterstrichen, Start des ORF fett)

- K1-forw) 5'-GAC GAC GAC AAG **ATG** GAA AGT GAA GCA ATT CAA
 K2-rev) 5'-CC ACG AGG AAC AAG AGC TTC TTC TTC TCC GCT

AtRECQ3 in pIEX-3-LK - (BspHI bzw. KpnI Schnittstelle unterstrichen, Start des ORF fett)

- K3-forw) 5'-CTAG TCATG **AAG** AAA TCG CCG TTG
 K4-rev) 5'-CTAG GGTAC **CAG** TTG AAG CTT CAT TAT CTT TG

EcRECQ in pETDuet1-LK - (Startcodon fett, NcoI bzw. KpnI Schnittstellen unterstrichen)

- nested1-forw) 5'-AAA TCC TGG TGG CAA CTG TCC AAT AG
 nested2-rev) 5'-GTA AAC GCC TTA TCC GAC TTA CTC T
 K5-forw) 5'-CTAG CCATG **GCG** CAG GCG GAA GTG
 K6-rev) 5'-CTAG GGTAC **CAG** CTC TTC GTC ATC GCC ATC

Sequenzierungsprimer:

AtRECQ2 bzw. AtRECQ2-K117M

| | |
|-----------------------|---|
| S1 fw (pCAL-n5-21mer) | 5'-GAA TTT CAT AGC CGT CTC AGC (Vektorprimer) |
| S2 rv (pET3-18mer) | 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG (Vektorprimer) |
| S3 fw (RQ4-1) | 5'-GTA TAG GGC TAA CCA GAA GG (ORF: 267-286) |
| S4 fw (RQ4-2) | 5'-TAC AAG AAC TTA AGC ATT CTG (ORF: 697-717) |
| S5 fw (RQ4-3) | 5'-TCGTGATGGCCTCCCATC (ORF: 1215-1232) |

AtRECQ3 bzw. AtRECQ3-K64M

S1, T7term-Primer der Sequenzierungsfirma (AGOWA)

| | |
|----------------|--|
| S6 fw (DK14) | 5'-ACA CTG GCG GCG ACA AGA T (Vektorprimer (pIEx-3)) |
| S7 rv (DK15) | 5'-GCA AAA CCC CAC ACC AAC AA (Vektorp. (pIEx-3)) |
| S8 rv (BLrev2) | 5'-GCTCATCTCTGCTTGCGGT (ORF: 1828-1810) |
| S9 rv (BLrev3) | 5'-CTTCGGCATCCAGAACCTTC (ORF: 1211-1192) |

EcRECQ

| | |
|------------------|---|
| S10 fw (FW1-new) | 5'-GAT GCG TCC GGC GTA GAG (Vektorprimer) |
| S11 rv (RW2) | 5'-GGT TAT GCT AGT TAT TGC (Vektorprimer) |
| S13 rv (DK20) | 5'-ATC ACT TCC ACC ACA TAA C (ORF: 1322-1304) |
| S14 fw (DK21) | 5'-GGG CAT CAA TAA ACC AAA C (ORF: 900-918) |
| S15 rv (DK22) | 5'-TCC GGT TTC CTG ATA ATA G (ORF: 981-963) |

3.1.3.2. Oligonukleotide für ATPase- und Helikase-Assays

ATPase-Assay

In dieser Arbeit dargestellt sind v.a. Ergebnisse mit Plasmid- bzw. M13mp18ss-DNA. Als kürzere DNA wurde das 80mer dT-Oligonukleotid eingesetzt, das aus 80 Thymidinen besteht.

Helikase Assay

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit für Helikase-Assays verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotide, die in einem bzw. ähnlichen Experimenten verwendet wurden, sind voneinander durch einen dickeren horizontalen Balken getrennt. Innerhalb dieser Blöcke ist folgende Farbgebung gewählt: Orange und rot dunkelblau und hellblau sowie rosa und violett und grau und blaugrau stellen komplementäre Sequenzen dar. Überhänge (wie in dieser Arbeit verwendet) sind in grün dargestellt. Unterschiede in ansonsten ähnlichen Sequenzen sind braun. Der mobile Teil der Holliday-Junction ist schwarz (Nr. 27-30). Die Strukturen sind im Ergebnisteil symbolisch dargestellt, und werden im Teil 3.2.5.2 definierten Strukturen zugewiesen.

| Nr. | Sequenz (5' nach 3') | Anzahl (nt) | Bestellcode |
|-----|---|----------------|-------------|
| 1 | AAAAAAAAAAGTCGACTCTAGAGGATCAAAAAAAAAA | 37 | D5 |
| 2 | GTCGACTCTAGAGGATC | 17 | D6 |
| 3 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAATATTGCTAGCGGGAATTTCG GCGCG | 46 | D1 |
| 4 | CGCGCCGAATTCCCGCTAGCAAT | 23 | D2 |
| 5 | ATTCTGCAGCCAAGCTTCCGCGC | 23 | D3 |
| 6 | TCTGCAGCCAAGCTTCCGCGC | 21 | D21 |
| 7 | TGCAGCCAAGCTTCCGCGC | 19 | D19 |
| 8 | CAGCCAAGCTTCCGCGC | 17 | D17 |
| 9 | GCCAAGCTTCCGCGC | 15 | D15 |

| | | | |
|----|---|----|-----------|
| 10 | CGCGCCGAATTCCCG | 15 | D15-2 |
| 11 | GGCGCCGAATTCCCG | 15 | D15-2-neu |
| 12 | GCGCGGAAGCTTGGC | 15 | D1-13-2 |
| 13 | GCGCGGAAGCTTGGCTGC | 18 | D1-13-5 |
| 14 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAG | 20 | D1-13-7 |
| 15 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAAT | 23 | D1-13-10 |
| 16 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAATATT | 26 | D1-13-13 |
| 17 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAATATTGCT | 29 | D1-13-16 |
| 18 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAATATTGCTAGCG | 33 | D1-13-20 |
| 19 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAATATTGCTAGCGGGAAT | 38 | D1-13-25 |
| 20 | GCGCGGAAGCTTGGCTGCAGAATATTGCTAGCGGGAATTCG GCGCC | 46 | D1-neu2 |
| 21 | GCGCGGAAGCTTGGCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAA | 46 | D1-neu3 |
| 22 | GACGCTGCCGAATTCTACCAATGTCCTTGTAGGACATCTTTG CCCACCTGCAGGTTACCC | 61 | DL-1 |
| 23 | GGGTGAACCTGCAGGTGGCGGCTGCTCATCGTAGGTTAGT TGGTAGAATTCGGCAGCGTC | 61 | DL-2 |
| 24 | AAAGATGTCCTAGCAAGGCAC | 21 | DL-3 |
| 25 | TAAGAGCAAGATGTTCTATAAAAGATGTCCTAGCAAGGCAC | 41 | DL-4 |
| 26 | AAAGATGTCCTAGCAAGGCACGATCGACCGGATATCTATGA | 41 | DL-5 |
| 27 | GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGTAGGACATCTTTGCCACG TTGACCCG | 50 | X12-1 |
| 28 | CGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTC TATGACGTC | 50 | X12-2 |
| 29 | GACGTCATAGACGATTACATTGCTAGGACATGCTGTCTAGAG ACTATCGC | 50 | X12-3 |
| 30 | GCGATAGTCTCTAGACAGCATGTCCTAGCAAAGCCAGAATTCCG GCAGCGTC | 50 | X12-4 |
| 31 | GCTATCGTACATGATATCCTCACACTCTGAATAGCCGAATTC TTAGGGTTAGGGTTAACATCAAGTCACG | 70 | 70lag |
| 32 | CGTGACTTGATGTTAACCCCTAACCCCTAAGAATTCCGGCTTAAG TGAGTGTGAGGATATCATGTACGATAGC | 70 | 70lead |
| 33 | GAGTGTGAGGATATCATGTACGATAGC | 27 | 27lag |
| 34 | GCTATCGTACATGATATCCTCACACTC | 27 | 27lead |

Ergebnisse mit den Oligonukleotiden D6, D15-2, D1-neu3 sind nicht gezeigt, aber im Text erwähnt.

3.1.4. Ausgewählte Chemikalien

Analyse von Metall-Kofaktoren:

Calciumchlorid – Merck
Magnesiumchlorid – AppliChem
Manganchlorid – Serva
Zinkchlorid – Serva

ATPase Assay:

Ammoniumheptamolybdat – Merck
Malachitgrün-Oxalat – Merck
tri-Natriumcitrat-2-hydrat • 2H₂O – Merck

Expression und Aufreinigung:

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) – Duchefa Biochemie
Thioglycerin – Fluka
Triton-X-100 – AppliChem

Helikase/ATPase-Assay:

ATP – Sigma-Aldrich Chemie
[γ -³²P] ATP, 3000Ci/mmol, 10 mCi/ml – GE Healthcare
BSA (Rinderserumalbumin) – NEB
Bis-Tris-Propan – AppliChem
DTT (Dithiothreitol) – AppliChem
Tris-Base – AppliChem/ Roth
Kaliumacetat – Roth

Nukleosidtriphosphate:

ATP, CTP, GTP, UTP – Fermentas
dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Roth

3.1.5. Marker, Enzyme und Kits

Enzyme:

Antarctic Phosphatase – NEB
BamHI – GE Healthcare
Eam1104I – Fermentas
EcoRI – GE Healthcare/ NEB
Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP – Fermentas
KpnI – Fermentas
Lysozym – Roche Diagnostics
MfeI – NEB
NcoI – GE Healthcare
Phusion Polymerase – Finnzymes MJ Bioworks
RNaseA – Serva
SmaI – NEB
SspI – NEB
Taq DNA Polymerase – Biomaster
T4 Polynukleotid Kinase – NEB
T4 DNA Ligase – Fermentas
T4 DNA Polymerase – Roche Diagnostics
XhoI – NEB

Kits:

Biotrap* BT 1000 Starter Kit – Schleicher und Schuell (Whatman)
High Pure Product Purification Kit – Roche Diagnostics
Miniprep Kit QIAprep® for Purification of Plasmid DNA – Qiagen
QIAEX II® Gel Extraction Kit – Qiagen
QIAgen Plasmid Midi Kit – Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen

Marker:

Prestained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas
 Protein Molecular Weight Marker – Fermentas
 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder – Fermentas

3.1.6. Ausgewähltes VerbrauchsmaterialAffinitätsmaterial:

Calmodulin Affinity Resin for Purification of CBP-tagged Proteins – Stratagene
 HiTrap Chelating HP Säulen (1 ml) – GE Healthcare

Gelfiltrationsmaterial:

MicroSpin™ G-25 Columns – GE Healthcare
 MicroSpin™ S-400 HR Columns – GE Healthcare
 PD10 Säulen, Sephadex G25-M – GE Healthcare
 Probe Quant™ G50 Micro Columns – GE Healthcare
 Sephacryl™ S-400 High Resolution Säulenmaterial – GE Healthcare

Weitere:

Cellulose-Acetat Filter (0,45 µm Porengröße) – Sartorius AG
 D-Tube™ Dialyzer Midi, MWCO 3,5 kDa – Novagen
 Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran (0,45 µm Porengröße) – Roth
 Neptune™ Flat Cap PCR Tubes 0,2 ml – CLP
 PolyPrep® Chromatography Columns (0,8 x 4 cm), Nr. 731-1550 – BioRad Laboratories
 Roti®-PVDF Membran – Roth
 Servapor® Dialyseschläuche, 16 mm Durchmesser, MWCO 12-14 kDa – Serva

3.1.7. Ausgewählte Geräte und SoftwareAutoradiographie:

BAS-Kassetten 2040 – FUJIFILM Japan
 BIO-Imaging-Analyser BAS-1500 – FUJIFILM Japan
 Gel Trockner, Phero-Temp 60 – Biotec- Fischer
 Imaging Platten, 20 x 40 cm – FUJIFILM Japan
 Instant Imager – Canberra Packard Company
 Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100 TR – Packard Instrument Company

Aufreinigung (& Blots sowie Expression):

Niederdruck-Flüssigchromatographie-System BioLogic LP – BioRad Laboratories
 Roller Mixer SRT1 Stuart Scientific – Bibby Sterilin
 Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD 2070 – Bandelin
 Taumelschüttler Rocky – R&S Laborfachhandel
 Western-Blot-Apparatur Novablot 2117 Multiphor II – LKB, Bromma

Enzymassays:

Hitze-/ Kühlblock ThermoE – Biostep
 Thermo Cooler – BIOzym
 ThermoStat Plus – Eppendorf
 Thermo Shaker TS-100 – lab4you

Thermomixer compact – Eppendorf
Vortex-Centrifuge – NeoLab

Gelelektrophorese-Systeme:

Whatman Multigel-Long – Biometra
Mini-Wide-Protein-Kammer TV 200Y – Techne AG
PerfectBlue Doppelsystem Twin ExW S – Peqlab Biotechnologie GmbH

Software:

DNASTar Version 5.03 – Lasergene, DNASTAR Inc.
<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
ImageJ, Version 1.36b – Wayne Rasband, National Institute of Health USA
Freeware: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
LP Data View™ Version 1.01, Bio Logic – BioRad Laboratories
Packard Imager für Windows Version 2.05 – Canberra Packard Company
pipett, Version 1.0.2006.11.03 – Amerigomedia, Thomas Gottfried

3.1.8. Medien, Puffer und Lösungen

Die Lösungen wurden nach dem Herstellen autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen angesetzt. Lösungen, die aus nicht autoklavierbaren Chemikalien angesetzt wurden, wurden in Lösung steril filtriert. Alle Lösungen wurden mit doppelt-deionisiertem Wasser hergestellt.

Acrylamidgele (Lösungen und Puffer)

30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5: 1 – Rotiphorese, Roth
40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 19,0: 1 – Rotiphorese, Roth
Die Acrylamid-Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und anschließend mit Mischbett-Ionenaustauscher TMD-8 (Sigma) versetzt, Lagerung bei 4 °C
APS (=Ammoniumpersulfat): 10 % (w/v) in ddH₂O, Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C
SDS (=Sodiumdodecylsulfat)-Lösung: 10 % (w/v) in ddH₂O
SDS-PAGE Trenngelpuffer (4 x): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, Lagerung bei 4 °C
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4 x) : 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Lagerung bei 4 °C
SDS-PAGE Laufpuffer (10 x) : 250 mM Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3
SDS-PAGE Probenpuffer, denaturierend (2 x): 125 mM Tris, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % Thioglycerin, pH 6,8
TBE-Puffer (10 x): 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
TBE-Urea-Ladepuffer (2x): 89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 7M Harnstoff, 12 % Ficoll, 0,01 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylene-Cyanol FF
TBE / Ficoll-Lösung (1,7x): 0,08 g/ml Ficoll, 33 % (v/v) TBE-Puffer (5x)

Agarosegelelektrophorese:

TAE-Puffer (50 x): 242 g Tris-Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer (6 x): 0,2 % Orange G, 0,05 % Xylencyanol, 10 % Glycerin, 60 mM EDTA
Kristallviolett (KV)-Ladepuffer (6x): 30 % Glycerin, 0,02 M EDTA, 0,1 mg/ml KV in ddH₂O

Antibiotika-Stocklösungen:

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in ddH₂O, Lagerung bei – 20 °C, Arbeitskonz. 75 µg/ml

Carbenicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in ddH₂O, Lagerung bei – 20 °C,

Arbeitskonzentration 75 µg/ml

Chloramphenicol-Stammlösung: 34 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei – 20 °C,

Arbeitskonzentration 34 µg/ml

ATPase-Assay:

Standardreaktionsbedingungen (1x): 40 mM Tris-Acetat, 50 mM Kaliumacetat, 6 mM DTT, 50 µg/ml BSA (NEB), 0,54 mM ATP, 0,54 mM MgCl₂, 25 µM DNA-Substrat (Nukleotidkonzentration), pH 8,0

Farbreagenz: Malachitgrün-Lösung und Molybdat-Lösung im Verhältnis 3: 1 mit 0,1 % (v/v) Triton-X-100; lichtgeschützt halten, mindestens 20 min auf Rollenschüttler, dann durch Einmal-Spritzenfilter filtrieren. Plastikeinweg-Material verwenden.

Malachitgrün-Lösung: 0,054 % Malachitgrün-oxalat in ddH₂O (lichtgeschützt lagern)

Molybdat-Lösung: 4,2 % Ammoniummolybdat in 4 N HCl

Citrat-Lösung: 34 % Natriumcitrat in ddH₂O

DNA-Substrataufreinigung

Diffusionspuffer: 0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, (pH 8,0)

Substratpuffer M13: 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5

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

TBMgCl₂ (10x): 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 100 mM MgCl₂ (pH nicht einstellen)

Helikase-Assay:

Reaktionspuffer (5 x): 200 mM Tris-Acetat, 250 mM K-Acetat, pH 8,0 bei 37 °C

Standardreaktionsbedingungen (1x): 40 mM Tris-Acetat, 50 mM Kaliumacetat, 6 mM DTT, 50 µg/ml BSA (NEB), 1,8 mM ATP, 1,8 mM MgCl₂, 150 pM DNA-Substrat (Molekülkonzentration nicht Nukleotidkonzentration), pH 8,0

Stopplösung (und Ladepuffer für den Strand-Displacement-Assay) (3 x): 50 mM EDTA, 0,6 % SDS, (anfangs 40 % später) 20 % Glycerin, 0,1 % Xylencyanol, 0,1 % Bromphenolblau

Medien:

LB-Agarplatten: 1,5 % (w/v) Micro Agar in LB-Medium; nach Autoklavieren und Abkühlung auf ca. 50 °C Zugabe der jeweiligen Antibiotika & Gießen in Petrischalen, Lagerung bei 4 °C.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

M9-Mineralmedium-Platten: 3,2 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,75 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,125 g Natriumchlorid, 0,25 g Ammoniumchlorid, auf 225 ml mit ddH₂O. Zu 180 ml M9-Medium wurden 3,0 g Mikroagar gegeben und autoklaviert

Zusatz: 1,5 ml 1 M MgSO₄, 1,2 g Glucose, 0,03 g Thiamin, 0,03 ml 1 M CaCl₂, auf 30 ml mit ddH₂O. Der Zusatz wurde steril filtriert und 20 ml zur flüssigen Agar-Mischung gegeben.

YT-Medium mit 5 mM MgCl₂: 2,4 g Trypton, 1,5 g Hefeextrakt, 0,75 g NaCl, 1,5 ml 1 M MgCl₂ auf 300 ml mit ddH₂O

Proteinaufreinigungen

Alle Lösungen wurden durch einen 0,45 µM Cellulose-Acetat Filter filtriert und entgast. Falls im Rezept angegeben, wurden sie direkt vor Gebrauch mit Thioglycerin versetzt. Hier sind die Lösungen angegeben, die für die endgültigen Aufreinigungen verwendet wurden. Variationen sind den Angaben im Ergebnisteil zu entnehmen.

Puffer A für Ni-IMAC: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % Glycerin, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5

Puffer B für Ni-IMAC: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 400 mM Imidazol, 5 % Glycerin, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5

Bindepuffer für CAC: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM Mg(CH₃COO)₂, 1 mM Imidazol, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5

Waschpuffer 1 CAC: Bindepuffer für CAC + 0,5 % Triton-X-100

Waschpuffer 2 CAC: 50 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5

Elutionspuffer für CAC: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2 mM EGTA, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5

Endpuffer: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5

Proteinlagerpuffer (1 x): 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 55 % Glycerin, 5 mM Thioglycerin, pH 7,5

Stripping Puffer für die Ni-IMAC (1x): 0,05 M EDTA, 0,02 M NaH₂PO₄, pH 7,2

Kolloidal-Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung: 98 % (v/v) Coomassie-Lösung A und 2 % (v/v) Coomassie-Lösung B wurden auf dem Magnetrührer gemischt; direkt vor Gebrauch wurden 80 % Färbelösung mit 20 % Methanol versetzt.

Coomassie-Lösung A: 2 % (w/v) ortho-Phosphorsäure (85 %) und 10 % (w/v) Ammoniumsulfat in ddH₂O

Coomassie-Lösung B: 5 % (w/v) SERVA Blue CBB-G250, in ddH₂O

Western-Blot

AK-Lösung (1x): PBS-Puffer (später TBS) + 0,25 % Tween 20, 1 % BSA, Spur Natriumazid

Anti-His-Tag Monoclonal Antibody (aus der Maus) (Novagen): 1:1000 in AK-Lösung

Anti-FLAG M2 Antibody (Stratagene): 1:1000 in AK-Lösung

Goat Anti-Mouse Alkaline Phosphatase Conjugate (Novagen): 1:10000 in AK-Lösung

Färbelösung Western Blot: 10ml AP-Puffer, 30 µl BCIP-Lösung und 40 µl NBT-Lösung

BCIP (= 5-Brom-4-Chlor-3-Indol-Phosphat) (Roth): 50 mg/ml in 100 % DMF

NBT (= Nitroblau Tetrazolium) (Roth): 75 mg/ml in 70 % DMF

AP Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer) für NBT/ BCIP (1x): 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM MgCl₂, pH 9,5

AP-Stopp-Puffer (1x): 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0

PBS (= Phosphate buffered saline)-Lösung (1 x): 0,01 M Natriumphosphat, 0,9 % (w/v) NaCl, pH 7,2

TBS-Puffer (1x): 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0

TBS-T-Puffer (1x): TBS-Puffer + 0,1 % Tween20, pH 8,0

Western-Blot Anodenpuffer I für PVDF-Membran: 0,3 M Tris-HCl, 10 % Methanol, pH 9,4

Western-Blot Anodenpuffer II für PVDF-M.: 0,025 M Tris-HCl, 10 % Methanol, pH 9,4

Western-Blot Kathodenpuffer für PVDF-M.: 0,025 M Tris-HCl, 0,04 M Aminocaproat, 10 % Methanol, pH 9,4

3.2. Methoden

3.2.1. Klonierungen

In dieser Arbeit werden die Klonierungen schematisiert skizziert. Im Materialteil sind die verwendeten Enzyme, Lösungen und Kits aufgeführt. Auf genaue Angaben zu PCR, DNA-Aufreinigungen (Gelextraktionen und Kits), Restriktionsverdau, Ligation, Transformation in Hitzeschock-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen und Screening wird jedoch verzichtet. Eine Ausnahme stellt die Ligations-unabhängige Klonierung in den eigens geschaffenen Vektor, sowie die Mutagenese ohne Verwendung des Site-exchange-Kits durch Overlap-Extension-PCR dar, da diese nicht zu den in jedem Labor etablierten Standardmethoden gehören.

AtRECQ3 mit HIS-Tag in pCAL-n-FLAG

AtRECQ3 wurde zunächst für die Expression in Insektenzellen kloniert. Dafür wurde der Vektor pIEx-3 mit NcoI und XhoI geschnitten und dephosphoryliert. Aus den Oligonukleotiden A1 und A2 wurde durch Erhitzen und langsames Abkühlen der in Kapitel 3.1.3.1 schematisch dargestellte Adapter (LK) gebildet und dieser in den Vektor ligiert. In einem zweiten Schritt wurde dieser verifizierte und amplifizierte pIEx-3-LK-Vektor mit NcoI und KpnI geschnitten und dephosphoryliert. Der ORF von AtRECQ3 wurde ausgehend von dem Template pCAL-n-FLAG-AtRECQ3 (Helena Plchova, Standard-LIC-Klonierung nach Herstellerangaben) mit den Primern K3-forw und K4-rev in einer PCR mit der Phusion-DNA-Polymerase nach Herstellerangaben (GF-Puffer) mit 25 Zyklen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit BspHI (erzeugt kompatible Schnittstellen zu NcoI) und KpnI geschnitten und in den vorbereiteten Vektor ligiert. Die korrekte Nukleotidabfolge wurde durch Sequenzierung verifiziert. AtRECQ3 hat in diesem Konstrukt einen C-terminalen HIS-Tag.

Um pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS zu erhalten, wurde das Restriktionsenzymfragment BamHI/XhoI von pCAL-n-FLAG-AtRECQ3 gegen das entsprechende BamHI/XhoI-Stück von pIEx-3-LK-AtRECQ3 (was dem C-terminalen Teil von AtRECQ3 samt HIS-Tag entspricht) ausgetauscht. Durch Sequenzieren konnte gezeigt werden, dass die Nukleotidabfolge im ORF korrekt war.

AtRECQ3-K64M in pCAL-n-FLAG

Um im Walker A Motiv die Punktmutation einzuführen, die eine Substitution von Lysin zu Methionin bewirkt, wurde zunächst eine Overlapextension-PCR durchgeführt. Das Prinzip ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Nomenklatur dieser Abbildung folgend, wurden folgende Primer eingesetzt: 1 – S1 fw, 2 – S9 rv; 3 – M4rev und 4 – M3-forw. Auch diese PCRs

wurden mit der Phusion-DNA-Polymerase durchgeführt. Um pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M zu erhalten, wurde das Restriktionsenzymfragment EcoRI/MfeI von pCAL-n-FLAG-AtRECQ3 gegen das entsprechende EcoRI/MfeI-Stück dieser PCR (das die Mutation beinhaltet) ausgetauscht.

pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M-HIS

Schließlich wurde das Restriktionsfragment EcoRI/NdeI von pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS gegen das entsprechende EcoRI/NdeI-Stück des Plasmids pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M ausgetauscht.

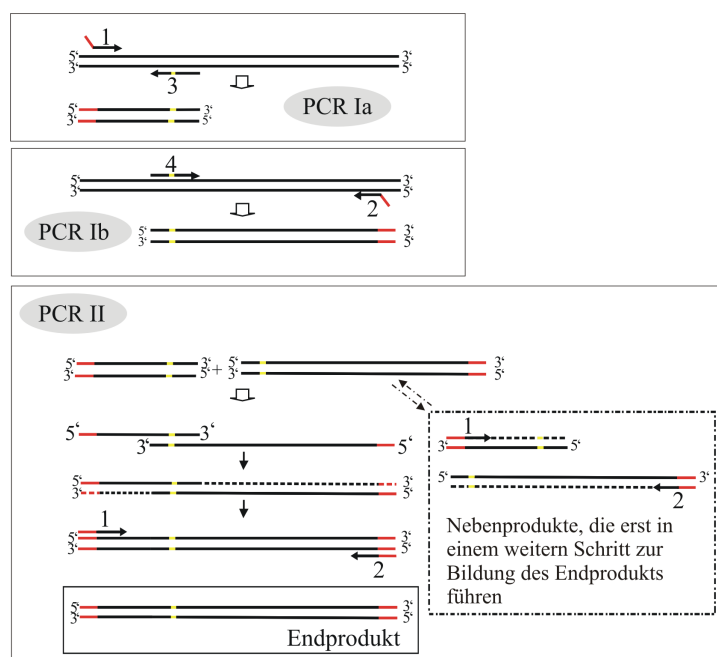


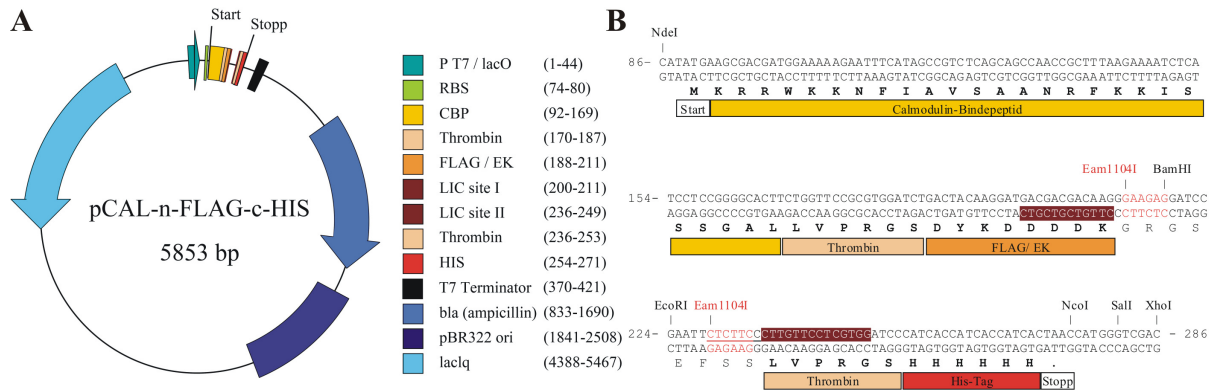
Abbildung 12: Overlap-Extension-PCR zur Einführung von Punktmutationen.

Bei der Overlap-Extension-PCR werden zwei PCR Reaktionen – PCR I und PCR II nacheinander durchgeführt. PCR I gliedert sich in PCR Ia und Ib. Durch die Primer 1 bzw. 2 können nach Wunsch spezifische Überhänge integriert werden, und durch die Primer 3 bzw. 4 wird die Punktmutation eingeführt. Das Ergebnis der unabhängigen PCRs Ia und Ib sind jeweils Fragmente des Templates mit einer Punktmutation, die komplementäre Bereiche haben, da die Primer 3 und 4 im gleichen Bereich der Ursprungssequenz gebunden haben. Die PCR-Produkte der ersten PCR werden für PCR II gemischt und bilden nach der Denaturierung kurze Doppelstränge, in denen die Mutation liegt, mit längeren Einzelstrangüberhängen. Die Polymerase verlängert sie in 5'-3' Richtung. Dadurch wird der Doppelstrang vervollständigt und mithilfe der beiden äußeren Primer kann

das Produkt im weiteren Verlauf der PCR exponentiell amplifiziert werden. Die anderen beiden Stränge der PCRs Ia und Ib können wegen der Direktionalität der DNA-Synthese nach einem Annealen nicht verlängert werden. Jedoch kann, wie im abgesetzten Kasten rechts gezeigt, mit Hilfe der äußeren Primer die komplementäre Sequenz synthetisiert werden, die wiederum produktiv in die Bildung des Endprodukts eingehen kann.

Schaffung von pCAL-n-FLAG-c-HIS

Da sich das kombinierte System von Aufreinigung über Ni-IMAC und Calmodulinaffinitätschromatographie (CAC) als geeignet herausstellte (siehe Kapitel 4.3.1), sollten auch weitere RecQ-Helikasen einen N-terminalen CBP-Tag und einen C-terminalen HIS-Tag bekommen. Wegen Inkompatibilitäten möglicher Schnittstellen der ORFs/Inserts und des Vektors, wurde pCAL-n-FLAG-c-HIS konstruiert. Die Inserts werden durch PCR amplifiziert und müssen nicht mit Restriktionsenzymen verdaut werden. Weiterhin verkürzt sich die Zeit, da eine Ligation nicht mehr notwendig ist (Schema siehe Abbildung 13).



C

Ligations-unabhängige Klonierung (LIC)

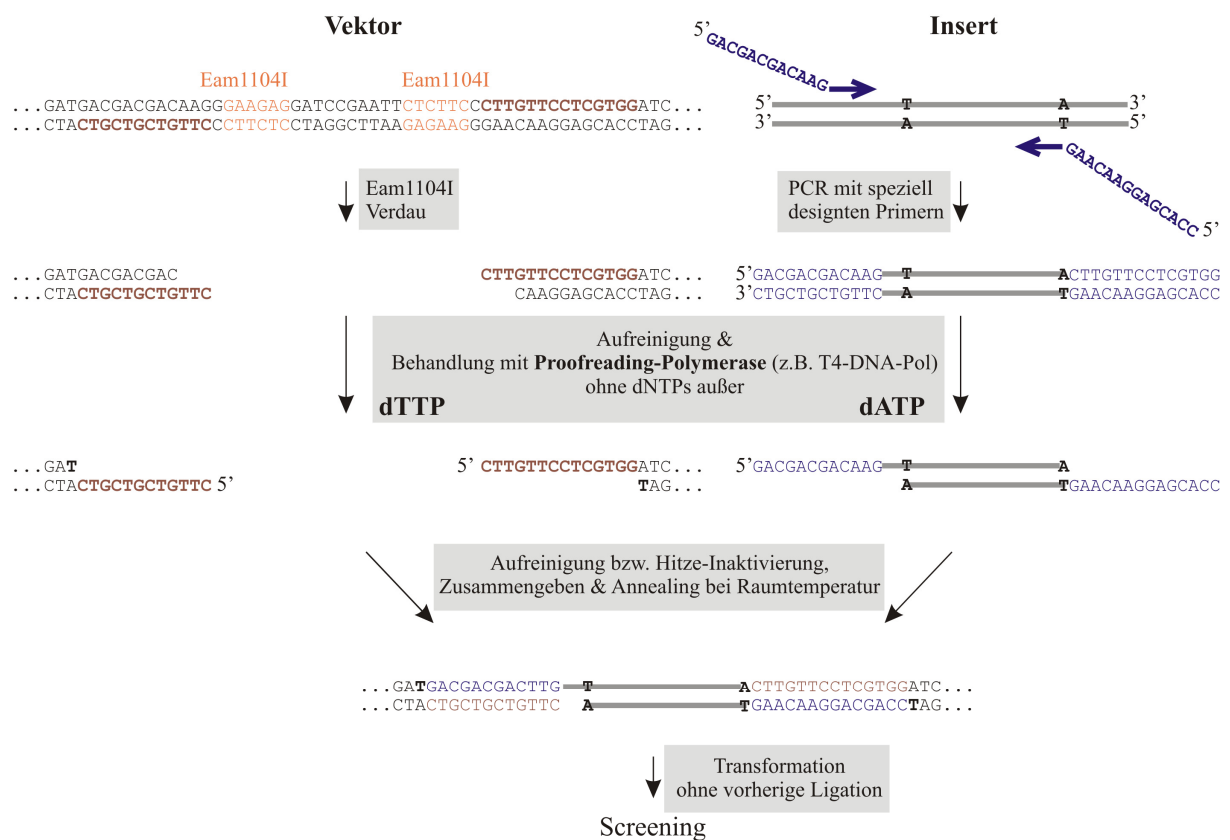


Abbildung 13: LIC mit pCAL-n-FLAG-c-HIS.

A, Schematische Darstellung des in dieser Arbeit geschaffenen pCAL-n-FLAG-c-HIS-Vektors. **B**, Ausschnitt mit relevanten Informationen bezüglich Klonierung und Tags bzw. Protease-Schnittstellen. **C**, Schema der Ligations-unabhängigen Klonierung (Ligation independent cloning, LIC). Der Vektor wird mit dem Restriktionsenzym Eam1104I geschnitten. An den Ziel-ORF werden mit Hilfe von PCR LIC-spezifische Überhänge angebracht. Diese kennzeichnen sich durch das Fehlen der Base Thymin, so dass in dem synthetisierten Gegenstrang kein Adenosin vorhanden ist. Nach der Aufreinigung des geschnittenen Vektors bzw. des Inserts, erfolgt ein Abbau von den 3' Enden durch eine Proofreading-Polymerase. Dies geschieht, weil keine dNTPs zur Verfügung stehen, außer beim Vektor dTTP und beim Insert dATP. Dadurch stoppt der Abbau der 3' Enden. Beim Insert kann dieses Stoppen auch innerhalb des ORFs liegen, wie angedeutet. Nach einer Aufreinigung oder Hitzedenaturierung werden Vektor und Insert zusammengegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei annealen die komplementären Stränge. Dieser Ansatz kann ohne Ligation in *E. coli* DH5a transformiert werden. In den Bakterien werden die Lücken aufgefüllt und die Stränge ligiert. Die restlichen Schritte, wie z.B. das Screening, erfolgen wie bei Standardklonierungen.

Der pCAL-n-FLAG-c-HIS Vektor geht aus dem pCAL-n-FLAG Vektor hervor, der mit SmaI und NcoI geschnitten, und anschließend dephosphoryliert wurde. Die Adapter-Oligonukleotide A3 und A4 wurden getrennt phosphoryliert und durch Erhitzen und langsames Abkühlen annealed, so dass der in Abschnitt 3.1.3.1 beschriebene Adapter entstand. Dieser wurde in den vorbereiteten Vektor ligiert.

pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2

In den soeben beschriebenen pCAL-n-FLAG-c-HIS-Vektor wurde über LIC der ORF von AtRECQ2 kloniert. Für die Amplifikation des ORF aus dem Template pCAL-n-FLAG-AtRECQ2 (Helena Plchova) wurden die Primer K1-forw und K2-rev verwendet. Der Abbau der 3' Überhänge fand mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (1U) für 30 min bei Raumtemperatur im T4-DNA-Polymerase-Puffer mit 2,5 mM dATP (bzw. dTTP für den mit Eam1104I geschnittenen Vektor) und 4,8 mM DTT (in einem Gesamtvolumen von 20 µl) statt. Die Reaktionen wurden dann 20 min bei 75 °C Hitze-inaktiviert. Aliquots von Vektor und Insert wurden gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde EDTA zugegeben (Endkonzentration 6 mM), noch mal 5 min bei RT inkubiert und dann in *E. coli* transformiert. Die korrekte Nukleotidabfolge im ORF wurde durch Sequenzierung bestätigt.

pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2-K117M

Auch AtRECQ2-K117M wurde über LIC, wie gerade beschrieben, in diesen Vektor eingebracht. Die Punktmutation sowie die LIC-kompatiblen Überhänge wurden über die Overlap-Extension-PCR (Abbildung 12) mit den Primern 1 – K1-forw, 2 – K2-rev, 3 – M2-rev und 4 – M1-forw eingeführt. Für die PCR Ia und Ib sowie die PCR II wurden je 25 Zyklen (und die Phusion-Polymerase) verwendet. Die korrekte Nukleotidabfolge im ORF wurde durch Sequenzierung bestätigt.

EcRECQ mit HIS-Tag (in pET-Duet1-LK)

Wie entsprechend im Abschnitt „AtRECQ3 mit HIS-Tag in pCAL-n-FLAG“ für pIEx3-LK beschrieben wurde pETDuet1-LK aus pETDuet1 geschaffen. Der ORF für *EcRECQ* wurde zunächst über nested PCR mit den Primern nested1-forw und nested2-rev aus genomischer DH5α-DNA amplifiziert, und dann mit Hilfe des Primerpaars K5-forw und K6-rev in einer weiteren PCR mit den Schnittstellen NcoI und KpnI versehen und über diese in den entsprechend vorbereiteten Vektor kloniert. Die korrekte Nukleotidabfolge im EcRECQ-ORF mit C-terminalem HIS-Tag wurde durch Sequenzierung bestätigt.

3.2.2. Herstellung von M13mp18 ssDNA

Um M13mp18-Phagen zu erhalten, wurden hitzeschockkompetente JM110 Bakterien mit M13mp18-ssDNA (NEB) transformiert. Das weitere Vorgehen entsprach den Protokollen aus Sambrook und Russell, 2001. Der Transformationsansatz wurde mit vorbereiteten JM110-Zellen (selektiert auf M9-Minimalmediumplatten und hochgezogen wie in Sambrook und Russell, 2001 beschrieben) gemischt und auf die Entstehung von Plaques gewartet. Aus den Plaques wurde ein Phagenstock hergestellt, der der Infektion von 250 ml Kulturen diene.

Die Isolation der Phagen nach Sambrook und Russell, 2001 beinhaltete eine Fällung der Phagen, die durch Knospung ihre Wirtsbakterien verlassen, mit PEG-8000. Die Capside wurden mit Phenol lysiert. Zusätzlich zu den Protokollen aus Sambrook und Russell, 2001 wurde jetzt zur wässrigen Phase 1 mg RNaseA gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Dann folgten wie nach Sambrook und Russell, 2001 eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Chloroformextraktion. Die Fällung erfolgte wie bei Sambrook und Russell, 2001 mit Natriumacetat/Ethanol.

Die gewonnene zirkuläre M13mp18-ssDNA wurde per Ethidiumbromidgelelektrophorese quantifiziert, wobei als Standard gekaufte M13mp18-ssDNA (NEB) eingesetzt wurde.

3.2.3. Expression und Protein-Aufreinigungen

3.2.3.1. Expression

Alle Proteine wurden für die endgültigen Aufreinigungen in BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL Zellen exprimiert. Dazu wurde je 1 µl des entsprechenden Plasmids per Hitzeschock-Transformation in die Zellen eingebracht und auf LB-Ampicillin-Platten selektioniert.

Für AtRECQ2 und AtRECQ2-K117M wurden Glycerinkulturen zum Animpfen der Expressionsvorkulturen angelegt. Dazu wurden ein Pool von transformierten Zellen (ca. 15 Kolonien in 5 ml Medium) in LB-Medium mit 1 % Glukose bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wachsen lassen, mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 20 % versetzt und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei - 20 °C gelagert.

Für die Vorkultur wurde eine geeignete Menge von LB-Medium mit 75 µg/ml Carbenicillin (wie Ampicillin ein β-Lactam-Antibiotikum, allerdings stabiler) und 34 µg/ml Chloramphenicol mit ca. 1 Kolonie/10 ml Medium oder 0,1 % (v/v) Glycerinkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

Die Expressionsbedingungen für die verschiedenen Proteine sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Je 500 ml LB-Medium wurden mit 50 ml Vorkultur angeimpft.

Tabelle 4: Expressionsbedingungen für AtRECQ2, AtRECQ3 und EcRECQ

Dargestellt sind die Bedingungen, die schließlich verwendet wurden, um die endgültigen Proteinfractionen zu erhalten. AtRECQ2-K117M wurde behandelt wie AtRECQ2, AtRECQ3-K64M wie AtRECQ3. Für alle Expressionskulturen wurden 500 ml LB ohne Selektionsantibiotika 50 ml Vorkultur angeimpft. Der Schüttler war auf 200 rpm eingestellt. Die OD₆₀₀ wurde gegen LB gemessen. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die Zellpellets in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen bei - 20 °C eingefroren.

| Protein | Wachstumstemperatur vor Induktion | Induktion bei OD ₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,9 | Wachstumstemperatur nach Induktion | Wachstumsdauer nach Induktion |
|---------|-----------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------|
| AtRECQ2 | 28 °C | 0,2 mM IPTG | 16 °C | ca. 20-24 Stunden |
| AtRECQ3 | 28 °C | 0,2 mM IPTG | 28 °C | ca. 4 Stunden |
| EcRECQ | 37 °C | 1 mM IPTG | 37 °C | ca. 5 Stunden |

Bei Variationen (siehe Ergebnisteil) waren die Bedingungen entsprechend und werden hier nicht einzeln aufgezählt. Falls andere Zelllinien getestet wurden (siehe Ergebnisteil), konnte, je nach Stamm kein Chloramphenicol in der Vorkultur verwendet werden.


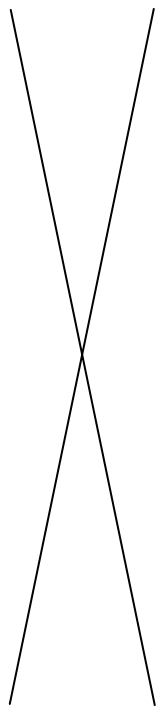
Bei der Analyse des Einfluss der löslichen Solute Betain und Sorbitol auf die Expression von löslichem AtRECQ2 wurden in den Selektionsplatten, der Vorkultur und der Expressionskultur 0,5 M Sorbitol und 2,5 mM Betain verwendet.

3.2.3.2. Aufreinigung

Hier werden nur die Bedingungen dargestellt, die für die endgültigen Aufreinigungen von AtRECQ2, AtRECQ3 beziehungsweise EcRECQ verwendet wurden. Variationen (Ergebnisteil) sind dem Text zu entnehmen. Aus Tabelle 5 geht hervor, wie die Aufreinigungen durchgeführt wurden, wie sie sich unterscheiden und was ihnen gemeinsam ist. Alle Aufreinigungsschritte fanden bei 4 °C statt.

Tabelle 5: Vorgehen bei der Standardaufreinigung von AtRECQ2, AtRECQ3 und EcRECQ.

| | | AtRECQ2 | AtRECQ3 | EcRECQ |
|---------|---|---|---------|--------|
| Ni-IMAC | Kultur-Ausgangsvolumen (als Zellpellet) | 1100 ml (2x 550 ml) | 550 ml | 550 ml |
| | Vorbereitung der Probe | <ol style="list-style-type: none"> 1) Pellet(s) auf Eis auftauen lassen und vorsichtig in Puffer A resuspendieren (25 ml pro Pellet) 2) Zugabe von Lysozym (als frisch angesetzte Stocklösung in Puffer A): 0,1 mg/ml 3) Inkubation auf Eis auf dem Taumelschüttler (30 min) 4) Ultraschallaufschluss auf Eis: 6 Zyklen (Leistung 53 %, Duty Cycle 5, 10 sec), dazwischen jeweils 1 min auf Eis um Überhitzung zu vermeiden 5) Ultrazentrifugation 40.000 g, 30 min, 4 °C 6) Überstand durch Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran filtrieren => Lösliche Fraktion (LF) | | |

| | | | | |
|--|---|--|--|---|
| Ni-IMAC | Vorbereitung der 1 ml Hi Trap Chelating HP Säulen bei Verwendung der BioRad Anlage. Für jedes Konstrukt wurde eine eigene Säule verwendet | <ol style="list-style-type: none"> 1) Schläuche der Anlage mit ddH₂O spülen (und 20% Ethanol verdrängen) 2) Säule einbauen, falls neu: zu Schritt 7 springen Ab hier: Flussrate: 1 ml/min 3) Säule mit ddH₂O äquilibrieren 4) Restliches gebundenes Ni²⁺ mit Hilfe des Stripping Puffers von der Säule waschen, um jedes Mal gleiche Ausgangsbedingungen zu haben 5) Säule mit ddH₂O waschen. Wenn die Leitfähigkeit wieder auf den Normalwert für ddH₂O gesunken ist 6) Säule mit 0,5 ml NiSO₄-Lösung (0,1 M) wieder beladen 7) kurz mit ddH₂O spülen 8) 10 min Puffer A (verteilt NiSO₄ besser auf der Säule) 9) 10 min Puffer B (Maximalkonzentration an Imidazol; soll Säule von allem (v.a. von überschüssigem Ni²⁺) befreien, was sonst später in den Elutionsfraktionen wäre) 10) 10 min Puffer A (zur Äquilibrierung der Säule) | | |
| | Laden der LF | 0,5 ml/min | 1 ml/min | 1 ml/min |
| | Waschen | Ab hier wieder bei allen: Flussrate von 1 ml/ min 45 min mit Puffer A mit 0,5 % Triton-X-100 | | |
| | Waschen | 15 min mit Puffer A | | |
| | Waschen | 20 min 31 % Puffer B | 20 min 29 % Puffer B | 15 min 10 % Puffer B |
| | Elution | 15 min 90 % Puffer B | 15 min 80 % Puffer B | Gradient von 10 bis 22 % B in 60 min |
| | Regeneration der Säule | 20 min 100 % Puffer B, ddH ₂ O, 20 % Ethanol | | |
| | Weiterbehandlung der RECQ-haltigen Elutions-Fractionen | Umpuffern über eine äquilibrierte PD10-Säule in | | |
| Calmodulin-Affinitätschromatographie (CAC) | |  | Endpuffer ODER | Endpuffer |
| | | Bindepuffer für die CAC | | |
| | Calmodulin-Affinitätsmaterial | 2 ml Suspension; 1 ml Säulenmaterial | 1,5 ml Suspension; 0,75 ml Säulenmaterial |  |
| | Vorbereitung der Schwerkraftsäule | Säule in Bindepuffer für die CAC äquilibrieren | | |
| | Laden | Eluat der PD10-Säule mit Bindepuffer auf 10 ml auffüllen und auf die Säule laden | | |
| | Waschen | 10 ml Waschpuffer 1 | 10 ml Bindepuffer | |
| | Waschen | 10 ml Bindepuffer | 15 ml Waschpuffer 2 | |
| | Elution | 5 Mal je 1 ml Elutionspuffer auf die Säule pipettieren und Eluat auffangen | | |
| | Regeneration des Säulenmaterials | Nach Herstellerangaben. Zu Beginn einen Waschschriff mit Elutionspuffer mit 1M NaCl | | |
| | RECQ-haltigen Elutions-Fractionen | Umpuffern über eine äquilibrierte PD10-Säule in Endpuffer | | |
| Aufkonzentrierung und Konservierung | Eluat der PD-10 Säule in vorbereitete Servapor® Dialyseschläuche pipettieren und gegen Saccharose aufkonzentrieren. Konzentrat mit gleichem Volumen 100 % Glycerin versetzen und zunächst bei - 20 °C lagern. | | | |

Das Protein AtRECQ2-K117M wurde entsprechend wie AtRECQ2 aufgereinigt und AtRECQ3-K64M wie AtRECQ3. Für einen Teil der AtRECQ3 (und -K64M)-Proteine wurde nur die Ni-IMAC durchgeführt.

3.2.3.3. Proteinquantifizierung und –lagerung

Nachdem festgestellt wurde, dass die End-Proteinproben keine enzymatischen Kontaminationen, wie Nukleasen, Helikasen und ATPasen von *E. coli*, enthalten, wurden diese in 0,2 ml Neptune™ Flat Cap PCR Tubes aliquotiert und bei - 80 °C eingefroren.

Die Proteinquantifizierung über Kolloidal-Coomassie gefärbte Gele (nach Neuhoff *et al.*, 1988) ist genau im Ergebnisteil (Kapitel 4.5) beschrieben, so dass hier auf eine Vorwegnahme verzichtet wird. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit ddH₂O.

Für die jeweiligen Versuche wurden die geeigneten Proteinaliquots in - 20 °C-kalten PCR-Kühlblöcken aufgetaut und falls gewünscht mit auf - 20 °C gekühltem Proteinlagerpuffer entsprechend verdünnt.

3.2.3.4. SDS-PAGE und Western-Blots

Zur Analyse der Aufreinigungen wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Lämmli, (1970) verwendet. Die Prozentigkeiten der jeweiligen Trenngele sind im Ergebnisteil angegeben. Die verwendeten Puffer sind im Materialteil aufgeführt. Zur besseren Visualisierung der Taschen, wurden dem Sammelgel eine geringe Menge Bromphenolblau zugegeben. Standardmäßig wurde ein Plattenabstand von 1,5 mm und ein Kamm mit 36 Taschen im Peqlab-System verwendet, und 30 µl fertige Probe (15 µl Ladepuffer, 15 µl zu analysierende Probe; hitzedenaturiert) geladen.

Die Gele wurden geblottet oder mit Kolloidal-Coomassie nach Neuhoff *et al.*, 1988 über Nacht gefärbt und am nächsten Tag mit ddH₂O entfärbt.

Western-Blots wurden mit einem Semi-Dry-System erzeugt. Die verwendeten Puffer sind im Materialteil aufgeführt. Es wurde eine PVDF-Membran verwendet, die aufgrund ihrer Hydrophobizität vor dem Zusammenbauen des Blotting-Stapels durch Inkubation in Methanol, Wasser und Anodenpuffer II, benetzt wurde. Es wurde für 2 Stunden mit einer Stromstärke (in mA) von 0,8 x Fläche der Membran (in cm²) geblottet. Durch die Wahl dieser Membran konnte die Zeitdauer für die Immunodetektion nach einer Vorschrift von Millipore deutlich reduziert werden (Application Note: „Rapid Immunodetection of Blotted Proteins Without Blocking“ Immobilon-P Transfer Membrane). Für weitere Details sei hierauf verwiesen.

3.2.4. *ATPase Assay*

Das aus der ATP-Hydrolyse freigesetzte anorganische Phosphat (P_i) wurde nach der Methode von Lanzetta *et al.*, 1979 bestimmt, die eine Weiterentwicklung der Methode von Hess und Derr, 1975 darstellt.

Nach dem Ende der Reaktionszeit, wurde zunächst P_i in einem Malachitgrün-Molybdat-Komplex komplexiert: freies Phosphat wird mit Molybdat zu Phosphomolybdat, welches bei niedrigem pH-Wert einen Komplex mit dem sensitiven Farbstoff Malachitgrün (Itaya und Ui, 1966) eingeht. In der Praxis wurden dafür zum 50 μ l Reaktionsansatz 800 μ l Farbreagenz gegeben. Durch den niedrigen pH-Wert der Färbelösung wurde die Reaktion auch abgestoppt. Nach einer Minute Inkubation bei RT, wurden dann 100 μ l Citrat-Lösung zugegeben, um den Ansatz unempfindlich gegen P_i zu machen, das durch saure Hydrolyse des ATPs nach dem Abstoppen der Enzymreaktion entstehen kann.

Die Ansätze wurden 1 Stunde bei RT inkubiert und der Komplex dann photometrisch, in dieser Arbeit bei einer Wellenlänge von 670 nm, gemessen. Als Leerwert diente zunächst ddH₂O. Zur Bestimmung der „echten“ Nullwerte, wurden parallel für sämtliche Reaktionsbedingungen Ansätze ohne Enzym (dafür mit Proteinlagerpuffer) analysiert. Die Quantifizierung der ATP-Hydrolyse erfolgte mit Hilfe von Phosphatstandards (0, 25, 50 und 100 μ M Endkonzentration KH₂PO₄ in 50 μ l Ansätzen).

Die eigentliche Enzymreaktion wurde bei 37 °C durchgeführt. Die einzelnen Ansätze wurden zeitlich getaktet und randomisiert, um korrekte Versuchsbedingungen zu gewährleisten und den Einfluss sogenannter „Blockeffekte“ der experimentellen Planung auf das Ergebnis auszuschließen.

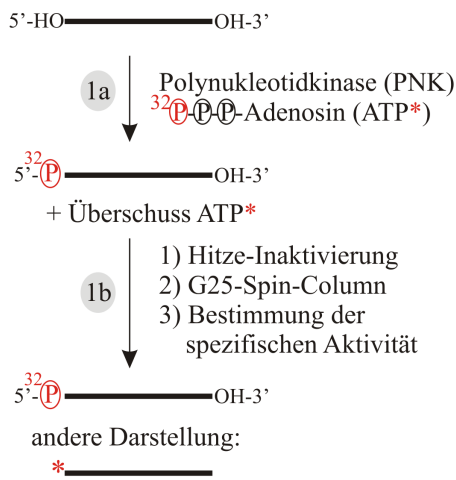
3.2.5. *Helikase-Assay*

3.2.5.1. **Prinzip**

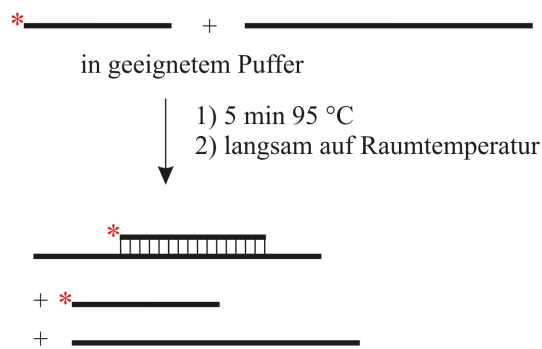
In dieser Arbeit wurde die Strangentwindungsaktivität der RecQ-Helikasen mit verschiedenen radioaktiv markierten DNA-Substraten gemessen. Hierbei misst man eine abgeschlossene Entwindung eines (partiellen) Duplex, das heißt eine vollzogene komplette Trennung zweier (oder mehrerer) DNA-Stränge. Dabei wird ausgenutzt, dass sich das Substrat und das (die) Produkt(e) der Helikase-Reaktion in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden. Bei einer Trennung auf einem nativen Gel, werden bei einer anschließenden Autoradiographie alle Spezies sichtbar sein, bei denen ein markierter Strang beteiligt ist, so dass die Entwindungsaktivität quantifiziert werden kann (Abbildung 14).

Substratherstellung

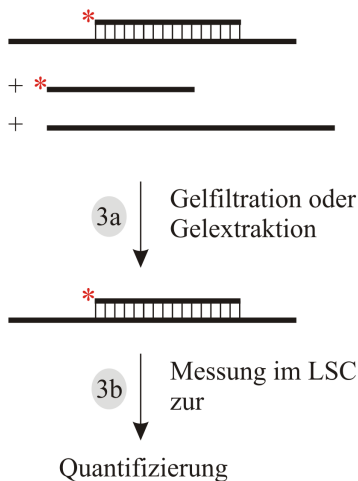
1 Markierung eines Oligonukleotids



2 Annealing mit (teilweise) komplementärer DNA



3 Substrataufreinigung



Enzym-Assay

Reaktion

Enzym (oder Enzymlagerpuffer) gekühlt vorlegen

- 1) Mastermix (MM) mit Substrat, ATP, ... zugeben & gut mischen
- 2) Inkubation bei 37°C starten
- 3) Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beenden

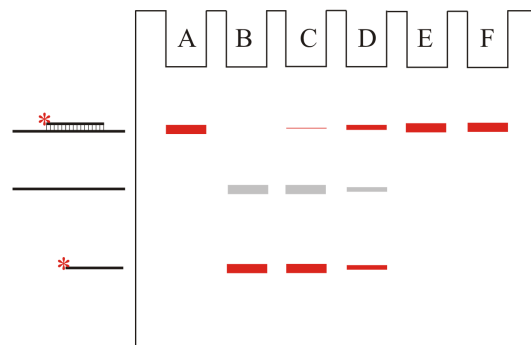
abgeschlossene Enzymreaktion:
 umgesetzt Substrat:



nicht umgesetztes Substrat:



Gelelektrophorese & Autoradiographie



- A) ohne Enzym
 B) Hitzedenaturierte Reaktion
 C) hochaktives Enzym
 D) weniger aktives Enzym
 E) hochaktives Enzym OHNE ATP
 F) hohe Konzentration von Enzym mit Punktmutation im Walker A Motiv
 => **nur die rot dargestellten Banden sind bei der Autoradiographie sichtbar**

Abbildung 14: Überblick und schematische Darstellung der verschiedenen Schritte, die im Rahmen des Helikase-Assays notwendig sind.

Die einzelnen Schritte werden auf den kommenden Seiten detailliert.

3.2.5.2. Herstellung der DNA-Substrate für den Helikase-Assay

Zunächst wird das gewünschte Oligonukleotid mit einem molaren Überschuss an $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (etwa Faktor 1,3) und der T4-Polynukleotidkinase (PNK) bei 37 °C in einem Volumen von 50 μl für 60 min inkubiert. Dabei erfolgt der Übertrag des γ -Phosphats des $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP auf das 5' Ende des Oligonukleotids (Abbildung 14). Dann erfolgt eine Hitzeinaktivierung bei 67 °C für 20 min.

Nach dem Abkühlen wird der Reaktionsansatz gemäß Herstellerangaben mit Hilfe einer G-25-Spin-Column von freiem ATP befreit. Das Elutionsvolumen und die Aktivität eines Aliquots des Eluats wurden bestimmt. Für letzteres wurde 1 μl in 4 ml Lumasafe Plus Cocktail im LSC gemessen. (Zu Beginn der Arbeit wurden keine G25-Spin-Columns verwendet, sondern das ATP erst während der Substrat-Aufreinigung abgetrennt.)

Das Annealing der verschiedenen Oligonukleotide, die ein Substrat aufbauen, wurde in 1x PNK-Puffer (NEB) erreicht, indem die Oligonukleotide in geeigneten Verhältnissen (siehe Tabelle 6) zusammengegeben wurden, der Ansatz 5 min bei 95 °C inkubiert und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. Eine Ausnahme stellt die Replikationsgabel dar, die über zwei Annealingschritte hergestellt wurde.

In der Regel erfolgte eine weitere Aufreinigung des Substrats (siehe Abbildung 14). Mit welcher Methode die verschiedenen Substrate von kontaminierenden Oligonukleotiden befreit wurden, ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Herstellung verschiedener DNA-Substrate.

| Substrat | Oligonukleotide (siehe Tabelle 3) (^{32}P -Markierung = *) & Verwendete molare Verhältnisse bei Annealen | Aufreinigungsmethode(n) und Kommentare |
|---|---|--|
| M13-basierte Substrate (siehe v.a. Kapitel 4.4 und 4.7) | M13mp18 ssDNA + 1* bzw. 2* 1 : 2 | Für M13 + 1* : Gelfiltration über S400-Material (Spin-Column oder selbstgepackte Säule in entleerter PD-10-Säule (Betthöhe 6 cm) mit Substratpuffer M13) |
| Direktionalitätssubstrate 1 (siehe Kapitel 4.7.5) | 3 + 4* bzw. 5* 1 : 1 | über G50-Spin Columns |
| Direktionalitätssubstrate 2 (siehe Kapitel 4.7.5) | 3 + 9* (3' Überhang) 20 + 11* (5' Überhang) 1 : 1 | Die Oligos 20 und 11* wurden statt 3 und 10* für die Untersuchung an einem 5' Überhang verwendet, weil die spezifische Aktivität von 10* sehr gering war - vermutlich wegen des endständigen Cytosins (van Houten <i>et al.</i> , 1998). 20 + 9* hingegen ergab beim Annealen keine saubere Bande, so dass die angegebenen Kombinationen verwendet wurden. Nach Annealen: keine weitere Aufreinigung notwendig |

| | | |
|---|---|--|
| partielle Duplexe unterschiedlicher Länge (siehe Kapitel 4.8) | 3 + 5* bzw. 6* bzw. 7* bzw. 8* bzw. 9* 1 : 1 | über G50-Spin Columns |
| Partielle Duplexe mit unterschiedlich langen 3' Überhängen (siehe Kapitel 4.10) | 9* + 12 bzw. 13 bzw. 14 bzw. 15 bzw. 16 bzw. 17 bzw. 18 bzw. 19 bzw. 3 1 : 1 | falls Annealing erfolgreich, keine weitere Aufreinigung, sonst: G50-Spin-Column |
| Bubble (siehe Kapitel 4.11) | 22* + 23 1 : 1 | Gelextraktion aus 10 % TBE oder selten TBMgCl ₂ -PAGE-Gelen. Gelelution in 0,5 x TBMgCl ₂ mit Hilfe des Biotrap Elektroelutions-Systems (mit kleiner Elutionskammer – siehe Anleitung des Herstellers) oder mit D-tube Dialyzer Vorrichtungen bei 100V für ca. 4 Stunden unter Kühlung. Nach Beenden der eigentlichen Elution: Umpolen bei 200 V für ca. 30 sec. Auf- und Abpipettieren und Eluat in frisches Eppi überführen. (Diese letzten Schritte wurden auch bei den weiteren Elektroelutionen angewendet) |
| D-Loops (siehe Kapitel 4.11) | 22 + 23 + 24* oder 22*+ 23 + 24; 22 + 23 + 25* oder 22*+ 23 + 25; 22 + 23 + 26* oder 22*+ 23 + 26; 1 : 4 : 1 | |
| Holliday-Junction (siehe Kapitel 4.12) | 27* + 28 + 29 + 30 1 : 4 : 4 : 4 | Gelextraktion aus 12 % TBE-PAGE-Gelen. Gelelution mit Hilfe des Biotrap Elektroelutions-Systems in 0,5 x TAE bei 50 V für 18 h unter Kühlung |
| Replikationsgabel (siehe Kapitel 4.13) | 31* + 33 und 32 + 34* 1 : 1 | Die beiden einzeln annealten Ansätze im Verhältnis 1:1 zusammengeben und 22 h bei 25 °C inkubieren. Gelextraktion aus 8 % TBE-PAGE-Gelen. Gelelution mit Hilfe des Biotrap Elektroelutions-Systems in 0,5 x TBMgCl ₂ bei 100 V für 4,5 h unter Kühlung |

Zusätzlich wurden z.T. Zwischenstrukturen hergestellt, bei denen nicht alle Oligonukleotide beteiligt waren. Das Vorgehen erfolgte in diesen Fällen analog. Für die Aufreinigung der Zwischenstrukturen der Holliday-Junction wurde das QIAEX II Kit verwendet.

3.2.5.3. Quantifizierung der DNA-Substrate für den Helikase Assay

Die Quantifizierung der Konzentration der DNA-Substrate erfolgte mit Hilfe der spezifischen Aktivität (A_{spez} in Ci/mmol) des markierten, aufgereinigten Oligonukleotids und der gemessenen Aktivität (A in Ci oder Becquerel (Bq = 1/sec)) in der aufgereinigten DNA-Substratprobe.

Die **spezifische Aktivität des markierten Oligonukleotids am Tage der Markierung** wird nach einer Abreinigung des überschüssigen ATPs über eine G25-Spin-Column (nach Herstellerangaben) bestimmt. Dazu wird die Aktivität eines Aliquot des Eluats (meist 1 µl) im LSC gemessen, und in Relation zur eingesetzten Menge des Oligonukleotids gesetzt (unter Berücksichtigung der Volumenzunahme durch die Säule und der Annahme einer 100 % igen Elutionseffizienz, d.h. 100 % des Oligonukleotids im Eluat, 100 % des ATPs in der Säule).

(1) spezifische Aktivität = Aktivität / Stoffmenge

$$A_{\text{spez}}(t_0) = A(t_0) / N(t_0)$$

Wird am gleichen Tag das Substrat weiter aufgereinigt, kann man die **Konzentration des Substrats in der Endfraktion** wie in Formel (2) berechnen:

(2) Konzentration = (Aktivität (in Ci)/Volumen) / (spezifische Aktivität (Ci/mmol))

$$c(t_0) = (A(t_0)/V) / A_{\text{spez}}(t_0)$$

Um allerdings die Substratkonzentration zu einem anderen Zeitpunkt korrekt zu bestimmen, braucht man (direkt oder indirekt) die spezifische Aktivität zu diesem Zeitpunkt, die sich über die Markierungsrate berechnet.

Berechnung der Markierungsrate ausgehend von der spezifischen Aktivität.

Die Wahrscheinlichkeit des Zerfalls wird durch die Zerfallskonstante λ dargestellt. Die Anzahl der gemessenen Zerfälle (Aktivität A) ist mit dem Proportionalitätsfaktor λ proportional zur Menge an radioaktiver Materie (N^*).

(3) $A = \lambda \cdot N^*$

λ berechnet sich aus der Halbwertszeit, die bei ^{32}P 14,3 Tage beträgt, was 1235520 Sekunden entspricht.

(4) $\lambda = (\ln 2) / T_{1/2}(^{32}\text{P}) = (\ln 2) / 1235520 \text{ sec}$ (oder auch $\lambda = (\ln 2) / 14,3 \text{ d} = 0,0485$)

Hat man z.B. eine spezifische Aktivität von 3000 Ci/mmol (was der spezifischen Aktivität des verwendeten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP zum Kalibrierdatum entspricht), so ergibt sich bei Betrachtung eines mmol dieses ATPs zum Kalibrierdatum nach (3):

(5) $3000 \text{ Ci} = (\ln 2) / 1235520 \text{ sec} \cdot N^*$

$$(3000 \text{ Ci} \cdot 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq/ Ci}) / (\ln 2 / 1235520 \text{ sec}) = N^*$$

$$N^* = 1,97855 \cdot 10^{20} \text{ (radioaktive Moleküle)}$$

Da ein mmol dieses ATPs betrachtet wurde, in dem $N_0 = 10^{-3} \cdot (6,022 \cdot 10^{23})$ Moleküle sind, ergibt sich eine Markierungsrate von:

(6) Markierungsrate = $N^* / N_0 = 1,97855 \cdot 10^{20} / (6,022 \cdot 10^{20}) = 0,328$

Folglich sind allein bei dem zur Markierung eingesetzten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP nur 32,8 % der Moleküle radioaktiv und 67,2 % nicht radioaktiv. Dies wiederum bedeutet, dass selbst unter Optimalbedingungen ein Großteil des DNA-Substrats überhaupt nicht radioaktiv markiert ist, wodurch sich dessen Konzentration auch nicht im Laufe der Zeit verändert. In dieser Arbeit wird für dieses kalte ATP (bzw. Substrat) angenommen, dass es durch den radioaktiven Zerfall eines Nachbarmoleküls keinen Schaden nimmt, wobei jedoch letzteres dadurch zerstört wird.

Berechnung der spezifischen Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt

$$(7) \quad A_{\text{spez}}(t) = \frac{A(t)}{N(t)} = \frac{A(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t)}}{(N(t_0) - N^*(t_0)) + (N^*(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t)})}$$

Am Beispiel des $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, wo zum Kalibrierdatum 3000 Ci/mmol und 0,328 mmol markiertes ATP vorliegen (und 0,672 mmol kaltes ATP) ergibt sich nach einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen eine spezifische Aktivität von:

$$A_{\text{spez}}(14,3) = \frac{3000 \text{ Ci} \cdot e^{(-0,0485 \cdot 14,3)}}{(0,672 \text{ mmol}) + (0,328 \text{ mmol} \cdot e^{(-0,0485 \cdot 14,3)})} = \frac{1500 \text{ Ci}}{0,836 \text{ mmol}} = 1794 \text{ Ci/mmol}$$

Die für $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP vorgestellten Berechnungen können entsprechend für die markierten Oligonukleotide durchgeführt werden. Sie sind zum einen notwendig, wenn der Tag der Markierung und Aufreinigung des Oligonukleotids (und der Bestimmung der zugehörigen Aktivität) (t_0), nicht gleichzeitig der Tag der Herstellung und Messung des fertigen, aufgereinigten DNA-Substrats (t_1) ist; denn dann gilt statt Formel (2)

$$(8) \quad c(t_1) = (A(t_1)/V) / A_{\text{spez}}(t_1)$$

und $A_{\text{spez}}(t_1)$ muss nach (7) (über $A(t_0)$, $N(t_0)$ und $N^*(t_0)$) mit Hilfe der Formeln (3) bis (6)) neu berechnet werden.

Zum anderen kann die **Substratkonzentration für jeden beliebigen Zeitpunkt** t_2 nach (2) bzw. (8) berechnet werden, in dem die Volumenaktivität ($A(t_2)/V$) nach dem Zerfallsgesetz,

$$(9) \quad A(t_2)/V = A(t_1) \cdot e^{(-\lambda \cdot (t_2 - t_1))} / V$$

und die spezifische Aktivität $A_{\text{spez}}(t_2)$ nach (7) berechnet wird.

3.2.5.4. Durchführung und Auswertung des Helikase-Assays

Zur besseren Illustration des Verfahrens sei noch einmal auf Abbildung 14 verwiesen. In der Regel wurde je 1 μl Enzym (beziehungsweise in Proteinlagerpuffer verdünntes Enzym, und zusätzlich Proteinlagerpuffer als Kontrolle, s.u.) in vorgekühlte PCR-Reaktionsplatten (0,2 ml/well) auf einem Kühlblock vorgelegt. (Zu Beginn der Arbeit wurde mit 1,5 ml Reaktionsgefäßen gearbeitet.) Dazu wurden, auf dem Kühlblock, in der Regel 19 μl Mastermix pipettiert und der Ansatz gemischt, in der Regel mit einer Mehrkanalpipette. Durch den Mastermix wurden die Standardreaktionsbedingungen (siehe Kapitel 3.1.8) hergestellt, soweit im Ergebnisteil keine abweichenden Angaben zu finden sind. Die Inkubation erfolgte für die gewünschte Zeit bei 37 °C auf einem Heizblock, dann wurde die Reaktion mit 10 μl Stopplösung, die zugleich den Ladepuffer darstellt, abgestoppt.

Wurden mehrere DNA-Substrate in einem Versuchsansatz untersucht, wurde die DNA-Substrat-Konzentration im jeweiligen Elutionspuffer oder mit ddH₂O auf die niedrigste Konzentration verdünnt.

Für hitzedenaturierte Substratproben wurde 5 min bei 95 °C inkubiert und dann auf Eis schockgekühlt.

Die Proben wurden auf native TBE-PAGE-Gele verschiedener Prozentigkeiten geladen und elektrophoretisch, unter Kühlung auf 4 °C, aufgetrennt (siehe auch Schema Abbildung 14).

Die Auswertung zur Bestimmung des Anteils des prozessierten Substrats (= Produkt) erfolgte nach online Detektion im Instant Imager (Autoradiographie) über die Imager-Software. Da bei manchen DNA-Strukturen das Substrat bereits ohne Enzym teilweise zu Produkt zerfallen war, wurde der Umsatz nach folgender Formel normiert (Mohaghegh *et al.*, 2001):

$$\% \text{ Umsatz} = \frac{(\% \text{ Produkt} - \% \text{ Produkt}_{\text{ohne Enzym}}) \cdot 100 \%}{(\% \text{ Produkt}_{\text{hitzedenaturiert}} - \% \text{ Produkt}_{\text{ohne Enzym}})}$$

Lag kein Wert für die Ablösung des Produktstrangs einer hitzedenaturierten Probe vor (wie z.B. bei manchen Versuchen mit M13-Standardsubstrat, wurden 100 % angenommen. Für % Produkt_{ohne Enzym} wurde der Mittelwert der zeitgleich durchgeführten Kontrollen verwendet.

Nach der Autoradiographie im Instant Imager wurden einige Gele getrocknet, um die Bandenschärfe der detektierten Proben zu verbessern. Dies erfolgte unter Vakuum bei 80 °C. Die getrockneten Gele wurden dann über Nacht (oder einige Stunden) auf strahlungssensitiven Imaging-Platten in BAS-Kassetten inkubiert. Die Detektion der Signale auf den Platten erfolgte im Bio-Imaging-Analyser BAS-1500.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung der verwendeten Konstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit klonierten und relevanten Konstrukte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Hierbei sind nicht nur die endgültig verwendeten Konstrukte aufgelistet, sondern auch neu klonierte Vektoren und wichtige Zwischenschritte. Da im Laufe der Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression pflanzlicher RecQ-Helikasen in *E. coli* zum Erfolg führt, wurde die Überexpression in Insektenzellen aufgegeben.

Tabelle 7: Konstrukte.

Die Namen der endgültig für diese Arbeit verwendeten Konstrukte sind in Fettschrift.

| Name | Beschreibung |
|--|---|
| pCAL-n-FLAG-c-HIS | LIC-kompatibler Vektor. Erlaubt die Expression unter Kontrolle des T7-Promotors. In den Ursprungsvektor pCAL-n-FLAG wurde zwischen die Schnittstellen SmaI und NcoI ein Adapter kloniert. Wird ein ORF eingefügt, trägt er N-terminal ein Calmodulin-Bindepeptid, eine Thrombin-Erkennungssequenz, ein FLAG-Epitop und eine Enterokinase-Erkennungssequenz, C-terminal eine Thrombin-Erkennungssequenz und einen His-Tag. |
| pIEx-3-LK | Erlaubt die Expression von Proteinen in Insektenzellen unter Kontrolle des IE1-Promotors. In den Ursprungsvektor pIEx-3 wurde zwischen die NcoI und XhoI Schnittstellen ein Adapter kloniert. Wird ein ORF zwischen NcoI und KpnI eingefügt, trägt er N-terminal das AKH-Signalpeptid für eine Sekretion, C-terminal eine Thrombin-Erkennungssequenz und einen His-Tag. |
| pETDuet1-LK | Erlaubt die Expression unter Kontrolle des T7-Promotors. In den Ursprungsvektor pETDuet-1 wurde zwischen die Schnittstellen NcoI und XhoI ein Adapter kloniert. Wird ein ORF zwischen NcoI und KpnI eingefügt, trägt er C-terminal eine Thrombin-Erkennungssequenz und einen His-Tag. |
| pIEx-3-LK-AtRECQ3 | Ursprünglich für die Insektenzellexpression konzipiert, wurde aus diesem Konstrukt der C-terminale Teil (ca. 500 nts) von AtRECQ3 mit dem angefügten His-Tag mit BamHI (interne Schnittstelle) und XhoI (Schnittstelle im Vektor) ausgeschnitten. |
| pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M | Entstanden durch das Einligieren eines die Mutation tragenden EcoRI/MfeI Fragments der entsprechenden Mutagenese-PCR in den entsprechend geschnittenen pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-Vektor (übernommen von H. Plchova). |
| pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2 | Entstanden durch Einfügen des entsprechenden PCR-Produkts über LIC. Matrize pCAL-n-FLAG-AtRECQ2 von H. Plchova. Charakteristika siehe pCAL-n-FLAG-c-HIS |
| pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2-K117M | Entstanden durch Einfügen des entsprechenden Mutagenese-PCR-Produkts über LIC. Matrize pCAL-n-FLAG-AtRECQ2 von H. Plchova. Charakteristika siehe pCAL-n-FLAG-c-HIS |
| pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS | Entstanden durch das Einligieren des BamHI/XhoI-Fragments aus pIEx-3-LK-AtRECQ3 (mit His-Tag) in pCAL-n-FLAG-AtRECQ3 (übernommen von H. Plchova), geschnitten mit BamHI/XhoI. |

| | |
|---------------------------------------|--|
| | Erlaubt die Expression unter Kontrolle des T7-Promotors. N-terminal des ORFs ist ein Calmodulin-Bindepeptid, eine Thrombin-Erkennungssequenz, ein FLAG-Epitop und eine Enterokinase-Erkennungssequenz, C-terminal eine Thrombin-Erkennungssequenz und ein His-Tag. |
| pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M-c-HIS | Entstanden durch das Einligieren eines die Mutation tragenden EcoRI/NdeI Fragments aus pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M in den entsprechend geschnittenen pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS-Vektor. Gleiche Tags und Protease-Schnittstellen wie letzterer. |
| pETDuet1-LK-EcRECQ | Der ORF von EcRECQ wurde über nested PCR amplifiziert und mit NcoI and KpnI-Schnittstellen versehen. Klonierung über diese Schnittstellen in pETDuet1-LK. |

Die Eigenschaften der in dieser Arbeit aufgereinigten und charakterisierten Proteine (zusammen mit ihren Tags und Proteaseschnittstellen) sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt der aufgereinigten und charakterisierten Proteine.
 CBP- Calmodulin-Bindepeptid, Thrombin – Thrombin-Erkennungssequenz, FLAG – FLAG-Epitop, Enterokinase – Enterokinase-Erkennungssequenz

| ORF | N-terminale Tags und Protease-Schnittstellen | C-terminale Tags und Protease-Schnittstellen | Anzahl der Aminosäuren | Molekulargewicht | Isoelektrischer Punkt |
|---------------|--|--|------------------------|------------------|-----------------------|
| AtRECQ2 | CBP, Thrombin, FLAG, Enterokinase | Thrombin, His | 758 | 85,48 kDa | 8,26 |
| AtRECQ2-K117M | CBP, Thrombin, FLAG, Enterokinase | Thrombin, His | 758 | 85,49 kDa | 8,17 |
| AtRECQ3 | CBP, Thrombin, FLAG, Enterokinase | - | 754 | 84,63 kDa | 8,51 |
| AtRECQ3 | CBP, Thrombin, FLAG, Enterokinase | Thrombin, His | 766 | 86,06 kDa | 8,57 |
| AtRECQ3-K64M | CBP, Thrombin, FLAG, Enterokinase | Thrombin, His | 766 | 86,06 kDa | 8,52 |
| EcRECQ | - | Thrombin, His | 621 | 69,80 kDa | 7,46 |

Anhand der pI-Werte und unter Berücksichtigung der geplanten Aufreinigung konnte der pH-Wert der Aufreinigungspuffer für AtRECQ2 und AtRECQ3 auf 7,5 festgelegt werden. Aus Vergleichsgründen wurde dieser pH-Wert auch erfolgreich für die Aufreinigung des *E. coli*-Enzyms verwendet.

4.2. Expressionsoptimierung

Proteinaufreinigungen können entweder mit Protein aus Inclusion Bodies und denaturierenden Pufferbedingungen, mit einer anschließenden Renaturierung durchgeführt werden, oder, wie in dieser Arbeit, von Beginn an auf nativ gefaltetes Protein fokussiert sein. Obwohl nicht notwendigerweise in der Zelle gelöstes Protein nativ gefaltet sein muss, ist es im Gegenteil sehr unwahrscheinlich, dass Protein in sogenannten Inclusion Bodies richtig gefaltet ist. Diese beiden Spezies, lösliches Protein und Inclusion Bodies, kann man durch Ultrazentrifugation unterscheiden. Nach der Expression werden die geernteten Zellen in einem geeigneten Puffer resuspendiert und aufgeschlossen. Im Überstand der Ultrazentrifugation befindet sich das lösliche Protein, wohingegen Inclusion Bodies abzentrifugiert werden. Verschiedene Parameter können die Konzentration an löslichem Protein beeinflussen und einige wurden für AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 getestet. Dabei wurde nicht das Ziel verfolgt das globale Expressionsoptimum zu finden, sondern ausreichende Mengen an löslichem Protein für die anschließende Aufreinigung sicherzustellen.

4.2.1. Expressionsoptimierung AtRECQ3

Die Expressionsoptimierungen für AtRECQ3 wurden mit dem Konstrukt pCAL-n-FLAG-AtRECQ3, d.h. ohne C-terminalen His-Tag durchgeführt.

Die Expression wurde zunächst in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3), BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL und BL21(DE3) pLysS und den Induktorkonzentrationen 0,2 und 1 mM IPTG bei 28 °C für 6 h untersucht. Hierbei kam es nur bei den erstgenannten Stämmen zu einer Überexpression, die (auch nur bei diesen) mit einem drastischen Verlust der Fähigkeit einherging, Kolonien auf LB-Platten mit und ohne Selektionsantibiotika zu bilden (im Gegensatz zu parallel laufenden Expressionskulturen, zu denen kein Induktor gegeben wurde). Die Ausbeute an löslichem Protein war bei beiden Stämmen und beiden Induktormengen vergleichbar, so dass für die weiteren Experimente 0,2 mM IPTG eingesetzt wurde. Auch wurde in diesem Experiment gezeigt, dass bei dem angewendeten Verfahren, bei dem die Expressionskultur mit einem Zehntel der Vorkultur angeimpft wurde, auf die Selektionsantibiotika in der Expressionskultur (aber nicht der Vorkultur) verzichtet werden kann, ohne dass es zu einer Reduktion an löslichem Zielprotein kommt.

Weitere Analysen ergaben, dass in dem untersuchten Zeitraum von 4 bis 6 h keine Veränderung der exprimierten RECQ3-Menge zu erkennen ist. Im Western-Blot konnten bedeutende Mengen von FLAG-positiven Proteinen mit kleinerem Molekulargewicht nachgewiesen werden, die in Expressionskulturen mit dem Vektor ohne AtRECQ3-Insert

nicht zu sehen waren. Die Konzentration dieser zu kurzen Proteine stieg proportional zur Menge an komplettem AtRECQ3, im untersuchten Zeitbereich von einer bis vier Stunden nach der Induktion, an. Dies ließ sich weder durch die Wahl des Expressionsstamms, BL21(DE3) oder BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL, noch durch eine Erniedrigung der Expressionstemperatur von 28 °C auf 21 °C verbessern.

Da die Expressionsbedingungen nicht der Hauptgesichtspunkt dieser Arbeit waren, wurden die Untersuchungen mit diesen Ergebnissen eingestellt, wohlwissend, dass die Analyse weiterer Faktoren unter Umständen weitere Verbesserungen gebracht hätten. Die zufriedenstellende, wenn auch nicht optimale, Expression für AtRECQ3 wurde in BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL bei 28 °C mit 0,2 mM IPTG für 4 h durchgeführt.

Eine unter diesen Bedingungen durchgeführte Expression mit dem Konstrukt pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS erbrachte ausreichende Ausbeuten und die Analyse wurde daher nicht wiederholt.

4.2.2. Expressionsoptimierung AtRECQ2

Für die Expressionsanalyse von AtRECQ2 wurde nur der *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL verwendet, was angesichts der Codonusage, v.a. der Häufigkeit des Auftretens des Arginin-Codons „AGA“ in AtRECQ2 sinnvoll erschien. Die Untersuchungen wurden mit dem Konstrukt pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2 durchgeführt. Variationen der Expressionstemperatur, der Induktorkonzentration und der Expressionsdauer sowie der Zusatz von Antibiotika einerseits und Sorbitol und Betain andererseits, wurden getestet. Der Einfluss dieser Parameter auf die Konzentration an AtRECQ2 in der löslichen Fraktion ist in Abbildung 15 zu erkennen. AtRECQ2 ist im Rohextrakt auf dem Coomassie-Gel (Abbildung 15A) nicht eindeutig zu erkennen, wird aber durch den Anti-His-Antikörper (Abbildung 15 B) detektiert. Es wird zunächst im Vergleich der Spuren 6, 10 und 13 mit den anderen deutlich, dass auch bei der Expression von AtRECQ2 auf die Zugabe von Selektionsantibiotikum zum Medium verzichtet werden kann. Auch eine Zugabe von Betain und Sorbitol führt zu einem unterschiedlichen Bandenmuster im Coomassie-Gel, aber nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute an löslichem Protein. Die Ausbeuten bei den Induktorkonzentrationen 0,2 mM und 1 mM IPTG unterscheiden sich nicht. Jedoch führt eine Erniedrigung der Expressionstemperatur bei gleichzeitiger Verlängerung der Expressionszeit zu höheren AtRECQ2-Ausbeuten. Zur Expression von AtRECQ2 wurden daher folgende Bedingungen gewählt: Expression bei 16 °C für etwa 24 h nach Induktion mit 0,2 mM IPTG.

Verwendung von Triton-X-100 im Waschpuffer

In einem Satz von Experimenten wurde der Einfluss von Hochsalz- und Niedrigsalzwaschschritten sowie von Waschschritten mit dem Detergenz Triton-X-100 auf die Reinheit der Elutionsfraktionen der CAC getestet (Abbildung 16). Variationen der Salzkonzentrationen führen zu keiner deutlichen Verbesserung der Reinheit. Auch eine weitere Reduktion der Salzkonzentration im Standardwaschpuffer, Lysispuffer CAC, auf 0 mM NaCl und 0 mM CaCl₂ brachte keinen Reinigungserfolg (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass durch die Verwendung des Detergenz Triton-X-100 ein kontaminierendes Protein von etwa 36 kDa, abgereinigt wird (Abbildung 16 Spuren 6 und 7).

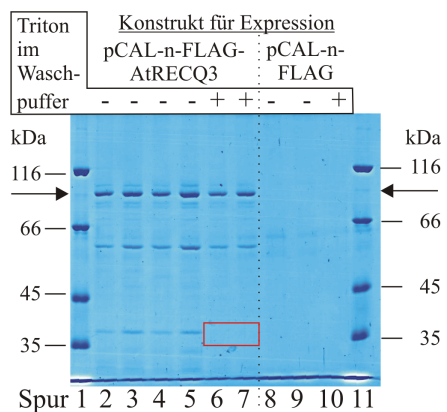


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Zusätze im Waschpuffer bei der CAC von AtRECQ3.

Kolloidal-Coomassie gefärbtes 10 % SDS-PAGE-Gel mit Elutionsfraktionen der CAC nach Verwendung verschiedener Waschpuffer während der Aufreinigung. Der Pfeil deutet auf AtRECQ3. Der rote Kasten hebt hervor, dass kontaminierendes Protein abgereinigt wurde. Spuren 1 und 11, Protein-Größenmarker.

Es wurden je drei Waschschritte durchgeführt. Die Waschpuffer sind wie folgt abgekürzt: *ST*, Lysispuffer CAC; *HS*, Hochsalzpuffer: Lysispuffer CAC mit 1000 mM NaCl; *NS*, Niedrigsalzpuffer: Lysispuffer CAC mit 150 mM NaCl und reduzierter Konzentration an CaCl₂ (0,1mM statt 2 mM); *TR*, Lysispuffer CAC mit 0,5 % Triton-X-100.

Spuren 2-7, Aufreinigung nach Expression des Konstruktes pCAL-n-FLAG-AtRECQ3; Spuren 8-10, Negativkontrolle Aufreinigung nach Expression mit pCAL-n-FLAG. Spuren 2 & 8: *ST*, *ST*, *ST*; Spur 3: *HS*, *ST*, *ST*; Spur 4: *HS*, *ST*, *NS*; Spuren 5 & 9: *NS*, *NS*, *ST*; Spur 6: *TR*, *ST*, *ST*; Spuren 7 & 10: *TR*, *HS*, *NS*

Genauere Analysen auf Gradientengelen mit aufkonzentrierten Proben ergaben, dass auch weitere Proteine durch den Triton-X-100-Schritt abgereinigt wurden. Der Erfolg des Triton-X-100-Schritts ist auch in Abbildung 17 ersichtlich. Außerdem konnte im Aktivitätsassay gezeigt werden, dass durch den Triton-X-100-Schritt kontaminierende *E. coli* Helikaseaktivität abgereinigt wird.

Kombination von 2 mM EGTA und Niedrigsalzbedingungen

Theoretisch führt bei der CAC der Entzug von Ca²⁺-Ionen dazu, dass das Calmodulin des Affinitätsmaterials seine Struktur ändert und somit seine Affinität zum CPB-getaggten Zielprotein verliert. Dadurch würde dieses freigesetzt. Interessanterweise konnte jedoch bei der AtRECQ3-Aufreinigung gezeigt werden, dass für die Elution von AtRECQ3 eine gewisse Menge an NaCl notwendig ist, wohingegen andere Proteine allein durch den Entzug von Ca²⁺ eluiert werden. Diese Tatsache wurde für einen weiteren Reinigungsschritt verwendet und ist in Abbildung 17 visualisiert.

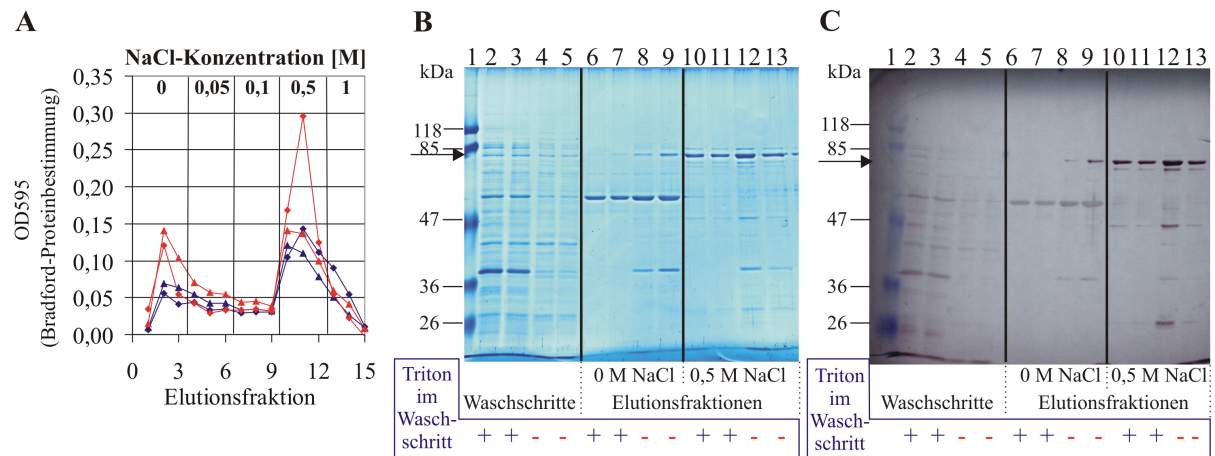


Abbildung 17: Einfluss der Kombination von EGTA und NaCl auf die Calmodulin Affinitätschromatographie mit AtRECQ3.

Die lösliche Protein-Fraktion für die AtRECQ3-Aufreinigung wurde auf vier Säulen aufgeteilt (I-IV). Bei den Säulen I und II enthielt der Waschpuffer 0,5 % Triton-X-100. Die Elution erfolgte sukzessive mit EGTA-haltigen Elutionspuffern mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0; 0,05; 0,1; 0,5 und 1 M NaCl) in je drei 1,5 ml-Fraktionen. Diese Elutionsfraktionen wurden entweder durch einfaches Aufpipettieren der jeweiligen 1,5 ml auf die Säule und Auffangen des Eluats gewonnen (Säulen I und III), oder das Säulenmaterial wurde jeweils zunächst in den zugegebenen 1,5 ml Elutionspuffer resuspendiert (Säulen II und IV).

A, Die relativen Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Elutionsfraktionen wurden per Bradford-Assay bestimmt. Rote Datenpunkte: Waschschritte ohne Triton-X-100; blaue Datenpunkte: Waschschritt mit Triton-X-100. Rauten: Elution ohne vorheriges Resuspendieren des Säulenmaterials; Dreiecke: Elution nach Resuspendieren des Säulenmaterials.

B, Kolloidal-Coomassie gefärbtes 10 % SDS-PAGE-Gel und **C**, Western-Blot entwickelt nach FLAG-Tag (PVDF-Membran, Schnellfärbemethode, feucht eingescannt). In Spur 1 wurde Prestained Proteingrößenmarker geladen. Der Pfeil weist auf AtRECQ3. In Spuren 2, 6 und 10 sind Fraktionen von Säule I, in 3, 7 und 11 von Säule II, in 4, 8 und 12 von Säule III und in 5, 9 und 13 von Säule IV geladen. In Spuren 2-5 wurden Waschfraktionen geladen (5-faches Konzentrat von ml 6 bis 10 des Waschschritts, für den der Puffer Triton-X-100 (Spuren 2, 3) enthielt oder nicht (Spuren 4,5)). In den Spuren 6-9 sind die jeweils zweiten Elutionsschritte mit dem Elutionspuffer mit 0 M NaCl aufgetragen, in Spuren 10-13, die mit 0,5 M NaCl.

Es ist ersichtlich, dass ein ca. 50 kDa großes, nicht FLAG-Tag positives Protein (die entsprechende Bande im Blot ist durchsichtig, nicht violett), durch einen Schritt mit 2 mM EGTA ohne NaCl vollständig abgereinigt werden kann. Dieses Protein kann auch durch Triton-X-100 zum Teil, aber nicht vollständig, aus der mit AtRECQ3 beladenen Säule gewaschen werden. Der Puffer mit 2 mM EGTA reinigt auch ein ca. 37 kDa, nicht FLAG-Tag positives Protein ab, allerdings ist hierfür der Waschschritt mit Triton-X-100 effizienter. AtRECQ3 wird erst durch die Kombination von EGTA und NaCl aus der Säule eluiert. Dazu werden zwischen 200 mM (unvollständige Elution) und 500 mM NaCl benötigt. Auf diese Weise aufgereinigte AtRECQ3-Proteine zeigen eindeutig Helikase-Aktivität. Allerdings kann im Vergleich mit der identisch aufgereinigten Negativkontrolle AtRECQ3-K64M geschlossen werden, dass eine geringe Kontamination vorhanden ist.

4.3.1.2. Aufreinigung von AtRECQ3 über Ni-IMAC

Das Konstrukt pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS bietet durch einen zusätzlichen C-terminalen His-Tag die Möglichkeit einer Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC- immobilized

metal ion affinity chromatography). In dieser Arbeit wurden durch die Verwendung von Ni²⁺ gute Aufreinigungsergebnisse erzielt (Ni-IMAC).

Die Kombination von CAC und Ni-IMAC bietet die Möglichkeit, Proteine voller Länge aufzureinigen und die Aufreinigung zu perfektionieren. In Abbildung 18 A ist gezeigt, dass durch die beiden Aufreinigungen zum größten Teil die gleichen, aber auch unterschiedliche Proteine abgereinigt werden. In dieser Arbeit wurde sowohl die Kombination „CAC mit anschließender Ni-IMAC“ (Abbildung 18 B) als auch die Kombination in umgekehrter Reihenfolge, „Ni-IMAC mit anschließender CAC“ (Abbildung 18 C), getestet. Zunächst wurden für die jeweiligen Affinitätschromatographien, die dafür üblichen Puffersalze verwendet: Phosphatpuffer für die Ni-IMAC und Tris-Puffer für die CAC. Damit verbunden war ein entsprechendes Umpuffern der Proben. Auch sonst wurde für die Ni-IMAC das Standardverfahren angewendet: Probe in Puffer A mit wenig Imidazol auf die Säule laden, mit Puffer A ausgiebig waschen, und anschließend mit einem Imidazolgradienten die gebundenen Proteine eluieren, was weitere Verunreinigungen abtrennt (siehe z.B. Abbildung 18 A, Spuren 5 bis 3).

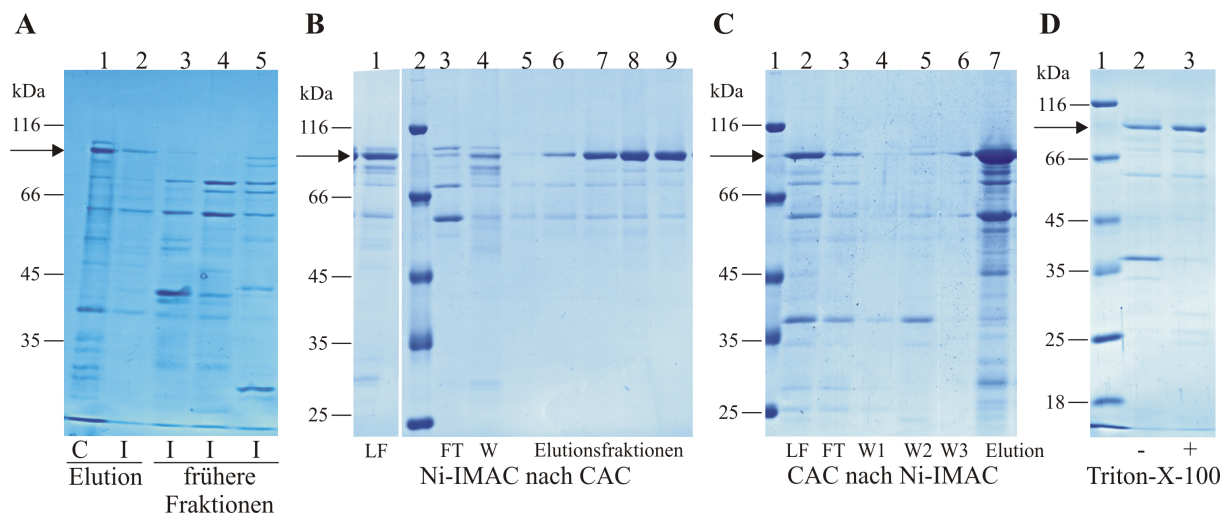


Abbildung 18: Reinigungserfolg von AtRECQ3 bzw. AtRECQ3-K64M über CAC und Ni-IMAC.

A-D: Kolloidal-Coomassie gefärbte SDS-PAGE-Gele; A-C: 10 % D, 12 %

A, Vergleichende Darstellung des Reinigungserfolg durch eine CAC (C) (ohne Triton-Waschschritt) (Spur 1) und durch eine Ni-IMAC (I) durchgeführt nach Standardvorschriften (Spuren 2-5). Die Endfraktionen sind in den ersten beiden Spuren dargestellt. In den Spuren 3-5 wird gezeigt, welche Proteine bei geringerer Imidazolkonzentrationen von der Hi-Trap Chelating-Säule gewaschen wurden (von 5 nach 3: Zunahme der Imidazolkonzentration). Der Pfeil deutet auf AtRECQ3.

B & C, Erfolg der Kombination einer Standard-Ni-IMAC und einer CAC. LF – Ladefraktion, FT – Durchfluss (Flow through), W – Waschschritt. Der Pfeil deutet auf AtRECQ3. In den Spuren B-2 und C-1 wurde Protein-Größenmarker geladen. **B**, W, Waschschritt mit Puffer A. Es wurden nur aufeinanderfolgende Elutionsfraktionen mit hoher Imidazolkonzentration aufgetragen. Die Proben für Spuren 3 bis 9 wurden aufkonzentriert. **C**, W1, Waschschritt mit Lysispuffer CAC; W2, Waschschritt im Lysispuffer mit 0,5 % Triton-X-100 und W3, Waschschritt mit 2 mM EGTA ohne NaCl. Spur 7, Elution mit Tris-Puffer mit 2 mM EGTA und 500 mM NaCl.

D, In Spur 3 ist die verdünnte Endprobe einer AtRECQ3-Aufreinigung nach dem in dieser Arbeit optimierten Ni-IMAC-Verfahren aufgetragen. Um den Einfluss des Triton-X-100-Waschschriffs zu verdeutlichen, wurde in der Spur 2 zugrundeliegenden AtRECQ3-K64M Aufreinigung darauf verzichtet. Der Pfeil weist auf AtRECQ3 bzw. AtRECQ3-K64M. Spur 1: Proteingrößenmarker.

In Abbildung 18 B und C ist eindeutig zu erkennen, dass die Kombination der beiden Methoden zu besseren Ergebnissen führt. Vor allem die über eine CAC aufgereinigten AtRECQ3-Proteine werden durch eine anschließende Ni-IMAC deutlich von Kontaminationen befreit (Abbildung 18 B). Ein Anschluss einer CAC an eine Ni-IMAC entfernt vor allem ein Protein von etwa 36 kDa. Dies findet v.a. während des Waschschriffs mit Triton-X-100-haltigem Puffer statt (Abbildung 18 C Spur 5; siehe auch Abbildung 17 B). Für die Aufreinigung von AtRECQ3 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Triton-X-100-Schritt der CAC erfolgreich auf die Ni-IMAC übertragen werden kann (siehe Abbildung 18 D). Hierfür werden die Bakterienzellen wie gehabt mit Puffer A aufgeschlossen und die lösliche Proteinfraction auf die Säule geladen. Dann wird ausgiebig mit Puffer A gewaschen, der 0,5 % Triton-X-100 enthält. Diesem entscheidenden Waschschriff schließt sich ein Waschschriff mit Puffer A an, um überschüssiges Triton-X-100 aus der Säule zu waschen, bevor die Elution beginnt. Die Ni-IMAC wurde im Laufe der Arbeit weiter verbessert. Zunächst konnte das Puffersystem für die Ni-IMAC erfolgreich von Phosphat-Puffer auf Tris-Puffer umgestellt werden. Dadurch wird die Störung des Nachweises der ATPase-Aktivität durch zusätzliches freies Phosphat ausgeschlossen. Weiterhin konnten die aus dem Imidazolgradienten gewonnenen Informationen auf die Elution in zwei Stufen übertragen werden. Statt des Gradientens wurde ein weiterer Waschschriff mit einer Imidazolkonzentration, die gerade noch nicht zur Elution von AtRECQ3 aber der kontaminierenden Proteine führt, und ein Elutionsschriff mit hoher Imidazolkonzentration durchgeführt. Dadurch lagen die AtRECQ3-Endproben in einer saubereren und deutlich konzentrierteren Form vor. In Abbildung 18 D Spur 3 ist AtRECQ3 zu sehen, das unter optimierten Bedingungen aufgereinigt wurde. Zu Vergleichszwecken, wurde in einer weiteren Ni-IMAC Aufreinigung auf den Triton-X-100-Schritt verzichtet (Abbildung 18 D Spur 2). Im Falle von AtRECQ3 hat die Optimierung der Ni-IMAC dazu geführt, dass alleinig Ni-IMAC aufgereinigte Endproben weder kontaminierende ATPase- noch Helikase-Aktivität aufzeigten (Abbildung 19 C). Zur Sicherheit wurden neben alleinig Ni-IMAC-gereinigten Proben, auch doppelt, Ni-IMAC und CAC, gereinigte Protein-Präparationen hergestellt. Es wurde über den Nachweis des FLAG- und His-Tags im Western-Blot gezeigt, dass AtRECQ3 die vollständige Länge aufweist.

4.3.2. Aufreinigung von AtRECQ2

Auf den Erfahrungen von AtRECQ3 aufbauend, wurde AtRECQ2 zunächst über eine Ni-IMAC aufgereinigt. Über die Daten einer Gradientenelution wurde die optimale

Imidazolkonzentration (ca. 140 mM) für einen weiteren Waschschrift bestimmt. Auch hier konnte Tris-Puffer verwendet werden und durch einen Waschschrift mit 0,5 % Triton-X-100 nach dem Laden, hydrophobe Interaktionen gebrochen werden. Im Gegensatz zu AtRECQ3, reichte diese optimierte Ni-IMAC nicht aus, um AtRECQ2 vollständig von *E. coli* Helikasen und Nukleasen zu befreien (siehe Abbildung 19 B). Dies wurde jedoch durch eine anschließende CAC erreicht, bei der mit Triton-X-100-haltigem Lysispuffer CAC und Lysispuffer ohne Triton gewaschen wird (siehe Abbildung 19 B und D). Der Erfolg der Aufreinigung auf Coomassie-Gel-Basis ist in Abbildung 20 B zu sehen. Auch für, auf diese Weise aufgereinigtes, AtRECQ2 waren die N- und C-terminalen Tags nachweisbar, AtRECQ2 also komplett.

4.3.3. Aufreinigung von EcRECQ

Um in bestimmten Aspekten die RecQ-Helikasen von Arabidopsis mit der von *E. coli* zu vergleichen, wurde auch der ORF für EcRECQ in einen Expressionsvektor kloniert (siehe Tabelle 7) und durch Sequenzierung verifiziert. Die Aufreinigung lehnte sich an die Ni-IMAC der AtRECQs an, jedoch wurde mit einem Imidazolgradienten eluiert. Der Erfolg der Aufreinigung ist in Abbildung 20 A zu sehen.

4.4. Nachweis der Helikase-Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis der Helikase-Aktivität der heterolog in *E. coli* exprimierten RECQ-Proteine von *Arabidopsis thaliana* im Rohextrakt nicht möglich ist. Diese wird durch die enzymatische Aktivität von sowohl Nukleasen als auch Helikasen von *E. coli* überdeckt. Selbst an die Ni-beladene Hi-Trap-Chelating-Säule binden solche *E. coli* Enzyme. Dies wird eindrucksvoll mit Hilfe des Strand-Displacement-Assays in Abbildung 19 A gezeigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine kontaminierende Nukleaseaktivität besser detektiert wird, wenn in der Reaktion kein ATP ist (siehe Abbildung 19 B). Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass es sich bei der enzymatischen Kontamination um ein ernstzunehmendes Problem handelt. Daher wurde eine noch umfassendere Kontrolle eingeführt: Alle Schritte werden nicht nur ausgehend von den Konstrukten pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-c-HIS und pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2 durchgeführt, sondern identisch auch ausgehend von pCAL-n-FLAG-AtRECQ3-K64M-c-HIS bzw. pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2-K117M. In diesen Konstrukten ist eine Punktmutation im Walker A Motiv der Helikasedomäne eingefügt, die einen Aminosäureaustausch des konservierten Lysins zu Methionin zur Folge hat. Es konnte für HsWRN gezeigt werden, dass durch diesen Aminosäureaustausch die ATP-Hydrolyse und somit auch Helikase-Aktivität

unterdrückt wird. Der Rest des Zielproteins soll erhalten bleiben, um dadurch die gleichen *E. coli* Proteine mit aufzureinigen, die auch im Zielprotein mit nativer Aminosäuresequenz durch mögliche direkte oder indirekte Interaktionen mit aufgereinigt werden. Mit Hilfe dieser Negativkontrollen konnte geprüft werden ob weitere Reinigungsschritte notwendig sind (v.a. in Hinblick auf *E. coli* Helikaseaktivität) und letztlich gezeigt werden, dass die Aktivitäten in den endgültigen AtRECQ-Proben nur auf AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 zurückzuführen sind (siehe Abbildung 19 C und D für exemplarische Nachweise).

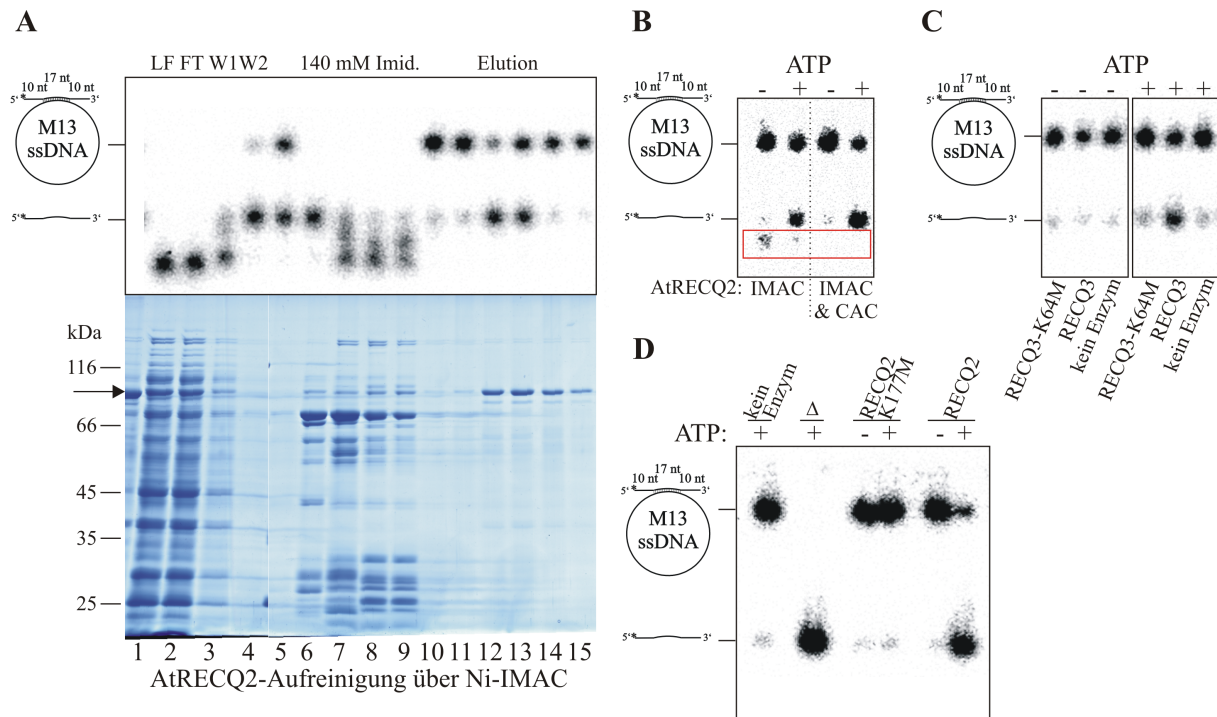


Abbildung 19: Erfolg der AtRECQ-Aufreinigungen im Hinblick auf kontaminierende Enzymaktivitäten.

Bei allen Aktivitätsassays handelt es sich um Strand-Displacement-Assays mit dem jeweils links symbolisierten Substrat, durchgeführt wie im Teil „Material und Methoden“ beschrieben. Abweichend davon wurde, wenn angegeben, auf ATP verzichtet, und für B und C die Inkubationszeit auf 1 h bei 37 °C erhöht.

A, Ni-IMAC nach optimiertem Verfahren für AtRECQ2. Im oberen Bereich ist das Autoradiogramm eines SDA mit verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung gezeigt, im unteren Bereich sind die gleichen Fraktionen zu sehen, die auf einem 10 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt wurden, das Kolloidal-Coomassie gefärbt wurde. Die Höhe des vollständigen abgelösten Oligonukleotids ist gekennzeichnet. Eine Detektion unterhalb dieser Höhe weist auf einen nukleolytischen Abbau hin. Spur 1, LF bezeichnet die Ladefraktion, Spur 2, FT stellt den Durchfluss dar. Für Spur 3, W1 wurde das gesamte Waschvolumen mit Triton-X-100 gesammelt. Spur 4, W2 stellt den daran anschließenden Waschschritt dar. Spur 5 entspricht einer Fraktion, kurz vor dem Wechsel zum Waschschritt mit 140 mM Imidazol. Spuren 6 bis 9 sind aufeinanderfolgende Fraktionen, für die 140 mM Imidazol eingestellt war. Spuren 10 und 11 entsprechen Fraktionen kurz vor dem Wechsel zur Imidazolkonzentration von ca. 360 mM. Fraktionen, die in Spuren 13-15 verwendet wurden, stellen aufeinanderfolgende AtRECQ2-Elutionsfraktionen dar.

B, AtRECQ2 Endfraktionen der optimierten Ni-IMAC und der Doppelaufreinigung (Ni-IMAC und CAC) wurden in An- und Abwesenheit von ATP auf ihre Aktivität getestet. Die Höhe der, in der Ni-IMAC-Einfachaufreinigung erkennbaren, nukleolytischen Abbaufragmente ist durch einen roten Kasten gekennzeichnet.

C, AtRECQ3 und AtRECQ3-K64M Endfraktionen der optimierten Ni-IMAC wurden in An- und Abwesenheit von ATP auf ihre Aktivität getestet. Zur Kontrolle wurden Reaktionen ohne Enzym inkubiert, die zeigen, dass die Aufreinigungsstrategie erfolgreich war (unterschiedliche Gele für die beiden Kästen + und - ATP).

D, wie C aber mit AtRECQ2 und AtRECQ2-K117M aufgereinigt über die Kombination von Ni-IMAC und CAC. Für die Spur Δ wurde das Substrat hitzedenaturiert.

Gleichzeitig wurde hiermit gezeigt, dass die Proteine AtRECQ2 und AtRECQ3 nicht nur Helikasemotive besitzen, sondern auch tatsächlich eine DNA-Strang-Entwindungsaktivität katalysieren. Die AtRECQ-Proteine mit Aminosäureaustausch wurden auch in allen weiteren Assays mit unterschiedlichen Substraten auf Aktivität getestet. Zum einen sollte dies ausschließen, dass eine *E. coli*-Helikase gemessen wird, für die die in Abbildung 19 gezeigte Struktur kein Substrat darstellt. Zum anderen war so die Möglichkeit gegeben, eine weitere Aktivität der Proteine mit DNA-Substraten zu entdecken, die keine ATP-Hydrolyse braucht, wie z.B. eine sogenannte Strand-Annealing (Strangpaarungs-) Aktivität.

4.5. Quantifizierung der verwendeten Proteinproben

Die Konzentration der RECQ-Präparationen wurde auf Kolloidal-Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gelen bestimmt. Dies schien angesichts der gegebenen Konzentrationen verlässlicher als eine photometrische Bestimmung. Dazu wurden als Standard auf dem gleichen Gel verschiedene BSA-Mengen aufgeladen. Die Quantifizierung erfolgte über die Integrale der Graustufeneinheiten der Protein-Banden. Neben den evidenten Punkten wie z.B. gutem Mischen, Berücksichtigung des linearen Bestimmungsbereichs und dem Pipettieren geeigneter Volumina, ergaben sich aus dem Methoden-Setup u.a. folgende Ergebnisse:

1. BSA-Standards nicht einfrieren, sondern jeweils frisch verdünnen
2. RECQ-Proben nicht direkt nach der Aufreinigung, sondern nach dem Aliquotieren quantifizieren (da vermutlich noch eine Absorption an die Wand der neuen Gefäße stattfindet)
3. Proteinaliquots für die Quantifizierung frisch auftauen. Bestimmungen mit Aliquotresten führen oft zu Unterschätzungen (obwohl im Gel keine proteolytischen Abbauprodukte zu erkennen waren).

Abbildung 20 zeigt repräsentative Gele der EcRECQ- bzw. AtRECQ2- und AtRECQ3-Quantifizierung. Es ist in Abbildung 20 auch ersichtlich, dass die Proteine fast zur Homogenität aufgereinigt werden konnten.

EcRECQ migriert schneller, als es seiner Größe von ca. 70 kDa nach zu erwarten wäre. Jedoch kann der C-terminale Tag nachgewiesen werden. Ein Konstrukt mit N-terminalem (statt C-terminalem) His-Tag führte zum gleichen Laufverhalten und das entsprechende Protein trug nachweislich den N-terminalen Tag. Somit handelt es sich um eine SDS-PAGE-Laufanomalie. Auch ist der im SDS-PAGE-Gel zu erkennende Größenunterschied für die AtRECQ2- und AtRECQ3-Proteine leicht stärker manifestiert, als durch den realen Unterschied von ca. 0,5 kDa erwartet. Auch hier sind Tags an beiden Enden nachweisbar.

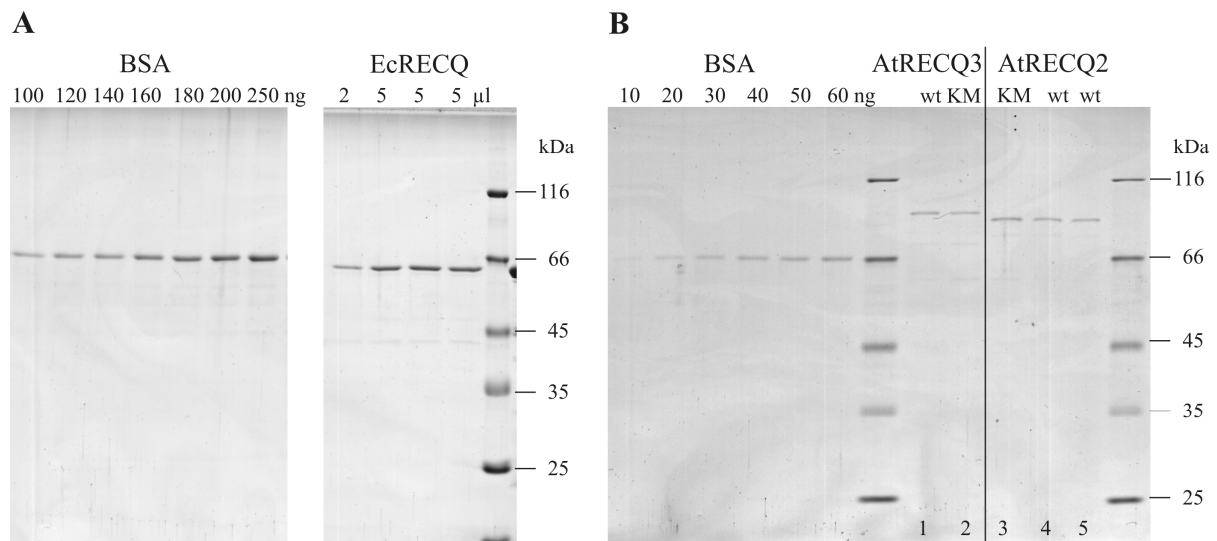


Abbildung 20: Quantifizierung von EcRECQ, AtRECQ2 und AtRECQ3.

A, 12 % und B, 10 % SDS-PAGE, Kolloidal-Coomassie gefärbt. In A und B wurden verschiedene Mengen an Protein-Größenmarker geladen.

A, Quantifizierung von EcRECQ aufgereinigt über Ni-IMAC. Es ergab sich eine Konzentration von 40 ng/µl.

B, Es wurden 10-60 ng BSA und je ca. 40 ng AtRECQ-Protein geladen. AtRECQ3 wurde über Ni-IMAC aufgereinigt. In der mit 1 beschrifteten Spur ist das Protein mit nativer Proteinsequenz (wt) zu sehen, in der Spur 2, KM AtRECQ3-K64M. Die AtRECQ2-Proteine wurden über eine Kombination aus Ni-IMAC und CAC aufgereinigt. In Spur 3 (KM) ist das aufgereinigte AtRECQ2-K117M-Protein zu sehen, in den Spuren 4 und 5 zwei verschiedene Aufreinigungen des Proteins mit nativer Sequenz (wt).

4.6. Nachweis und Analyse der ATPase-Aktivität

Ein Vergleich der gemessenen ATP-Hydrolyse durch AtRECQ2 und AtRECQ2-K117M bzw. AtRECQ3 und AtRECQ3-K64M erlaubt zunächst eine Erweiterung der Qualitätskontrolle der Proteinpräparationen. Es kann somit nicht nur ausgesagt werden, dass keine *E. coli* Helikase mit aufgereinigt wurde, sondern auch keine *E. coli* ATPase (Abbildung 21 A). Es ist ersichtlich, dass sowohl in den Ni-IMAC als auch Ni-IMAC & CAC gereinigten AtRECQ3-K64M-Proteinproben, keine signifikante ATPase Aktivität zu messen ist. In den Einfach- und Doppelaufreinigungen von AtRECQ3 mit funktionellem Walker A-Motiv ist die ATP-Hydrolyse in Gegenwart eines DNA-Cofaktors hingegen deutlich messbar. Die in den AtRECQ3-K64M nicht gemessene, geringe ATPase-Aktivität ohne Zugabe von DNA, ist wahrscheinlich auf eine sehr geringe Kontamination der Proteinproben oder eines anderen Bestandteils der ATPase-Reaktionen mit DNA zurückzuführen. Das gleiche gilt für die AtRECQ2-Aufreinigungen. Beide Enzyme sind also DNA-abhängige ATP-Hydrolasen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die ATP-Hydrolyse für beide Enzyme über 1 h konstant bleibt, d.h. diese über eine Stunde hinweg in dem gewählten Puffer aktiv bleiben.

Der ATPase-Assay bietet zusätzlich die Möglichkeit, die RECQ-Helikasen hinsichtlich der Effizienz verschiedener DNA-Cofaktoren bei der ATP-Hydrolyse zu charakterisieren (Abbildung 21 B).

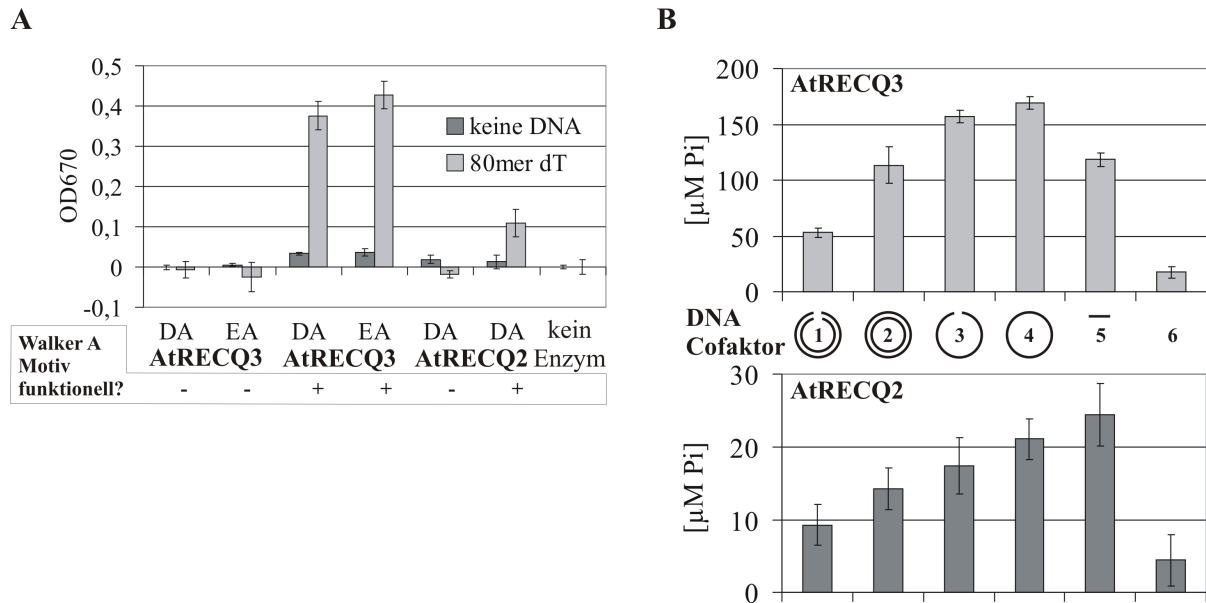


Abbildung 21: ATPase Aktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3.

Das durch die ATP-Hydrolyse freigesetzte Phosphat wurde mit Ammoniummolybdat/Malachitgrün komplexiert und bei 670 nm im Photometer gemessen. Für Abbildung B wurde zusätzlich die Absorption von Phosphat-Standards bestimmt und die gemessenen Absorptionen umgerechnet. Inkubation mit ca. 5 nM Enzym für 45 min. **A**, Vergleichende Analyse der ATPase Aktivität von (Ni-IMAC)-Einfachaufreinigungen (**EA**) und (kombinierte Ni-IMAC und CAC)-Doppelaufreinigungen (**DA**) von AtRECQ3 und AtRECQ2 bzw. AtRECQ3-K64M und AtRECQ2-K117M (nicht funktionelles Walker A Motiv).

B, AtRECQ3 (oben) und AtRECQ2 (unten) wurden mit verschiedenen DNA-Cofaktoren (25 μM Nukleotidkonzentration) inkubiert: 1, linearer Doppelstrang (pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2-Plasmid (7944 bp) / SspI geschnitten); 2, zirkulärer (supercoiled) Doppelstrang (pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2-Plasmid 7944 bp); 3 linearer Einzelstrang (pCAL-n-FLAG-c-HIS-AtRECQ2-Plasmid (2x 7944 nts) / SspI geschnitten / hitzedenaturiert); 4 zirkulärer Einzelstrang (M13mp18 ssDNA (7249 nts)); 5, 80mer dT; 6, Wasser (kein DNA-Cofaktor).

Mit allen getesteten DNA-Cofaktoren kam es zu einer ATP-Hydrolyse, die deutlich über dem Niveau der Hydrolyse ohne zusätzliche DNA lag (Wasser, Cofaktor 6) (siehe auch obige Ergebnisse). Neben der Tatsache, dass durch AtRECQ3 mehr ATP hydrolysiert wird, als durch die gleiche Menge AtRECQ2, zeigt sich auch ein qualitativer Unterschied: die ATP-Hydrolyse durch AtRECQ3 fällt durch die Verwendung des kurzen DNA-Cofaktor 80mer dT im Vergleich zu längere Einzelstrang-DNA deutlich ab, wohingegen für AtRECQ2 kein deutlicher Unterschied zu sehen ist.

4.7. Grundlegende biochemische Analysen

Um den Enzymen optimale Bedingungen für die Katalyse zu gewähren, wurde der Einfluss des pH-Werts und der Salzkonzentration auf den Umsatz eines M13-basierten Substrats getestet. Weiterhin wurden fundamentale Eigenschaften, wie die Möglichkeit der Nutzung verschiedener zweiwertiger Kationen und verschiedener Nukleosidtriphosphate, untersucht. Da die Direktionalität für Helikasen eine wichtige Rolle spielt, wurde auch dieser Aspekt analysiert.

4.7.1. pH-Optimum

Bei der Untersuchung des pH-Optimums der Enzyme konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Puffersalzes eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 22).

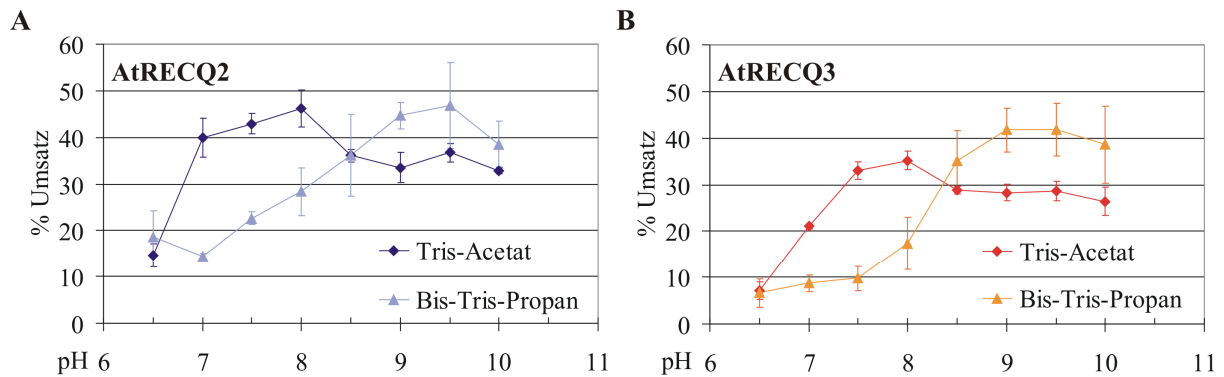


Abbildung 22: Einfluss des pH-Werts und der Puffersubstanz auf die Strangentwindungsaktivität.

Die Strangentwindung eines M13-basierten partiellen Duplexs wurde für **A**, AtRECQ2 und **B**, AtRECQ3 (je etwa 5 nM, 20 min, 37 °C) bei verschiedenen pH-Werten mit Hilfe des Strand-Displacement-Assays analysiert. In die Reaktionen wurde kein NaCl, KCl, NaAcetat, KAcetat zugegeben. Die Puffersalze Tris-Acetat bzw. Bis-Tris-Propan wurden 5-fach überkonzentriert angesetzt und der pH-Wert bei 37 °C eingestellt.

Beide Enzyme können in einem relativ weiten pH-Bereich arbeiten. Es ist auffällig, dass sowohl für AtRECQ2 als auch für AtRECQ3 der optimale pH-Wert mit Bis-Tris-Propan-Puffer weiter im Alkalischen liegt (ca. pH 9,5) als mit dem Tris-Acetat-Puffer (ca. pH 8). Um physiologisch relevante Daten zu erhalten wurde der Tris-Acetat Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 gewählt.

4.7.2. Optimum der Konzentration einwertiger Kationen (Salze)

Neben dem pH-Wert spielt auch das Ionenmilieu für die Enzymaktivität eine Rolle. Daher wurden in dieser Arbeit zunächst verschiedene Konzentrationen folgender Salze getestet: NaCl, KCl, Na-Acetat (NaAc) und K-Acetat (KAc). Es lag weder für AtRECQ2 noch für AtRECQ3 eine signifikante Präferenz eines bestimmten Salzes vor. Es wurde Kaliumacetat gewählt und die Abhängigkeit des Umsatzes von der Konzentration genauer untersucht (Abbildung 23).

Für beide Enzyme fördert der Zusatz geringer Konzentrationen von Kalium-Acetat die DNA-Strangentwindung. Das Optimum liegt für beide Enzyme zwischen 0 und 100 mM Kaliumacetat und in den folgenden Assays wurden daher 50 mM eingesetzt. Konzentrationen ab 150 mM Kaliumacetat hemmen die Strangentwindungsaktivität. Hierbei ist ein deutlicher Unterschied zwischen AtRECQ2 und AtRECQ3 zu erkennen: Die Inhibierung ist bei AtRECQ3 stärker ausgeprägt.

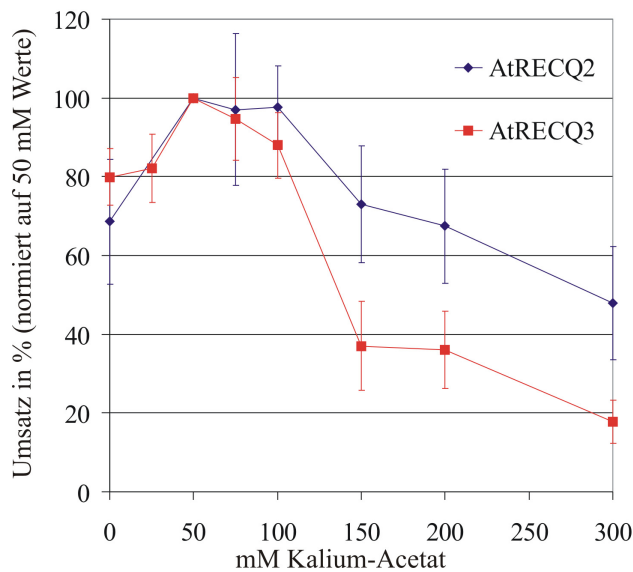


Abbildung 23: Einfluss der Kalium-Acetat Konzentration auf die Strangentwindungs-Aktivität.

Die Strangentwindung eines M13-basierten partiellen Duplexs wurde mit ca. 5 nM AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 bei verschiedenen Kaliumacetat-Konzentrationen getestet. (20 min 37°C). Es wurde der pH-Wert des auf 37 °C temperierten 5-fach konzentrierten Gemischs aus Tris-Base und Kaliumacetat mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt. Um Schwankungen des Absolutumsatzes auszugleichen, wurde jede experimentelle Reihe auf den Umsatz bei 50 mM Kaliumacetat normiert. Hier sind Mittelwerte aus 6 experimentellen Reihen (für 25 und 75 mM Kaliumacetat 3 experimentelle Reihen) samt Standardabweichungen dargestellt.

4.7.3. *Zweiwertige Metall-Cofaktoren*

ATP-abhängige Enzyme können ATP in der Regel nur im Komplex mit zweiwertigen Kationen nutzen. Dazu können bei unterschiedlichen Enzymen unterschiedliche Kationen geeignet sein. Hier wurden Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} hinsichtlich der Möglichkeit die ATP-Hydrolyse und die Strangentwindung durch AtRECQ2 und AtRECQ3 zu katalysieren untersucht (Abbildung 24).

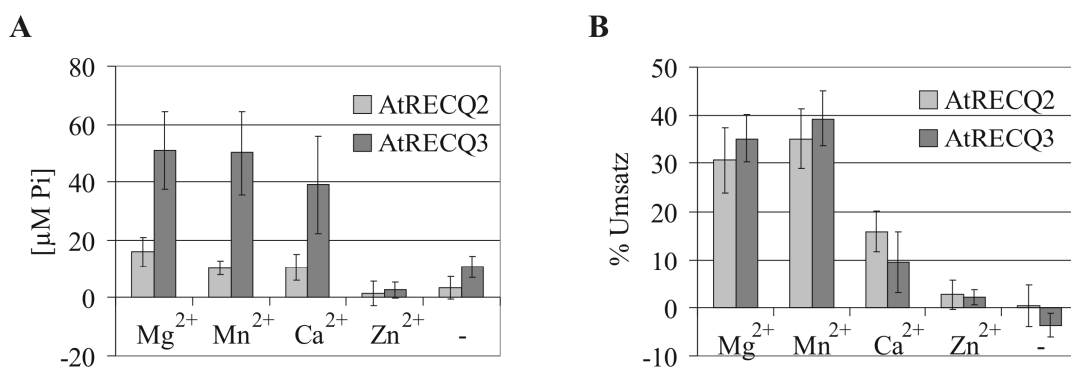


Abbildung 24: ATP-Hydrolyse und DNA-Strangentwindung durch AtRECQ2 und AtRECQ3 in Gegenwart verschiedener Metallcofaktoren.

Bei diesen Versuchen wurde auf DTT in den Reaktionsansätzen verzichtet.

A, Die ATP-Hydrolyse durch ca. 4 nM AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 in 45 min bei 37°C mit 80 mer dT (50 μM Nukleotidkonzentration) DNA-Cofaktor mit verschiedenen Metallcofaktoren und ddH₂O (-) wurde durch Komplexierung des freigesetzten Phosphats im Molybdat/Malachitgrün-Komplex gemessen. Die gemessenen Absorptionen von Reaktionen ohne Enzym wurden jeweils abgezogen.

B, Die Strangentwindung eines M13-basierten partiellen Duplexs durch ca. 5 nM AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 wurde mit verschiedenen Metallcofaktoren und ddH₂O (-) getestet (20 min 37°C). Die Berechnung des Umsatzes erfolgte wie beschrieben, d.h. die Ablösungen in Reaktionen ohne Enzym wurden miteinbezogen.

Wird der Unterschied in der Absolutmenge an hydrolysierten ATP nicht berücksichtigt, zeigt sich, dass für die AtRECQ2- und AtRECQ3-vermittelte ATP-Hydrolyse Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} gleichwertige Cofaktoren darstellen. Für die Strangentwindung hingegen sind nur Mg^{2+} und Mn^{2+} gleichwertig. Ca^{2+} unterstützt die Enzym-katalysierte Strangentwindung nur zu einem geringeren Anteil. Zn^{2+} wiederum kann weder für die ATPase- noch für die Strangentwindungsaktivität als Cofaktor von AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 dienen.

4.7.4. Nukleosidtriphosphat (NTP)-Cosubstrate

Neben ATP kann oft auch dATP als Energiequelle dienen, bzw. ist oft sogar das optimale Nukleosidtriphosphat. Auch Guanin als andere Purin-Base oder auch Pyrimidinbasen können den Grundbaustein möglicher NTPs darstellen. In Abbildung 25 ist das Ergebnis des Strand-Displacement-Assays mit verschiedenen (d)NTPs für AtRECQ2 und AtRECQ3 gezeigt.

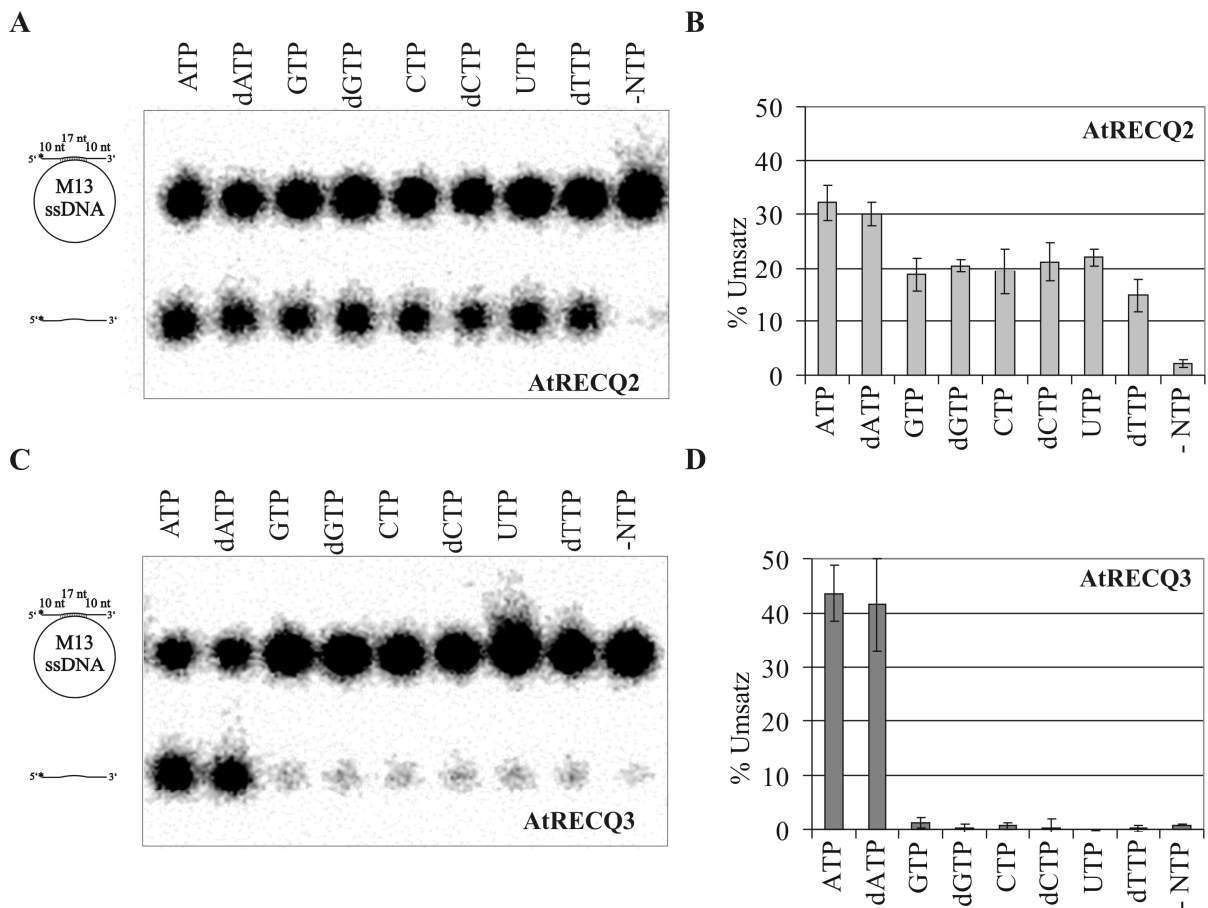


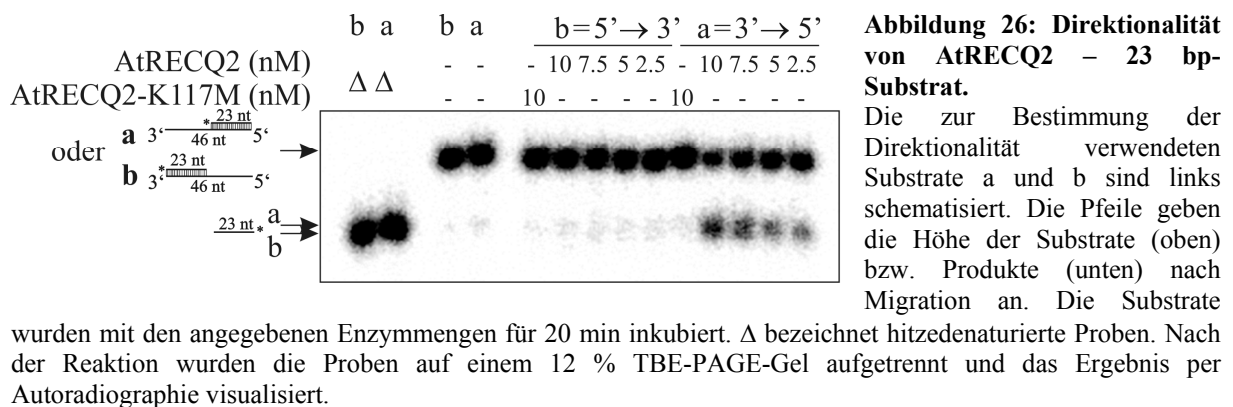
Abbildung 25: Verwendung verschiedener Nukleosidtriphosphate als Energiequelle für die AtRECQ2- bzw. AtRECQ3-katalysierte DNA-Strang-Entwindung.

Der Einfluss verschiedener (d)NTPs auf die enzymkatalysierte Strangentwindung des in A und C schematisierten M13-basierten partiellen Duplexs wurde getestet: ca. 5 nM AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 wurden mit 1,8 mM des jeweiligen NTP und 1,8 mM $MgCl_2$ 20 min bei 37 °C inkubiert. Abbildungen A und C zeigen repräsentative Autoradiogramme nach nativer Gelelektrophorese der Reaktionen für AtRECQ2 (A) und AtRECQ3 (B). In Abbildungen B und D ist das Ergebnis der Quantifizierung dargestellt. Es handelt sich hier um Mittelwerte von Triplikaten und zugehörige Standardabweichungen.

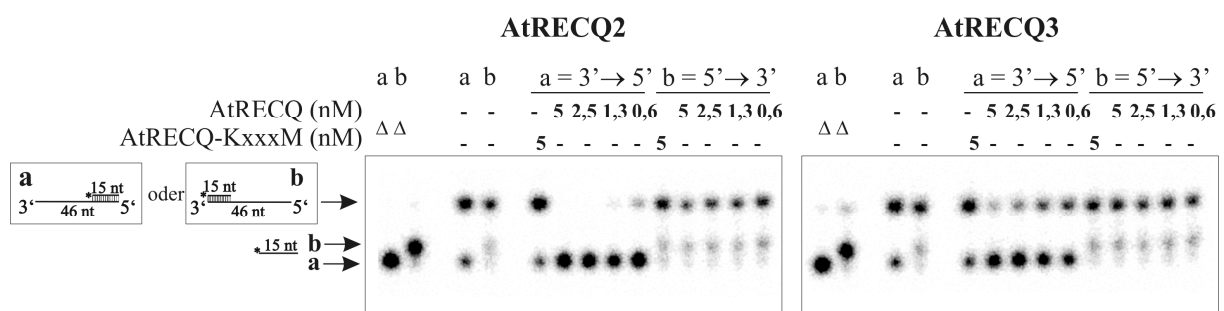
Es ist deutlich zu erkennen, dass AtRECQ3 nur ATP und dATP zur Strang-Entwindung nutzen kann. Auch bei AtRECQ2 führen diese beiden NTPs zum höchsten Umsatz. Allerdings kann AtRECQ2 auch alle anderen getesteten (d)NTPs für die DNA-Strangentwindung nutzen. Das gleiche qualitative Ergebnis erhält man auch bei Untersuchung der NTPase-Funktionen (Daten nicht gezeigt).

4.7.5. *Direktionalität*

Die Direktionalität ist ein wichtiges Charakteristikum von Helikasen. Sie wird in der Regel entweder mit Plasmid- oder mit Oligonukleotid-basierten Substraten bestimmt. Für AtRECQ2 konnte die 3' nach 5' Direktionalität erfolgreich mit einem 23 Basenpaar-Oligonukleotid-Substrat gezeigt werden (Abbildung 26).



AtRECQ3 setzte dieses Substrat nicht um. Daher wurde ein weiteres Direktionalitätssubstrat mit kürzerem Doppelstrangbereich getestet (Abbildung 27).



Mit diesem Substrat war auch für AtRECQ3 die Direktionalität der Helikase bestimmbar. Bei beiden untersuchten Helikasen handelt es sich um 3' → 5' Helikasen.

4.8. Einfluss der Länge des Duplexbereichs auf die Entwindung

Nach den in Abschnitt 4.7.5 gezeigten Ergebnissen stellt sich die Frage, wie sich die Länge des Duplexbereichs konkret auf die Entwindungsfähigkeit von AtRECQ2 und AtRECQ3 auswirkt. Daher wurde der Umsatz verschieden langer Duplexe (15 bis 23 bp) unter Standardbedingungen analysiert (Abbildung 28).

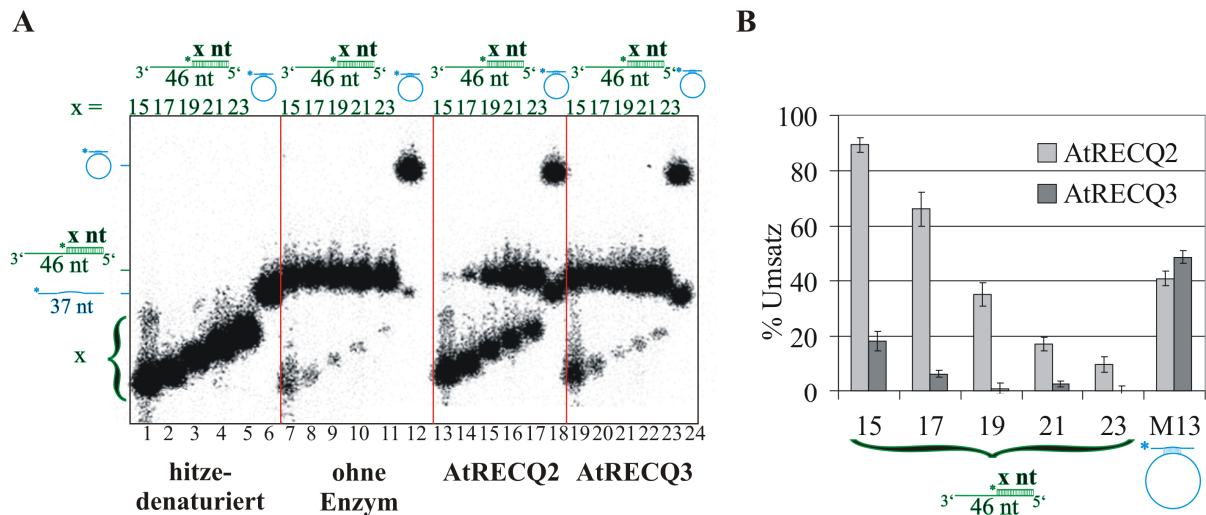


Abbildung 28: Einfluss der Länge des Duplexbereichs auf die Entwindungsaktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3.

5 nM AtRECQ2 bzw. 5 nM AtRECQ3 wurden mit den jeweilig symbolisierten Substraten 20 min bei 37 °C unter Standardbedingungen inkubiert und die Reaktionsprodukte durch native Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das M13-basierte Substrat mit 17 bp und je 10 nt 3' und 5' Überhang verwendet.

A, zeigt eine Zusammenstellung der entsprechenden Autoradiogramme.

B, Das Experiment wurde drei weitere Male mit neu hergestellten Substraten wiederholt und die Umsätze quantifiziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben.

Die Zusammensetzung der Duplexbereiche ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Duplexbereiche der 3' Überhangssubstrate (3' ÜS) und dem M13-basierten Standardsubstrat (M13-PD) (A und T- vs. G und C-Gehalt)

| 15 bp – 3' ÜS | | 17 bp – 3' ÜS | | 19 bp – 3' ÜS | | 21 bp – 3' ÜS | | 23 bp – 3' ÜS | | M13-PD | |
|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|--------|-----|
| A/T | G/C | A/T | G/C | A/T | G/C | A/T | G/C | A/T | G/C | A/T | G/C |
| 4 | 11 | 5 | 12 | 6 | 13 | 7 | 14 | 9 | 14 | 8 | 9 |

Es ist deutlich zu erkennen, dass die 3' Überhangssubstrate mit zunehmender Länge des Duplexbereichs schlechter umgesetzt werden können. Wohingegen für AtRECQ2 für Duplexe bis zu einer Länge von 23 bp ein Umsatz messbar ist, ist dies für AtRECQ3 nur mit 15 bp und 17 bp-Duplexen möglich. Im Gegensatz dazu wird das M13-basierte Substrat von beiden Enzymen in etwa gleich gut umgesetzt.

4.9. Einfluss der freien Magnesiumionen-Konzentration auf die Strangentwindungsaktivität

Wie im Abschnitt 4.7.5 erwähnt, wurde das für Abbildung 26 verwendete Substrat, unter den gewählten Bedingungen, nur von AtRECQ2, aber nicht von AtRECQ3 umgesetzt. Diese Bedingungen entsprachen denen, die im Methoden-Teil als Standardbedingungen beschrieben sind. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass für den Umsatz verschiedener DNA-Strukturen durch AtRECQ2 und AtRECQ3 unterschiedliche Konzentrationen an freien Magnesium-Ionen optimal sind. Um zu zeigen, dass der Umsatz im Wesentlichen von der freien Magnesium-Konzentration und nicht von der (Absolut)- Mg^{2+} -Konzentration oder dem Verhältnis von Mg^{2+} zu ATP abhängt, wurde der gleiche experimentelle Datensatz auf verschiedene Weisen dargestellt (Abbildung 29).

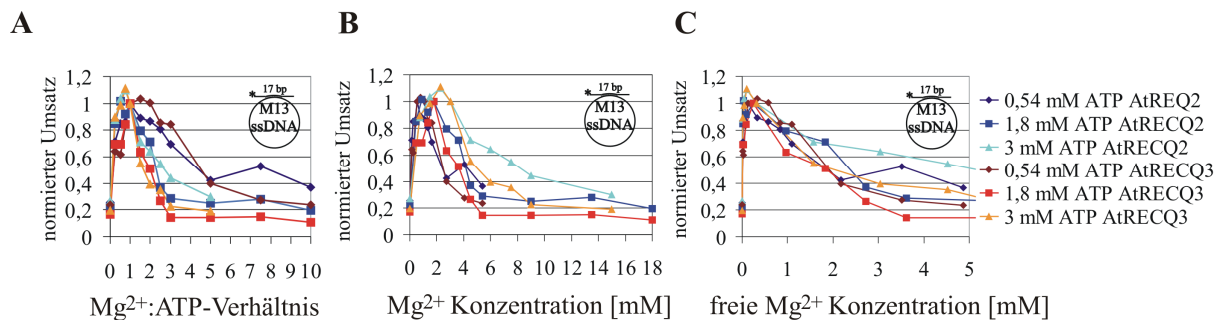


Abbildung 29: Verschiedene Darstellungen des Umsatzes eines M13-basierten partiellen Duplexsubstrats bei verschiedenen ATP und Mg^{2+} -Konzentrationen.

Die Strangentwindung des schematisierten M13-basierten Substrats durch AtRECQ2 und AtRECQ3 wurde bei drei verschiedenen ATP-Konzentrationen in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration getestet. Die Umsätze wurden auf den Umsatz bei einem Mg^{2+} :ATP-Verhältnis von 1:1 normiert.

A, Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit des Mg^{2+} zu ATP-Verhältnisses

B, Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit der zugegebenen Mg^{2+} -Konzentration

C, Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit der freien Mg^{2+} -Konzentration Die freien Magnesiumionen-Konzentrationen für alle Mg^{2+} und ATP-Kombinationen wurden mit WEBMAXCLITE v1.15 mit den Angaben 37°C, pH 8,0 und 0,06 N Ionenstärke berechnet. Es ist nur ein Ausschnitt dargestellt.

Während die Kurven bei der Darstellung des Umsatzes als Funktion des Mg^{2+} zu ATP-Verhältnisses (für die unterschiedlichen ATP-Konzentrationen) am stärksten streuen, fallen sie bei der Betrachtung der freien Magnesium-Ionen-Konzentration am besten zusammen. Bei dieser Darstellung zeigt sich deutlich, dass der Umsatz des M13-basierten Substrats mit zunehmender freier Magnesiumkonzentration abnimmt.

Dieses Ergebnis wurde zum einen mit verschiedenen M13mp18 ssDNA Chargen und zum anderen mit einem weiteren M13-basierten Substrat (17 Basenpaar-Duplexbereich ohne 3' und 5' Überhang) bestätigt (mehrfache Wiederholungen).

Auch der Umsatz anderer Substrate bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen wurde getestet (Abbildung 30). Zunächst wurden verschiedene partielle Duplexe getestet. Das

Ergebnis ist exemplarisch in Abbildung 30 A dargestellt. Da AtRECQ2 das Substrat sehr gut umsetzen konnte, war kein Optimum zu erkennen. Für AtRECQ3 ist deutlich zu erkennen, dass für den Umsatz dieses partiellen Duplexsubstrats eine freie Magnesiumkonzentration von etwa 3 bis 5 mM optimal ist (Abbildung 30 A). Dieses Ergebnis wurde mit ähnlichen Substraten mit anderen Sequenzkontexten bestätigt (zum einen andere Überhangssequenz, zum anderen ein vollständig neu entworfenes Substrat). AtRECQ2 zeigte beim Umsatz eines partiellen Duplexsubstrats mit 20 bp und 3' und 5' Überhängen von 13 nt ein ähnliches Verhalten.

Auch der Umsatz der X12-Holliday-Junction (siehe Abschnitt 4.12) wurde bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen getestet. AtRECQ2 verhält sich beim Umsatz der Holliday-Junction wie beim Umsatz der M13-basierten Substrate: Der Umsatz wird durch hohe freie Magnesiumkonzentrationen gehemmt (Abbildung 30 B).

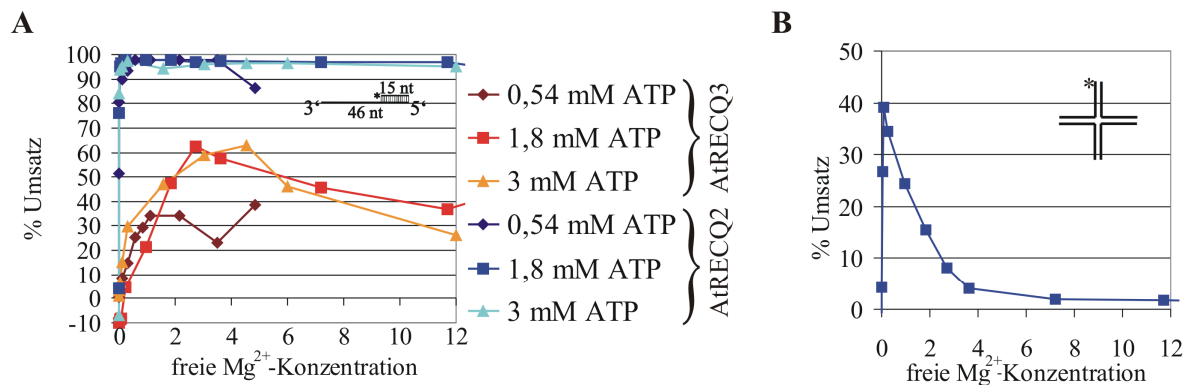


Abbildung 30: Abhängigkeit des Umsatzes verschiedener DNA-Strukturen von der freien Mg²⁺-Konzentration.

A, Die Strangentwindung des schematisierten partiellen Duplex-Substrats durch AtRECQ2 und AtRECQ3 wurde bei drei verschiedenen ATP-Konzentrationen in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration getestet. Dafür wurde mit 5 nM AtRECQ2 und AtRECQ3 20 min bei 37 °C inkubiert.

B, Die Strangentwindung einer X12-Holliday-Junction durch 5 nM AtRECQ2 wurde mit 1,8 mM ATP bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen getestet (20 min 37 °C). Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen des Umsatzes zu Spayed Arm Produkt.

4.10. Anforderungen an den 3' Überhang bei einem partiellen Duplex

Nach der Erkenntnis, dass AtRECQ2 und AtRECQ3 partielle Duplexbereiche unterschiedlich gut entwinden können (Kapitel 4.8), stellt sich die Frage, ob sich dieses Ergebnis auf unterschiedliche Anforderungen an die Länge des 3' Überhangs zurückführen lässt. In diesem Falle wäre verständlich, dass das M13-basierte Substrat mit einem quasi unendlichen 3' Überhang durch beide Enzyme ähnlich gut umgesetzt wird. Die Beantwortung dieser Frage ist auch deshalb wichtig, da sie unter Umständen erklären kann, warum eine bestimmte Helikase ein bestimmtes Substrat umsetzen kann, ein anderes aber nicht. Wie in Kapitel 4.9 gezeigt, ist für die Analyse von solchen Substraten eine höhere freie Magnesiumkonzentration zuträglich,

die daher verwendet wurde. Es wurden partielle Duplexe mit 15 bp Duplexbereich und variablen 3' Überhangslängen von 0 bis 31 Nukleotiden untersucht (Abbildung 31).

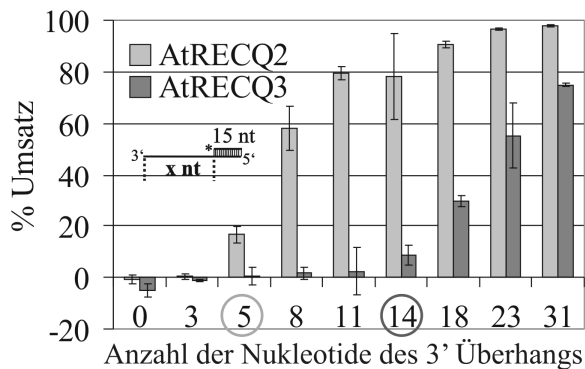


Abbildung 31: Abhängigkeit des Umsatzes eines partiellen Duplex-DNA-Substrats von der Länge des 3' Überhangs.

5 nM AtRECQ2 bzw. 5 nM AtRECQ3 wurden bei einer ATP-Konzentration von 1,8 mM und einer MgCl₂-Konzentration von 4,5 mM (entspricht ca. 2,7 mM freiem Mg²⁺) mit den verschiedenen 3' Überhangssubstraten mit 15 bp Duplexbereich inkubiert (20 min 37 °C). Dargestellt ist der Mittelwert von Triplikaten samt Standardabweichung nach erfolgter Quantifizierung des Umsatzes. Mindestlängen sind umkreist.

AtRECQ2 benötigt etwa einen 3' Überhang von 5 Nukleotiden, um den 15 bp-Duplexbereich zu entwinden. Zunächst nimmt der Umsatz mit zunehmender Länge des 3' Überhangs zu. Bei einer Verlängerung des 3' Überhangs über 18 bis 23 Nukleotide hinaus kann kein Unterschied gemessen werden. Wohingegen diese Tendenz auch für AtRECQ3 zu erkennen ist, braucht AtRECQ3 einen 3' Überhang von etwa 14 Nukleotiden für den 15 bp-Bereich signifikant zu entwinden und auch mit einem 3' Überhang von 31 Nukleotiden ist noch kein Plateau des Umsatzes erreicht.

4.11. Umsatz verschiedener D-Loop-Strukturen

Da RecQ-Helikasen die Genomstabilität gewährleisten, ist die Analyse des Umsatzes rekombinogener Strukturen besonders interessant. Hier wurde untersucht, ob AtRECQ2 und AtRECQ3 in der Lage sind, den eindringenden Strang eines D-Loops (von Displacement-Loops) herauszulösen (Melting). Dazu wurden drei künstlich hergestellte D-Loops mit folgenden Unterschieden untersucht: Eindringender Strang ohne Überhänge, eindringender Strang mit einem 3' Schwanz/Überhang und ein eindringender Strang mit einem 5' Schwanz/Überhang. Außerdem wurde der Umsatz an der zu Grunde liegenden Bubble-Struktur analysiert. Zunächst wurde der eindringende Strang markiert und der Umsatz sowohl als Funktion der Enzymkonzentration (Abbildung 32), als auch der Zeit (Abbildung 33), analysiert.

Wie in den mit „-“ gekennzeichneten Spuren in Abbildung 32 erkennbar, sind die für diese Experimente verwendeten Substrate nicht alle im gleichen Maße intakt, sondern, nach der Gelextraktion bzw. am Ende der Inkubationszeit, zum Teil wieder in die aufbauenden Oligonukleotide zerfallen (Tabelle 10). Dennoch ist der Umsatz der D-Loop-Strukturen eindeutig erkennbar. Die Bubble-Struktur wird nur von AtRECQ2 signifikant umgesetzt.

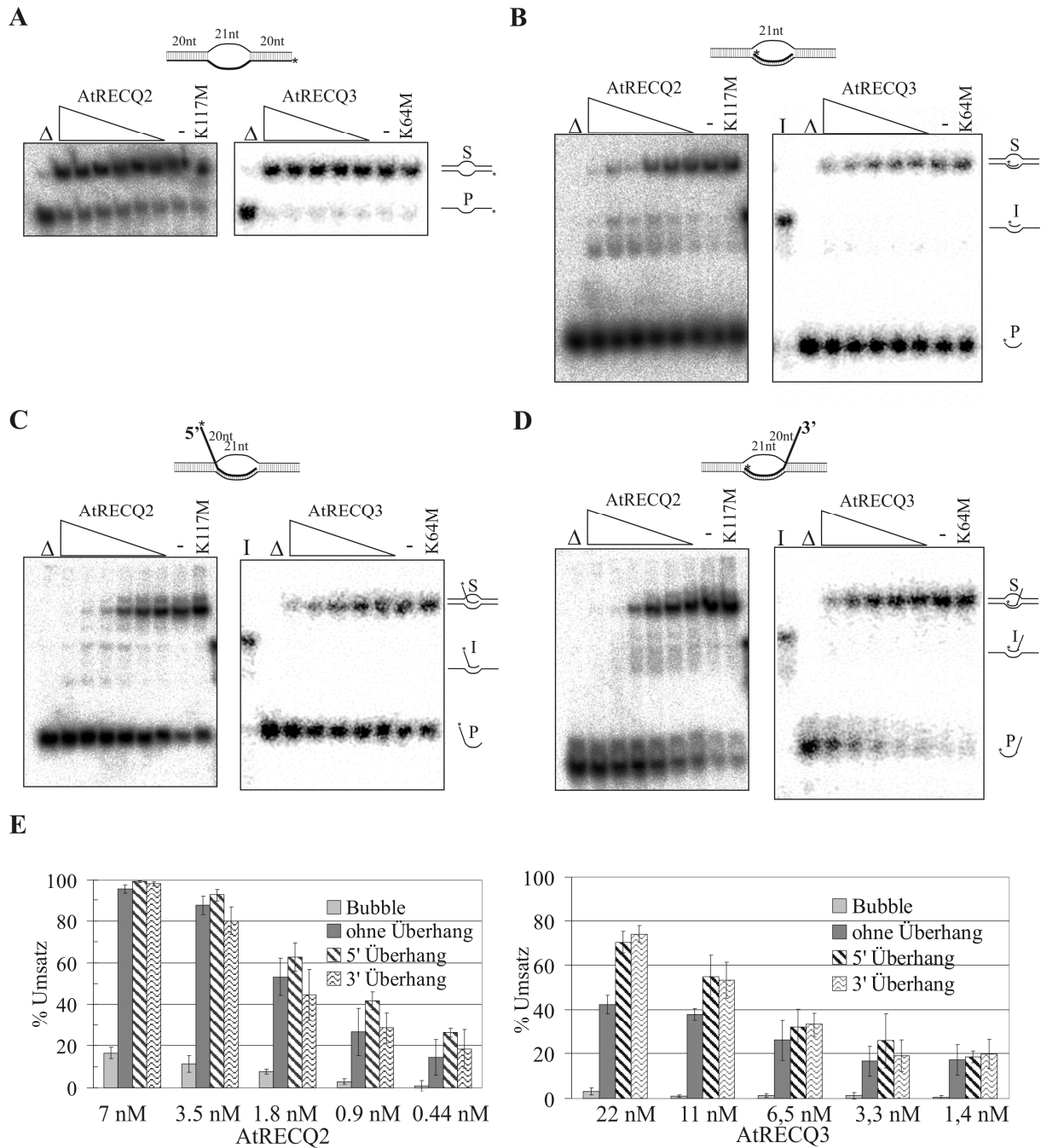


Abbildung 32: Umsatz von verschiedenen D-Loop-Strukturen (mit Markierung des eindringenden Strangs) und einer Bubble-Struktur in Abhängigkeit der AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 Konzentration.

Verschiedene Konzentrationen von AtRECQ2 (7 nM, 3,5 nM, 1,8 nM, 0,9 nM und 0,44 nM) und 10 nM AtRECQ2-K117M bzw. AtRECQ3 (22 nM, 11 nM, 6,5 nM, 3,3 nM und 1,4 nM) und ca. 4 nM AtRECQ3-K64M wurden unter Standardbedingungen für 30 min mit verschiedenen DNA-Strukturen inkubiert. Die verschiedenen Substrate sind über den jeweiligen Autoradiographien schematisch dargestellt. Für die mit – markierten Spuren wurde das Substrat ohne Enzym inkubiert. Nach nativer 10 % TBE-PAGE wurden die Gele mit Hilfe des Phosphorimagers ausgewertet. Im Falle von AtRECQ2 sind Abbildungen gezeigt, für welche die Gele getrocknet und auf einem Phosphorscreen exponiert wurden. Für die mit Δ gekennzeichneten Spuren wurde das Substrat hitzedenaturiert, I sind die jeweiligen Intermediärstrukturen.

A, Bubble –Struktur; **B**, D-Loop ohne Überhang **C**, D-Loop mit 5' Überhang und **D**, D-Loop mit 3' Überhang. Für Abbildungsteil **E** wurden die Umsätze von mindestens drei Experimenten gemittelt und samt Standardabweichungen dargestellt.

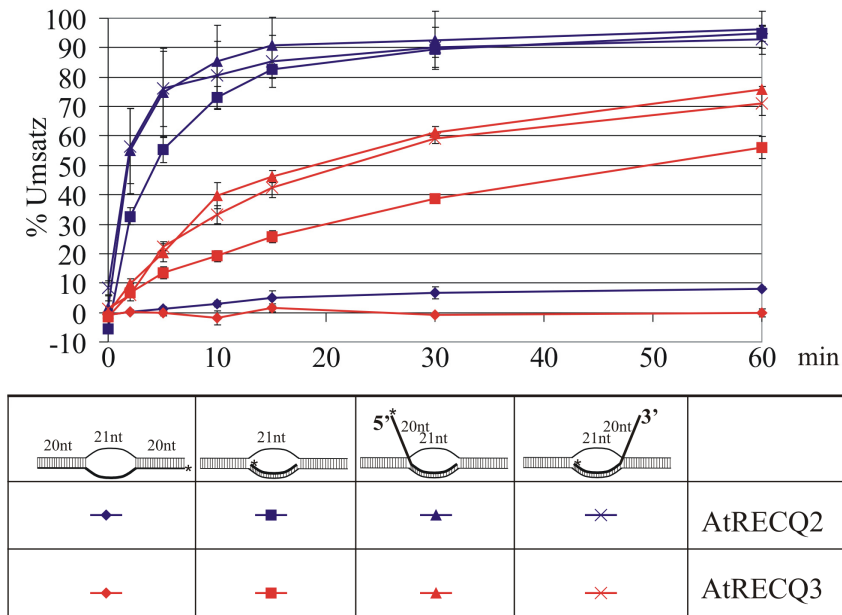


Abbildung 33: AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 katalysierter Umsatz verschiedener D-Loop Strukturen mit markierten eindringenden Strängen und einer Bubble-Struktur als Funktion der Zeit.

Es wurden 5 nM AtRECQ2 und 11 nM AtRECQ3 mit den verschiedenen DNA-Substraten inkubiert, die schematisch in der Legende symbolisiert sind. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde den Reaktionen ein Probenaliquot entnommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Phosphorimagers nach nativer TBE-PAGE. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichung.

Die theoretisch denkbaren weiteren Produkte aus dem eindringenden Strang und einem Bubble-Strang (I in Abbildung 32) fielen quantitativ nicht ins Gewicht und wurden daher auch nicht quantifiziert. Die in Abbildung 32 gezeigten Daten werden durch die Daten der Zeitkinetik Abbildung 33 im Wesentlichen bestätigt. Bei hohen Enzymkonzentrationen ist für AtRECQ2 kein Unterschied im endgültigen Umsatz der verschiedenen D-Loop-Strukturen zu sehen. Der D-Loop mit einem eindringenden Strang ohne Überhänge scheint langsamer umgesetzt zu werden. Um diesen möglichen Unterschied genauer zu analysieren, wurden die Zeitkinetikexperimente im direkten Vergleich der Substrate untereinander mit ca. 1 nM AtRECQ2 wiederholt und es zeigte sich, dass die unterschiedlichen eingedrungenen Stränge durch AtRECQ2 ohne signifikanten Unterschied herausgelöst werden. AtRECQ3 hingegen, kann den Daten dieser Experimente zu Folge, einen eindringenden Strang besser aus dem D-Loop herauslösen, falls dieser Strang einen Überhang besitzt (3' oder 5').

Der zeitabhängige Umsatz wurde mit neu präparierten D-Loops mit anderer Markierung (aber gleichem Sequenzkontext) wiederholt. Diesmal wurde ein Strang der zugrunde liegenden Bubble-Struktur markiert. Dies ermöglicht eine Analyse, ob das Vorhandensein eines eindringenden Strangs einen Einfluss auf den Umsatz der übrigen Bubble-Struktur hat (schematische Darstellung der Substrate und analysierter Reaktionsprodukte siehe Abbildung 34). Außerdem bestand die Hoffnung, dass die Substrate eine ähnliche Qualität hinsichtlich ihrer Intaktheit haben (Tabelle 10). Durch die Verwendung eines Markierungsansatzes zur Herstellung aller Substrate, war außerdem die spezifische Aktivität der Proben gleich, so dass Unterschiede durch Fehler in der Bestimmung der spezifischen Aktivität der markierten DNA-Substrate ausgeschlossen werden können.

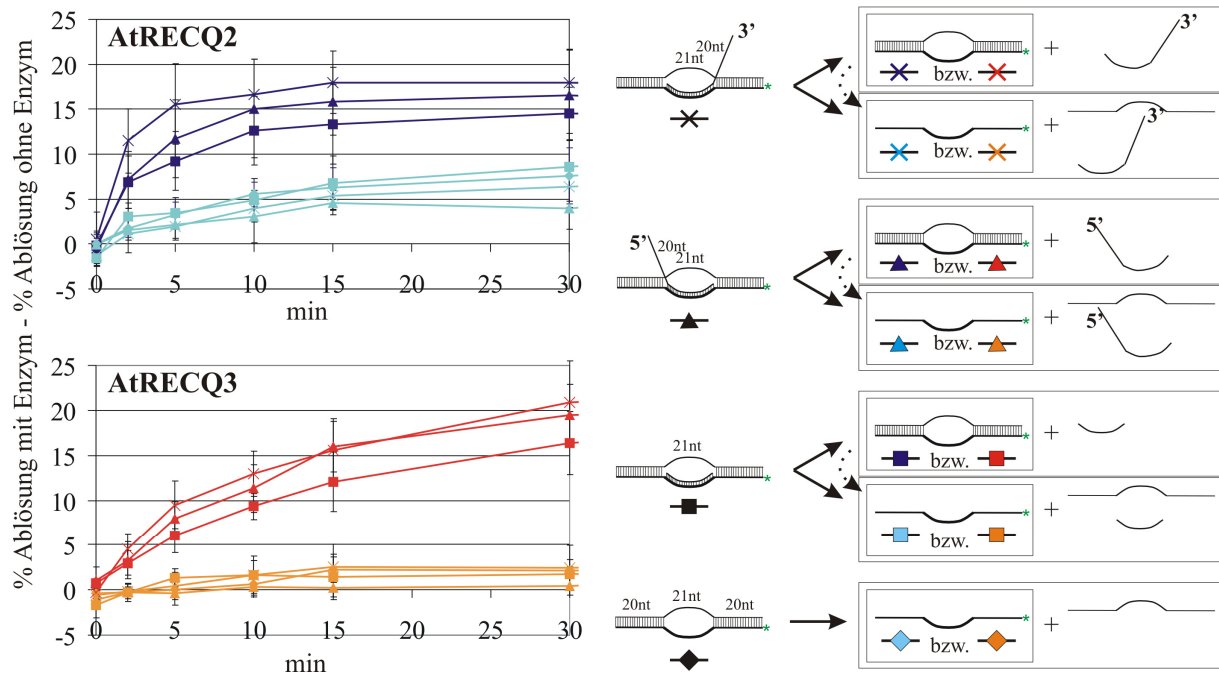


Abbildung 34: AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 katalysierter Umsatz verschiedener D-Loop-Strukturen und einer Bubble-Struktur mit Markierung der Bubble-Struktur als Funktion der Zeit.

Es wurden 1,8 nM AtRECQ2 und 11 nM AtRECQ3 mit den verschiedenen DNA-Substraten inkubiert, die in der Mitte schematisch dargestellt sind. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde den Reaktionen ein Probenaliquot entnommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Phosphorimagers nach nativer TBE-PAGE. Die quantifizierten Produkte Bubble oder Einzelstrang (siehe rechts für Zuordnung der Symbole der Diagramme und Erklärung der Reaktionen) waren die Hauptprodukte. Auch hier wurden kaum die in Abbildung 32 als I gekennzeichneten denkbaren Produkte gebildet. Diese sind daher weder in der schematischen Darstellung rechts noch in der Quantifizierung berücksichtigt. Es wurden für jedes Substrat parallele Reaktionen ohne Enzym durchgeführt. Vergleichbar wie in Abbildung 32 (siehe auch Tabelle 10) waren auch in den Reaktionen ohne Enzym den Enzymprodukten entsprechende Spezies zu sehen. Für die Diagramme wurde die relative Menge dieser Spezies daher für die Reaktionen mit und ohne Enzym bestimmt (wie in allen anderen Experimenten auch) und für die Bestimmung der enzymkatalysierten Ablösung von einander abgezogen (bei allen anderen bisher gezeigten Experimenten erfolgte anschließend die Berechnung des Umsatzes wie im Material und Methoden-Teil beschrieben). Dargestellt sind für AtRECQ2 Mittelwerte aus fünf Experimenten, drei für AtRECQ3, mit Standardabweichung.

Ergebnisse mit diesem Substrat zeigen, dass die dem D-Loop zugrunde liegende Bubble-Struktur durch den eingedrungenen Strang nicht signifikant besser oder schlechter umgesetzt wird, als der Bubble alleine. Diese Aussage gilt v.a. für AtRECQ2; hier wird der Bubble eindeutig umgesetzt. Der Umsatz des Bubbles durch AtRECQ3 ist am Rande der Nachweisgrenze.

Für AtRECQ2 bestätigen die Ergebnisse mit den D-Loop-Strukturen mit Markierung des Bubbles, die Ergebnisse mit den D-Loop-Strukturen mit Markierung des eindringenden Strangs: Der eingedrungene Strang wird im Wesentlichen gleich effizient herausgelöst, ob er einen 3' Überhang, einen 5' Überhang oder keinen Überhang hat.

Für AtRECQ3 stellt sich die Situation etwas anders dar. Wohingegen in Abbildung 32 (getestet für 11 nM AtRECQ3) und Abbildung 33 (getestet für 30 min Zeitwert) ein statistisch signifikanter Umsatzunterschied zwischen D-Loops mit und ohne Überhang des

eindringenden Strangs zu erkennen war, ist dieser Unterschied in Abbildung 34 (getestet für 30 min Zeitwert) nicht statistisch signifikant. Dies ist im Wesentlichen auf die hohen Standardabweichungen zurückzuführen. In jeder experimentellen Reihe war der Umsatz der D-Loop-Struktur mit eindringendem Strang ohne Überhang niedriger als für die anderen beiden D-Loop-Strukturen.

Nimmt man alle Daten zusammen, kann man folgendes mit Sicherheit sagen: Sowohl AtRECQ2 als auch AtRECQ3 können eingedrungene Stränge aus D-Loops herauslösen. Dies ist möglich mit eingedrungenen Strängen mit 3', 5' und ohne Überhang. Zusätzlich wurde gezeigt, dass AtRECQ2 die zu Grunde liegende Bubble-Struktur auflösen kann.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente legen den Schluss nahe, dass AtRECQ2 alle getesteten eingedrungenen Stränge der D-Loops ähnlich gut herauslösen kann. Zusätzliche Experimente sind für eine solche Aussage über AtRECQ3 notwendig. Es wäre wünschenswert, dass alle D-Loops hierfür ähnlich intakt aufgereinigt werden.

Tabelle 10: Qualität der verwendeten D-Loop-Strukturen in dieser Arbeit (bezogen auf Intaktheit zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit im Ansatz ohne Enzym)

Die Substrate in Teil A lagen der Abbildung 32 und der Abbildung 33 zu Grunde. Die Substrate in Teil B lagen der Abbildung 34 zu Grunde. Die Mittelwerte der Ergebnisse der relativen Quantifizierung des intakten Substrats und der Zerfallsprodukte zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit von einer Stunde sind angegeben

| A | Markierung | Substrat | | Bubble | | Einzelstrang | |
|---------------|----------------------|----------|----------|---------------------------------------|----------|--------------|----------|
| | | t=0 min | t=60 min | t=0 min | t=60 min | t=0 min | t=60 min |
| Bubble | Bubble-Strang | 94,5 % | 83,5 % | | | 5,4 % | 16,5 % |
| Ohne Überhang | Eindringender Strang | 54,0 % | 45,0 % | Nicht erkennbar, da nicht markiert | | 46,0 % | 55,0 % |
| 5' Überhang | Eindringender Strang | 68,8 % | 57,0 % | | | 31,2 % | 43,0 % |
| 3' Überhang | Eindringender Strang | 89,6 % | 62,0 % | | | 10,4 % | 38,0 % |
| B | Markierung | Substrat | | Bubble | | Einzelstrang | |
| | | t=0 min | t=60 min | t=0 min | t=60 min | t=0 min | t=60 min |
| Bubble | Bubble-Strang | 95,3 % | 82,9 % | | | 4,7 % | 17,1 % |
| Ohne Überhang | Bubble-Strang | 69,7 % | 55,8 % | 21,6 % | 26,4 % | 8,7 % | 17,7 % |
| 5' Überhang | Bubble-Strang | 52,9 % | 40,8 % | 40,4 % | 43,6 % | 6,8 % | 15,7 % |
| 3' Überhang | Bubble-Strang | 49,3 % | 37,5 % | 42,6 % | 44,2 % | 8,1 % | 18,3 % |

4.12. Umsatz einer partiell mobilen Holliday-Junction

Auch Holliday-Junctions (HJ) sind wichtige Substrate für bereits bekannte RecQ-Helikasen. Daher wurden auch AtRECQ2 und AtRECQ3 auf einen Umsatz von HJs getestet. Hierfür wurde eine partiell mobile HJ verwendet, die X12-HJ (Abbildung 35).

Der AtRECQ-vermittelte Umsatz wurde als Funktion der Enzymkonzentration (Abbildung 36) und als Funktion der Zeit (Abbildung 37) analysiert. Es wurde eine niedrige freie Magnesiumionen-Konzentration verwendet (1,35 mM MgCl₂ und 1,8 mM ATP), da wie bereits in Abbildung 30 B gezeigt, diese am besten geeignet ist.

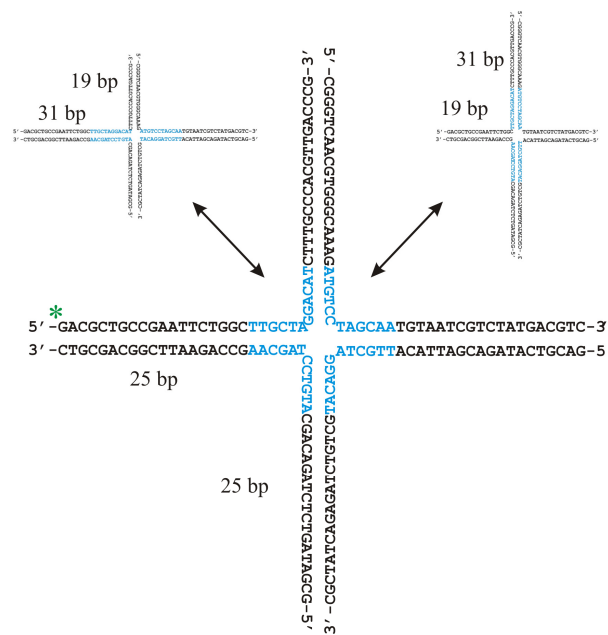


Abbildung 35: Schematische Darstellung der X12-HJ.

Der mobile, wechselseitig komplementäre Bereich ist blau gekennzeichnet. Die Grenzstrukturen sind dargestellt. Die Länge der Duplexbereiche sind angegeben, sowie der mit ³²P-markierte Strang mit einem grünen * gekennzeichnet.

Wie Abbildung 36 zeigt, ist das Hauptprodukt von AtRECQ2 Splayed Arm. Es entsteht keine 3-Wege-Struktur und wenig Einzelstrang DNA. Der Umsatz ist abhängig von ATP und der eingesetzten Enzymkonzentration. AtRECQ2-K117M kann die HJ nicht umsetzen.

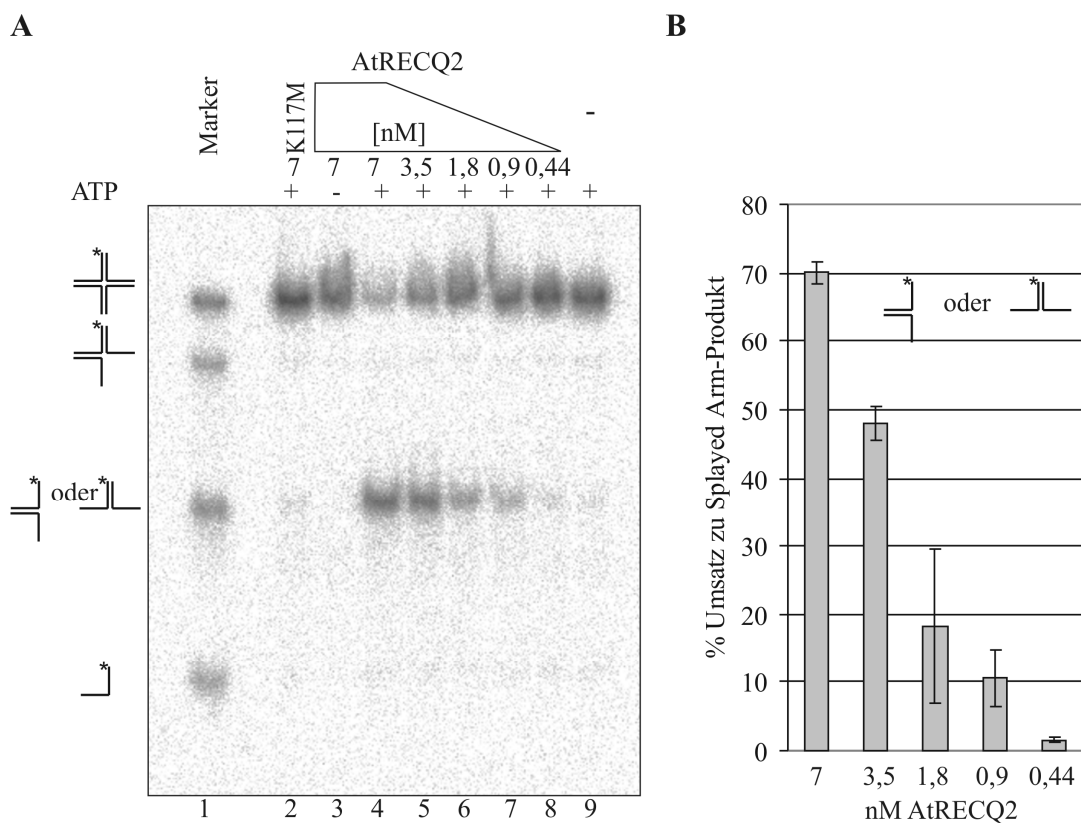


Abbildung 36: Umsatz der X12-HJ durch AtRECQ2 in Abhängigkeit der Enzymkonzentration.

Die angegebenen AtRECQ2-Konzentrationen, bzw. AtRECQ2-K117M für Spur 2 und kein Enzym für Spur 9, wurden für 1 h mit der X12-HJ inkubiert. Die Positionen möglicher Produkte sind in **A** mit Hilfe des Markers in Spur 1 markiert. Die Produkte wurden mit nativer 10 % TBE-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des Phosphorimagers quantifiziert. **A** zeigt das Autoradiogramm nach Trocknen des Gels und Exposition auf einem Phosphorscreen. Für Spur 3 wurde ohne ATP inkubiert. Für **B** wurden die Daten aus drei Experimenten gemittelt und der Umsatz zu Splayed Arm samt Standardabweichung dargestellt.

Die Ergebnisse der Zeitkinetik mit dem X12-HJ-Substrat (Abbildung 37) zeigen, dass die AtRECQ2-Aktivität im Laufe der Zeit abnimmt. Dennoch nehmen die Produkte über das gesamte getestete Zeitfenster von 90 min zu. Andere Zeitkinetikexperimente mit z.T. weniger Enzym und unterschiedlichen Substratmengen zeigten ebenso Splayed Arm als das Hauptprodukt, und dass nach 1 h Inkubation die Produktmenge nicht deutlich weiter zunimmt.

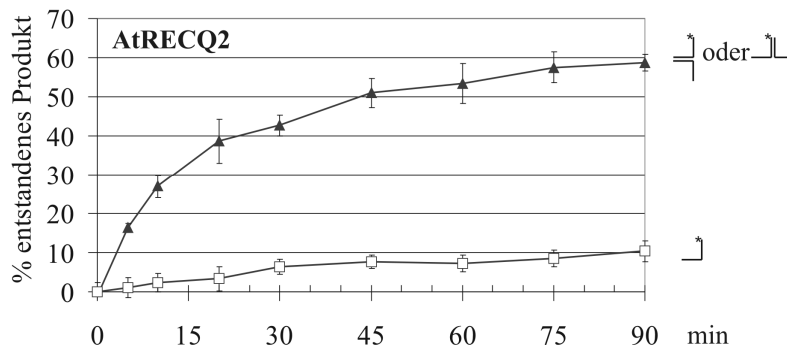


Abbildung 37: Umsatz der X12-HJ durch AtRECQ2 als Funktion der Zeit.

7 nM AtRECQ2 wurde mit der X12-HJ inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde den Reaktionen ein Probenaliquot entnommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Phosphorimagers nach nativer 10 % TBE-PAGE. Der Umsatz zu Splayed Arm oder Einzelstrang-DNA wurde quantifiziert.

Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Experimenten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen.

Auch AtRECQ3 wurde auf den Umsatz der X12-HJ getestet. Allerdings kann AtRECQ3 die X12-HJ nicht umsetzen (Abbildung 38).

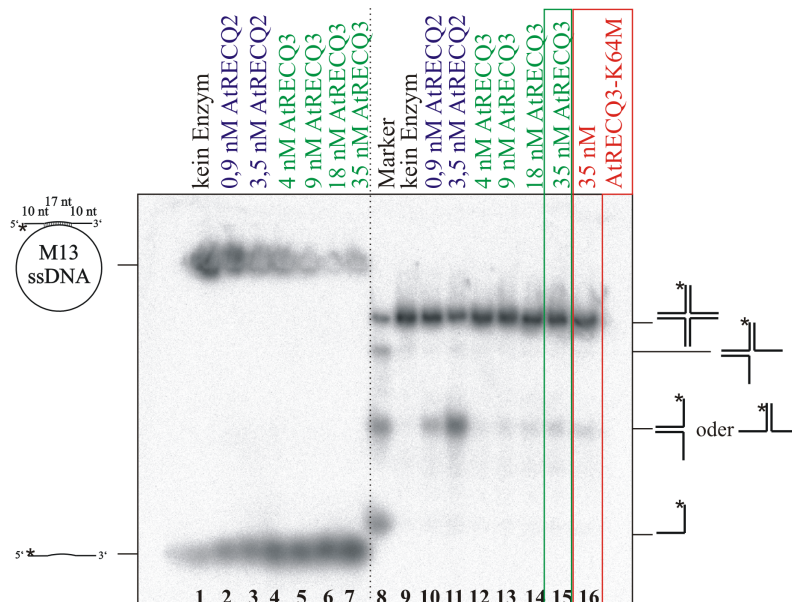


Abbildung 38: Inkubation von AtRECQ3 mit der X12-HJ.

Verschiedene Mengen AtRECQ2, AtRECQ3, AtRECQ3-K64M bzw. kein Enzym (siehe angegebene Konzentrationen) wurden mit 450 pM M13-basiertem Substrat (Spuren 1-7) bzw. 150 pM der X12-HJ (Spuren 9-16) 1 h bei 37 °C inkubiert. Von den M13-Substrat-Reaktionen wurde im Vergleich zu den HJ-Reaktionen ein Drittel des Volumens geladen. Zu sehen ist das Autoradiogramm eines 10 % TBE-PAGE-Gels nach nativer Gelelektrophorese, Trocknen und Exposition auf einem Phosphorscreen. Die DNA-Strukturen sind am Rand schematisch dargestellt.

Zwar entsteht beim Einsatz von einer hohen Enzymkonzentration eine sehr geringe Menge Splayed Arm Produkt, allerdings ist dies auch in der Negativkontrolle AtRECQ3-K64M zu beobachten (siehe Spuren 15 und 16 in Abbildung 38). Die optimalen Mg²⁺ Bedingungen

waren hierfür ähnlich wie bei AtRECQ2. Die grundsätzliche Funktionsfähigkeit von AtRECQ3 wurde durch parallel durchgeführte Reaktionen mit M13-basiertem Substrat (mit 3' und 5' Überhang) gezeigt (Abbildung 38 Spuren 4-7). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass AtRECQ2 die HJ umsetzen konnte (Abbildung 38 Spuren 10 & 11).

4.13. Umsatz einer Modell-Replikationsgabel

Für diese Arbeit wurde eine spezielle, aus Oligonukleotiden aufgebaute, Replikationsgabel verwendet, die eine sogenannte Regression ermöglicht (Abbildung 39).

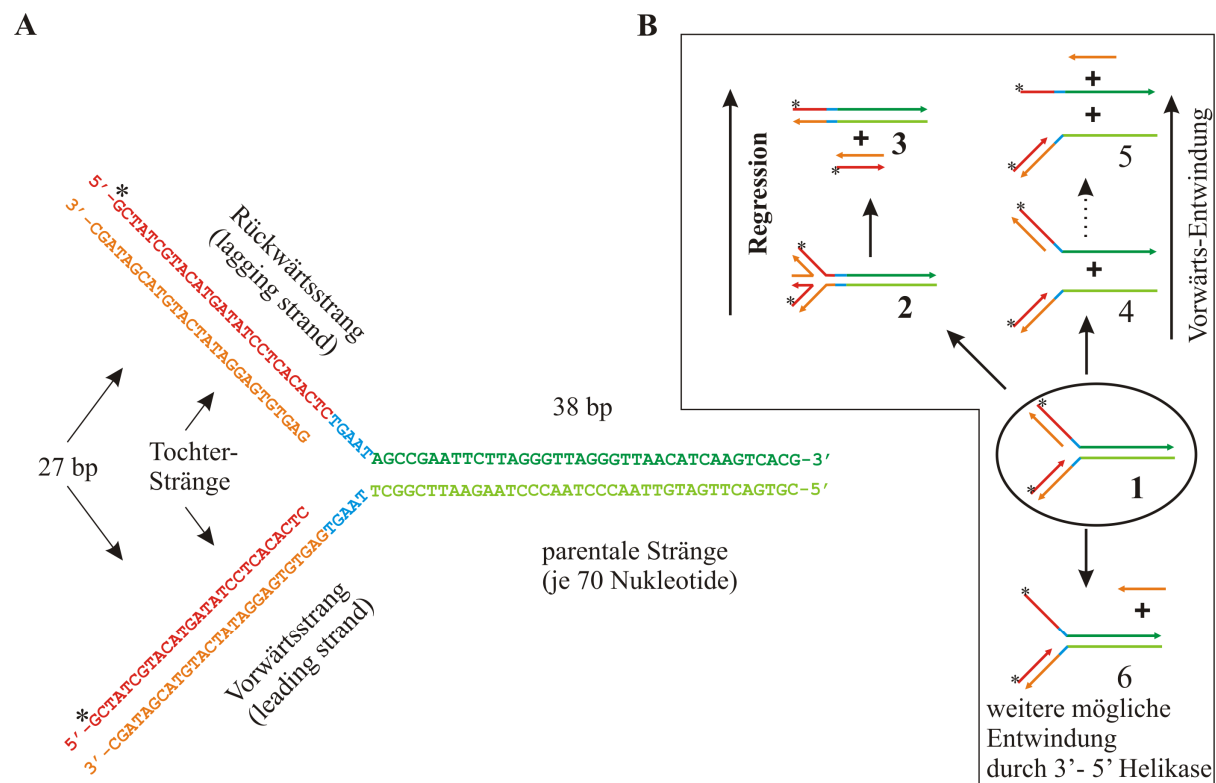


Abbildung 39: Schema der verwendeten Replikationsgabel und mögliche Reaktionen.

A, Der Aufbau der Replikationsgabel ist gezeigt. Komplementäre Bereiche sind in ähnlichen Farben gezeichnet: d.h. die dunkelgrün markierte Sequenz ist komplementär zur Hellgrünen und die Rote zur Orange-farbenen. Dieses Design bedeutet gleichzeitig, dass die langen „parentalen Stränge“ zueinander komplementär sind, bis auf die Heterologie durch die fünf, blau markierten, Nukleotide. Ebenso sind die kurzen „Tochterstränge“ zueinander komplementär. Die Markierungen mit ³²P sind durch ein * symbolisiert.

B, Die in A ausgeführte Replikationsgabel ist in (1) gezeigt. Die Pfeilspitzen markieren die 3'-Enden der Oligonukleotide. Durch die Homologien ist es möglich, dass es zu einer Rückfaltung – Regression – der Replikationsgabel kommt. Die korrespondierende, in (2) gezeigte, Holliday-Junction wird als Chicken-Foot bezeichnet. Der blau markierte Heterologiebereich verhindert, dass dieser Prozess spontan stattfindet. Dieser Schritt muss enzymatisch katalysiert werden. Weiterführende Branch Migration führt zur Entstehung von parentalem Duplex und Tochterduplex (3). Ein weiterer, alternativer Umsatzweg ist dargestellt: die Vorwärtsentwindung. Hierbei entstehen gemischte Duplexe aus einem parentalen Strang und einem Tochterstrang (4), die dann u.U. weiter aufgelöst werden können z.B. in die in (5) gezeigten Produkte durch eine 3'-5'-Helikase. Weiterhin ist es natürlich möglich (6), dass einfach nur ein Tochterstrang-Arm durch die Aktion einer Helikase abgelöst wird und eine 3-armige Struktur übrig bleibt, hier eingezeichnet für eine 3'-5' Helikase.

EcRECQ (nM) - - - - - 0.1
 AtRECQ2 (nM) - 7 7 3.5 1.8 - -

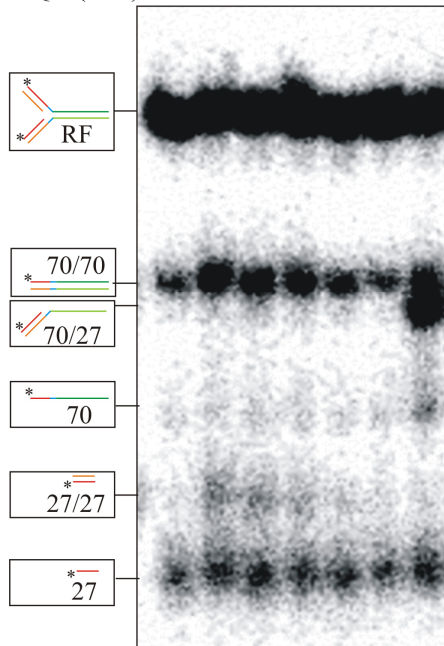


Abbildung 40: Replikationsgabel-Regression durch AtRECQ2.

Verschiedenen AtRECQ2-Konzentrationen und 0,1 nM EcRECQ wurden mit 100 pM der Replikationsgabel 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Replikationsgabel wurde in Abbildung 39 näher erläutert. In der Reaktion war 1,8 mM MgCl₂ und 1,8 mM ATP, was einer freien Mg²⁺-Konzentration von etwa 0,24 mM entspricht. Das Autoradiogramm eines 8 % TBE-Polyacrylamid-Gels nach einer nativen Gelelektrophorese ist gezeigt. Anhand hier nicht gezeigten Markerspuren konnten die verschiedenen Molekülspezies zugeordnet werden (links).

Für die Regression ist das Auftreten von Tochterduplex (27/27) charakteristisch. Selbstverständlich entsteht dabei auch parentaler Duplex (70/70). In Abbildung 40 sind die Reaktionsprodukte von AtRECQ2 und EcRECQ zu sehen. In den beiden Spuren ohne Enzym ist zu erkennen, dass die Replikationsgabel-Präparation nach Inkubation zu geringen Teilen auch andere Strukturen enthält. Es ist dennoch deutlich, dass AtRECQ2 Tochter- und Parentalen Duplex bilden kann, folglich die Replikationsgabel-Regression katalysiert. Es entstehen wenig andere Produkte. Je mehr Enzym eingesetzt wurde, desto mehr Replikationsgabel-Regression konnte beobachtet werden.

EcRECQ hingegen produziert vor allem gemischte Duplexe aus einem parentalen Strang und einem Tochterstrang (70/27), charakteristisch für die Vorwärtsentwindung der Replikationsgabel. Auch weitergehende Produkte wie Einzelstränge wurden von EcRECQ gebildet (siehe auch Abbildung 39 B).

Auch der Umsatz dieser Replikationsgabel durch AtRECQ3 wurde untersucht, war zunächst jedoch am Rande der Nachweisgrenze. Da der Einfluss der freien Magnesium-Ionen-Konzentration auf den Absolutumsatz bereits für andere Substrate gezeigt wurde (Kapitel 4.9), wurde dieser auch hier analysiert. Dies geschah vergleichend mit AtRECQ2 und AtRECQ3, wobei für AtRECQ3 zwei verschiedenen AtRECQ3-Chargen und zusätzlich die Negativkontrolle AtRECQ3-K64M getestet wurden (Abbildung 41 A und B).

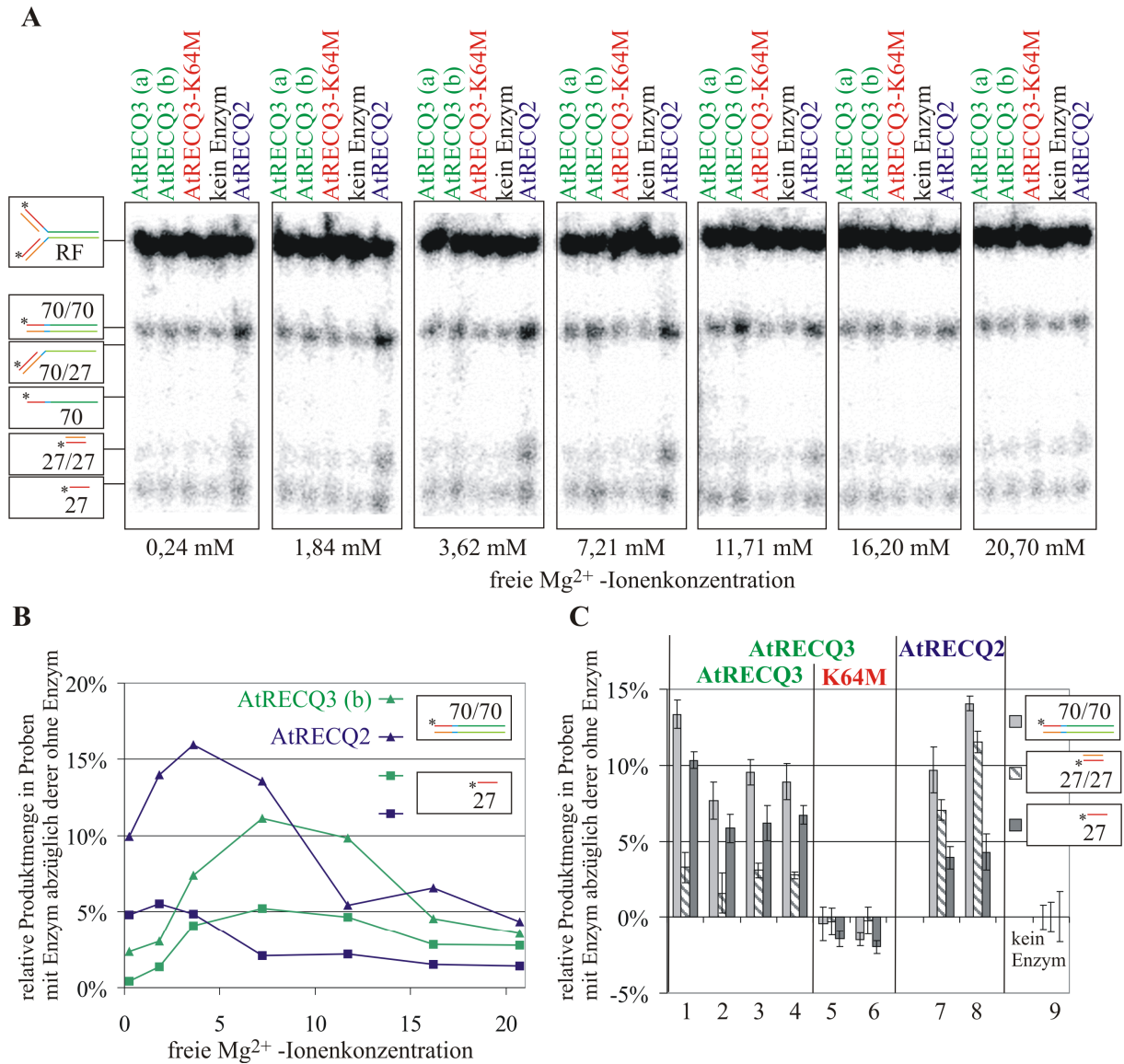


Abbildung 41: Vergleich des Umsatzes der Replikationsgabel durch AtRECQ2 und AtRECQ3.

A, Einfluss der freien Mg²⁺-Konzentration auf den Umsatz der Modell-Replikationsgabel. Gezeigt ist eine Zusammenstellung von Autoradiogramm-Ausschnitten eines Experiments: Zwei AtRECQ3 Chargen (a und b) (22 bzw. 35 nM), AtRECQ3-K64M (35 nM) und AtRECQ2 (7 nM) wurden bei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen mit 100 pM Replikationsgabel 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden per 8 % nativer TBE-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde zum Vergleich Inkubationsreaktionen ohne Enzym zwischen die beiden Enzyme geladen. Die Migrationshöhen möglichen Molekülspezies sind links eingezeichnet.

B, Die rechts dargestellten Produkte „Parentaler Duplex (70/70)“ (Dreieck) und „Einzelstrang (27)“ (Quadrat) aus dem in **A** dargestellten Experiment wurden für AtRECQ2 (lila) und eine AtRECQ3-Charge (b) (grün) quantifiziert und in Abhängigkeit der freien Mg²⁺-Konzentration dargestellt.

C, Das Experiment wurde mit 9 mM MgCl₂ und 1,8 mM ATP (freie Mg²⁺-Konzentration 7,21 mM) mit verschiedenen AtRECQ3- (Säulengruppen 1-4), AtRECQ3-K64M- (Säulengruppen 5 & 6) und AtRECQ2- (Säulengruppen 7 & 8) Chargen wiederholt. Jede Reaktion wurde dreimal durchgeführt, Inkubationen ohne Enzym (Säulengruppe 9) sechsmal. Der relative Produktanteil von Parentalem Duplex, Tochterduplex und 27-er-Einzelstrang (siehe Legende) wurde bestimmt. Der Mittelwert aus der 6-fach-Bestimmung ohne Enzym wurde abgezogen. Standardabweichungen sind eingezeichnet. Säulengruppe 1: 44 nM AtRECQ3 (b); 2: 70 nM AtRECQ3 (a); 3: 30 nM AtRECQ3 (aufgereinigt über Kombination aus Ni-IMAC und CAC (c)); 4: 25 nM AtRECQ3 (Enzymool aufgereinigt über Kombination aus Ni-IMAC und CAC (d)); 5: 35 nM AtRECQ3-K64M; 6: 20 nM AtRECQ3-K64M (aufgereinigt über Kombination aus Ni-IMAC und CAC); 7: nM AtRECQ2 (a); 8: nM AtRECQ2 (b); 9: kein Enzym.

AtRECQ2 und AtRECQ3 besitzen unterschiedliche Mg²⁺-Konzentrations-Optima für den Umsatz der Replikationsgabel und katalysieren die Entstehung unterschiedlicher Produkte.

Wie bereits gezeigt, ist deutlich, dass AtRECQ2 die Entstehung von Tochterduplex katalysiert. Ebenso entsteht parentaler Duplex. Auch für AtRECQ3 entsteht parentaler Duplex. Daneben entsteht allerdings hauptsächlich Tocher-Einzelstrang, der durch AtRECQ2 nur teilweise entsteht. Die optimale freie Mg^{2+} -Konzentration für die Entstehung von sowohl parentalem Duplex als auch Einzelstrang ist für AtRECQ2 ca. 4 mM. Auch für AtRECQ3 fällt die optimale freie Mg^{2+} -Konzentration für die Entstehung dieser beiden Produkte in etwa zusammen, liegt allerdings bei ca. 10 mM.

Neben der Tatsache, dass die Enzyme für dieses Substrat unterschiedliche Optima der freien Magnesiumionen-Konzentration aufzeigen, ist vor allem auch die unterschiedliche Produktbildung von höchstem Interesse. Daher sollte dieses Verhalten mit unterschiedlichen Enzymchargen bestätigt werden (Abbildung 41 C). Da die Mengen von gemischtem Duplex und parentalem Einzelstrang sehr gering waren, wurden nur die dargestellten Produkte quantifiziert. Anhand der Schwankungen in den Reaktionen ohne Enzym ist zu erkennen, dass die AtRECQ3-K64M-Negativkontrollen die notwendige Reinheit der verwendeten AtRECQ3-Chargen bestätigen. Alle getesteten AtRECQ3-Chargen, auch solche, die sowohl über Ni-IMAC als auch über CAC aufgereinigt wurden, verhalten sich gleich. Neben parentalem Duplex entsteht etwa zur gleichen Menge 27-er-Einzelstrang. Hier wird deutlich, dass auch Tochterduplex entsteht, allerdings nicht als ein Hauptprodukt.

Die zweite getestete AtRECQ2-Charge bestätigt ebenso das AtRECQ2-typische Verhalten: die Entstehung von vor allem parentalem Duplex und Tochterduplex, und nur zu einem geringeren Teil 27-er-Einzelstrang.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich AtRECQ2 und AtRECQ3 im Umsatz dieses Substrats fundamental unterschiedlich verhalten.

5. Diskussion

RecQ-Helikasen leisten einen wichtigen Beitrag zur genomischen Stabilität (siehe Kapitel 1.3). Dabei ist auffällig, dass in einfachen Organismen meist weniger RecQ-Homologe zu finden sind, als in höher entwickelten Lebewesen. Um die funktionelle Evolution der RecQ-Helikasen zu verstehen, müssen die jeweiligen Funktionen in verschiedenen Organismen definiert werden (siehe auch Kapitel 1.4). Obwohl bereits eine Vielzahl von Daten über die RecQ-Helikasen vom Menschen, dem Frosch, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Fruchtfliege, von Hefen und von *E. coli* gewonnen wurden, sind damit noch nicht alle Reiche des Lebens abgedeckt.

Vor kurzem wurden die ersten biochemischen Daten für eine RecQ-ähnliche Helikase der Archea veröffentlicht (Homologie zum N-Terminus HsRECQ5 β) (De Felice *et al.*, 2007). Das Hel112 Protein aus *Sulfolobus solfataricus* besitzt keine RecQ-Ct- und HRDC-Domänen, entwindet gegabelte DNA-Strukturen und solche mit 3' Überhang und besitzt eine DNA Strand-Annealing-Aktivität.

Aus dem Reich der Pflanzen sind am meisten Informationen über die RecQ-Helikasen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bekannt: In dieser Pflanze konnten sieben RecQ-Homologe identifiziert werden, die zunächst geordnet nach ihrer Größe durchnummeriert wurden (siehe Abbildung 3). Anhand von Sequenzhomologien lassen sich die AtRECQ-Helikasen und die HsRECQ-Helikasen einander nicht zuordnen. Daher ist es eine extrem interessante Fragestellung ob trotzdem funktionelle Homologe identifiziert werden können.

Wie bereits in Kapitel 1.5.3 ausgeführt, kann man, anhand von genetischen Daten und nachgewiesenen Interaktionen, eine funktionelle Homologie für AtRECQ4A und HsBLM (Hartung *et al.*, 2006; Hartung *et al.*, 2007) sowie für den Komplex aus AtRECQ2 und AtWRNexo mit HsWRN vorschlagen.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal pflanzliche RecQ-Helikasen biochemisch analysiert, nämlich AtRECQ2 und AtRECQ3. Dies diene vor allem der besseren Zuordnung von biologischen Funktionen, gerade da keine genetischen Daten für diese Helikasen veröffentlicht sind. Verhalten sie sich, wie bereits beschriebene RecQ-Helikasen? Verstärken sich die Indizien für eine funktionelle Homologie von AtRECQ2 und HsWRN? Kann man einen Einfluss der Domänenorganisation (AtRECQ2 vs. AtRECQ3) auf die biochemische Aktivität erkennen?

Zusätzlich zu den dargestellten Aspekten, ist die Grundlagenforschung an pflanzlichen RecQ-Helikasen für die grüne Gentechnologie von entscheidender Bedeutung (siehe Kapitel 1.5.1).

5.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung von AtRECQ2 und AtRECQ3

In dieser Arbeit konnten zwei AtRECQ-Helikasen in *E. coli* exprimiert, und deren Helikase-Aktivität nachgewiesen werden. Dies spricht für eine funktionelle Faltung der beiden Proteine. Jedoch ist dies bei einer heterologen Überexpression von eukaryotischen Proteinen in Prokaryoten nicht unbedingt zu erwarten. Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit parallel die Expression in einem eukaryotischen Expressionssystem, der Insektenzelllinie Sf9, etabliert. Da es deutlich einfacher ist, mit optimierten *E. coli* Expressionsstämmen zu arbeiten, fiel die endgültige Wahl auf dieses System.

5.1.1. Optimierung der Expression

Tatsächlich war ein Großteil der Ziel-Proteine in *E. coli* falsch gefaltet, was sich dadurch äußerte, dass der Hauptteil des AtRECQ-Proteins in sogenannten „Inclusion Bodies“ vorlag. In der Regel haben lösliche Proteine ein hydrophiles Äußeres und hydrophobe Teile kommen im Proteininneren vor, so dass die Proteine gut im wässrigen Milieu der Zellen gelöst sind. Bei einer Fehlfaltung kommt es oft dazu, dass hydrophobe Bereiche außen zu liegen kommen, was der Löslichkeit abträglich ist. Stattdessen interagieren diese Bereiche z.B. mit den hydrophoben Bereichen anderer fehlgefalteter Proteine, so dass große Agglomerate entstehen, die „Inclusion Bodies“.

Auch in *E. coli* hat man aber Möglichkeiten, den Anteil fehlgefalteter Proteine zu reduzieren. Vielen ist gemein, dass versucht wird die Expression zu verlangsamen. So wurde auch in dieser Arbeit der **Einfluss der Induktorkonzentration** getestet. Die Rationale hierfür folgt:

In dieser Arbeit wurde zur Expression das T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem verwendet. Das bedeutet, dass der Expressionsstamm ein Gen für die T7-RNA-Polymerase trägt und das Zielgen auf dem Plasmid unter Kontrolle des T7-Promotors ist. Damit die Expression reguliert werden kann, muss die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert werden. Dies ist durch einen Lac-Operator im Promotorbereich des T7-RNA-Polymerasegens und einer konstitutiven LacI-Repressor Expression in diesen Expressionsstämmen (DE3-Stämme) gegeben. Die Repression kann von außen durch Zugabe des Allolaktose-Analogons IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) aufgehoben werden. (Das verwendete Plasmid hatte zur besseren Regulation ebenfalls ein LacI-Gen und AtRECQ stand unter Kontrolle eines kombinierten T7/LacO Promotors.)

Die Standardinduktormenge für die Stämme BL21(DE3) und BL21Codon Plus(DE3)RIPL ist 1 mM IPTG. In dieser Arbeit wurde versucht durch die Verwendung von 0,2 mM IPTG eine

höhere Ausbeute an löslichem, korrekt gefaltetem Protein zu erreichen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Bei speziell hierfür vorgesehenen Expressionsstämmen hätte diese IPTG-Reduktion unter Umständen mehr Erfolg gezeigt. Dennoch ergab sich durch die Reduktion als Pluspunkt eine Kostenersparnis.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer Verlangsamung der Expression führt, ist eine **Absenkung der Temperatur** unter das Wachstumsoptimum von *E. coli*. Dieser Eingriff führte auch in dieser Arbeit zum Erfolg. AtRECQ3 wurde bei 28 °C exprimiert, AtRECQ2 bei 21 °C (siehe Kapitel 4.2). Gerade bei einer Erniedrigung der Expressionstemperatur kann die Expressionszeit eine Rolle spielen, so dass auch diese analysiert und optimiert wurde (siehe Kapitel 4.2). In der Regel wird eine niedrigere Temperatur durch eine längere Wachstumsdauer kompensiert.

Speziell bei der Expression von AtRECQ3 (Experiment für AtRECQ2 nicht durchgeführt) konnte gezeigt werden, dass der gesamte Stoffwechsel von *E. coli* nach der Induktion auf die Produktion von AtRECQ3 ausgelegt wurde, so dass diese Zellen nicht mehr teilungsfähig waren. Ein ausreichender Teil dieses Zielproteins befand sich in der löslichen Fraktion.

Da die Ausbeute an löslichem Protein bei AtRECQ2 schlechter war, wurde weitergehend getestet, ob durch osmotischen Stress (durch den Einsatz von Sorbitol (und zusätzlich Betain) im Medium) wie bei Blackwell und Horgan, 1991 eine Erhöhung des Anteils an löslichem Zielprotein erzielt werden kann. **Kompatible Solute** (Osmolyte) in der *E. coli* Zelle wirken oft als chemische Chaperone (Oganessian *et al.*, 2007). Jedoch führte dies bei AtRECQ2 nicht zu einem höheren Anteil an richtig gefaltetem Protein. Eine weitere Möglichkeit die Faltung zu unterstützen, wäre die Verwendung von *E. coli* Stämme gewesen, in denen zusätzlich Chaperon-Proteine exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde dies nicht getestet sondern die doppelte Menge von AtRECQ2 für die Proteinaufreinigung verwendet, als von AtRECQ3.

In dieser Arbeit konnte bei der Expression eine interessante Feststellung gemacht werden, die sich auch bei den meisten anderen Protein-Expressionen in unserem Labor bewahrheitet: Entgegen der „Lehrbuchmeinung“ kann auf die **Antibiotika** (speziell Ampicillin oder Carbenicillin) in der Expressionskultur verzichtet werden, zumindest, falls mit einem Zehntel des Kulturvolumens angeimpft wird. Bei vielen Expressionen kommt zu der damit verbundenen reinen Kosten- und Aufwandsersparnis hinzu, dass die Expression sogar effizienter funktioniert, da die Zellen nicht von außen geschwächt werden. Dieses Ergebnis scheint im Verhältnis von Vorkultur zu Hauptkultur begründet zu sein. Die Hauptkultur wird mit einer Vielzahl von Zellen angeimpft, die mit Hilfe von Antibiotika (in der Vorkultur) selektiert wurden. Bei einer relativ kurzen Expressionszeit wirkt sich der Verlust des Plasmids

in einigen Zellen kaum auf das Gesamtergebnis aus. Hinzu kommt, dass die β -Lactam-Antibiotika im Medium sowieso relativ schnell abgebaut werden, v.a. bei „Zugabe“ (durch das Überimpfen) eines Großteils des Vorkultur-Mediums (mit β -Lactamase).

Es ist bekannt, dass Organismen sich in ihrer sogenannten „**Codon usage**“ unterscheiden. Der degenerierte genetische Code bringt mit sich, dass für einige Aminosäuren verschiedene Codons „zur Auswahl“ stehen. Unterschiedliche Organismen haben definierte Vorlieben für bestimmte Codons, was in der Regel mit der Häufigkeit der jeweiligen tRNAs korreliert. Bei einer heterologen Expression kann es daher zu Engpässen spezifischer (mit Aminosäuren) beladener tRNAs kommen. Um dies zu vermeiden, kann man entweder bei der Klonierung gezielt optimierte Codons einbauen, was allerdings mit einem großen Aufwand verbunden ist, oder man sorgt dafür, dass die notwendigen tRNAs im Endorganismus *E. coli* in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Dies wird durch Plasmide mit den entsprechenden tRNA-Genen erreicht. Der Expressionsstamm BL(21)-CodonPlus(DE3) RIPL hat z.B. zusätzliche Gene für die in *E. coli* sonst seltenen tRNAs ArgU, ProL, IleY und LeuW auf zwei weiteren Plasmiden. Dieser Stamm wurde nach einer Analyse der Codon-Usage für AtRECQ2 verwendet. Für AtRECQ3 wurden verschiedene Stämme getestet, dabei wurde kein Unterschied gesehen, und dann der gleiche Stamm verwendet, wie für AtRECQ2.

5.1.2. Tags, Aufreinigung & Bedeutung von Konstrukten mit eingeführten Mutationen im Walker A Motiv

Nachdem Bedingungen gefunden wurden, die eine ausreichende Menge an löslichem RecQ-Protein gewährleisten, konnte die Aufreinigung optimiert werden. In dieser Arbeit wurden hierzu das Calmodulinbindepeptid (CBP-Tag) und der HIS-Tag verwendet. Beide erlauben eine Affinitätschromatographie, die in der Regel selektiver ist als z.B. eine Ionenaustauschchromatographie oder eine Gelfiltration.

Bevor kurz auf die beiden Tags eingegangen wird, soll noch dargestellt werden, dass Expression und Aufreinigung nicht voneinander getrennt betrachtet werden können. Zum einen ist in der Literatur bekannt, dass die Tags einen Einfluss auf die Löslichkeit und auch die Faltung der jeweiligen Proteine haben können. Zum anderen ist es evident, dass bei einer schwachen Expression mehr Kulturvolumen benötigt wird und außerdem das Verhältnis von Zielprotein zu Kontaminationen niedriger ist, als bei einer hohen Expression. Hinzu kommt, dass bei einem verstärkten proteolytischen Abbau oder einem gehäuften Vorkommen von Translationsabbrüchen, der Aufwand auf der Reinigungsseite verhältnismäßig groß wird, vor allem, falls das Zielprotein dazu neigt, Multimere auszubilden.

Bei der **Calmodulin-Affinitätschromatographie (CAC)**, zum ersten Mal von Stofko-Hahn *et al.* (1992) durchgeführt, interagiert immobilisiertes Calmodulin in der Gegenwart von Ca^{2+} (was für eine „korrekte“ Faltung der EF-Hand-Motive des Calmodulins nötig ist) mit dem CBP-Tag, dessen Sequenz vom C-Terminus der Skelettmuskel-Myosin-leichte-Kette-Kinase abgeleitet ist. Die Elution erfolgt sanft durch den Entzug von Ca^{2+} -Ionen durch den Einsatz des Chelators EGTA.

Bei der **IMAC (Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie)** bilden zweiwertige Metallionen (wie in dieser Arbeit Ni^{2+}) und ein Chelator (wie in dieser Arbeit Imino-di-Essigsäure (IDA)) ein Halbchelat mit freien Koordinationsstellen (bei IDA: drei; bei NTA (Nitrilo-tri-Essigsäure), einem anderen Chelator: zwei). IDA ist in dieser Arbeit kovalent über einen Polyethylenglycol-Spacer an das Säulenmaterial Sepharose gebunden. Der HIS-Tag (in dieser Arbeit aus sechs Histidinen) hat (in seinem nicht protonierten Zustand) eine Affinität zu Ni^{2+} und kann die übrigen drei Koordinationsstellen des Ni^{2+} absättigen. Eine Elution kann prinzipiell durch Zugabe eines Chelators wie EDTA, einen pH-Shift ins Saure (Protonierung der Histidine), oder kompetitiv durch Imidazol, erfolgen. Letzteres, was auch in dieser Arbeit angewendet wurde, führt zu einer relativ sanften Elution, ohne Schwermetallionen in der Elutionsfraktion.

Diese beiden Tags sind verhältnismäßig klein, so dass zu erwarten war, dass die Faltung des Zielproteins nicht beeinflusst wird. Der CBP-Tag war N-terminal, der HIS-Tag C-terminal lokalisiert. Durch eine Kombination der beiden Aufreinigungen (Tandem-Affinity-Purification) war zu erwarten, dass das Zielprotein zur Homogenität aufgereinigt werden kann, und dass außerdem der Anteil an vollständigem Protein (N- und C-Termini erhalten) sehr groß ist.

Zusätzlich zu diesen beiden Tags, war in den Konstrukten noch ein **Flag-Tag**. Dieser Flag-Tag, aber auch der HIS-Tag konnten in dieser Arbeit erfolgreich für immunologische Detektionen verwendet werden.

Für den Fall einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität der Zielproteine durch die Tags waren in den Konstrukten auch **Proteaseschnittstellen** vorhanden, durch die die Tags hätten abgetrennt werden können. Dies war jedoch nicht notwendig, so dass darauf verzichtet wurde.

Es gibt verschiedene Methoden, die Reinheit einer Proteinaufreinigung zu bewerten. In der Regel erfolgt die Bewertung über sensitiv (zum Beispiel Silber-) gefärbte SDS-PAGE Gele nach Möglichkeit verbunden mit einer „Überladung“ der entsprechenden Spur. Diese Analyse führt zu einer Aussage über die Homogenität einer Aufreinigungsprobe.

Gerade aber bei enzymatischen Charakterisierungen ist es wichtig, keine anderen Proteine mitzureinigen, die ihrerseits einen Einfluss auf das Substrat haben könnten.

Es gibt mehrere **Ursachen für die Aufreinigung von zusätzlichen Proteinen**. Erstens ist die **Selektivität** des angewandten Aufreinigungsschritts zu betrachten. So erwartet man z.B. von einer Ionenaustauschchromatographie in der Regel eher eine Fraktionierung der Ausgangsproteine als eine selektive Aufreinigung. Gerade auch bei der Ni-IMAC können auch Proteine mit Histidinen an ihrer Oberfläche (ohne expliziten HIS-Tag) an das Ni^{2+} binden. Da diese Bindung weniger stark ist, als die Bindung des HIS-Tags an Ni^{2+} , reicht hier eine geringere Konzentration an Imidazol, um diese Kontaminationen aus der Säule zu waschen.

Neben der Interaktion mit dem eigentlichen Affinitätsmaterial, kann es aber zweitens auch Interaktionen von Proteinen, die man eigentlich nicht aufreinigen will, mit der **Säulenmatrix**, z.B. der Sepharose, geben. Abhängig von der Art der Wechselwirkung kann man versuchen, diese zum Beispiel durch Hochsalzbedingungen oder Detergenzien zu brechen.

Proteine aus dem Wirtsorganismus, die aufgrund einer der beiden letzten Punkte im Eluat zu finden sind, kann man identifizieren, indem man eine Expression mit dem Vektor ohne Ziel-ORF durchführt und diesen Rohextrakt aufreinigt. Diese, oft als „Mock“ bezeichnete, Kontrolle ist allerdings nicht ausreichend.

Neben der Interaktion mit dem Affinitäts- oder dem Säulenmaterial, könnten Wirtsproteine direkt oder indirekt mit dem Zielprotein wechselwirken und auf diese Weise mitaufgereinigt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer **direkten Interaktion** ist dabei vermutlich von der Art des Proteins abhängig. Bei einem hoch konservierten System ist es denkbar, dass auch homologe Interaktionspartner im Wirtsorganismus vorhanden sind, und sich die Interaktionsbereiche der homologen Proteine ausreichend ähneln. Zusätzlich ist es möglich, über direkte Interaktion unvollständige Stücke des Zielproteins aufzureinigen, falls Multimerisierungsdomänen/bereiche vorhanden sind.

Gerade aber bei Enzymen, die im DNA-Metabolismus beteiligt sind, ist auch eine **indirekte Interaktion** denkbar. Wenn z.B. die RecQ-Helikasen einerseits über ihren Tag an die Affinitätsmatrix binden, andererseits aber DNA gebunden haben, ist es sehr gut möglich, dass an diese DNA andere Proteine binden, die so mitaufgereinigt werden. Diese Proteine sind unter Umständen nur in Spuren im endgültigen Eluat, könnten aber enzymatische Eigenschaften besitzen, wie z.B. Nuklease- oder Helikase-Aktivitäten.

Um sowohl über die erste Klasse als auch die zweite Klasse der Proteinkontaminationen eine **Kontrolle** zu haben, wurde im Walker A Motiv der AtRECQ-Helikasen auf genetischer Ebene ein Aminosäureaustausch des konservierten Lysins zu Methionin bewirkt, **AtRECQ2-K117M** bzw. **AtRECQ3-K64M**. Dies erfolgte über Overlap-Extension PCR (siehe Abbildung 12). Das Walker A Motiv ist an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt. Es konnte für HsWRN gezeigt werden, dass diese Lysin zu Methionin Substitution (hier K577M) die ATPase- und daraus folgend die Helikaseaktivität von HsWRN inaktiviert (Brosh *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde die Annahme getroffen, ebenso wie für HsWRN und HsWRN-K577M durch Brosh *et al.*, 1999, dass AtRECQ2 und AtRECQ2-K117M (bzw. ebenso AtRECQ3 und AtRECQ3-K64M) sich bei der Aufreinigung gleich verhalten, d.h. die gleichen *E. coli* Proteine mitaufgereinigt werden.

Dadurch war eine **Optimierung der Aufreinigung** möglich: Endproteinproben aus Aufreinigungen mit AtRECQ2-K117M (bzw. AtRECQ3-K64M) dürfen keine Aktivität zeigen, identisch durchgeführte Aufreinigungen mit AtRECQ2 (bzw. AtRECQ3) müssen jedoch Aktivität zeigen. In genau diesem Fall wurde das Protein funktionell aber ohne störende Kontaminationen aufgereinigt.

In dieser Arbeit wurde die Reinheit der Ziel-Proteine nicht nur im Hinblick auf enzymatische Kontaminationen, sondern auch auf Kontaminationen ohne direkten enzymatischen Einfluss optimiert.

Zu Beginn der Arbeit wurde das Konstrukt pCAL-n-FLAG-AtRECQ3 verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die Aufreinigung alleinig über den CBP-Tag nicht ausreichte, um die Proteine ausreichend von Kontaminationen zu befreien.

Durch Mock-Kontrollen wurde klar, dass die mitaufgereinigten kontaminierenden Proteine auf direkte oder indirekte Interaktionen mit AtRECQ3 zurückzuführen sind (Abbildung 16). Um indirekte Interaktionen über DNA zu minimieren, wurde versucht, vorhandene DNA durch die Nuklease „Benzonase“ zu verdauen. Dies führte jedoch zu keinem Erfolg, so dass dieser Schritt im Weiteren nicht durchgeführt wurde. Zwei Aufreinigungsschritte waren jedoch erfolgreich (siehe Kapitel 4.3.1.1): Erstens die Unterdrückung hydrophober Wechselwirkungen durch einen Waschschriff mit dem Detergenz Triton-X-100, und zweitens der Entzug von zweiwertigen Ionen durch EGTA. Wohingegen für die Elution von AtRECQ3 eine Kombination von EGTA und NaCl notwendig war, wurde ein ca. 50 kDa (und ca. 37 kDa) großes Protein bereits nur durch den Entzug von zweiwertigen Ionen (durch EGTA) eluiert. Es wurden keine genaueren Untersuchungen vorgenommen, um schließen zu können,

ob es sich dabei tatsächlich um eine direkte, z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+} -abhängige, Interaktion mit AtRECQ3 handelte oder um eine Indirekte, z.B. über DNA, und durch den Entzug von z.B. Mg^{2+} die Bindung des Enzyms an die DNA gelöst wurde.

Da, wie bereits erwähnt, die CAC zwar optimiert werden konnte, aber die erzielte Reinheit nicht ausreichte, wurden weitere Konstrukte kloniert, so dass die Zielproteine neben dem N-terminalen CBP-Tag einen C-terminalen HIS-Tag besitzen. Während dies bei AtRECQ3 durch den Austausch eines Restriktionsfragments möglich war, wurde für die anderen Konstrukte ein neuer Vektor entworfen und kloniert (pCAL-n-FLAG-c-HIS, siehe Abbildung 13), bei dem die ORFs über ein restriktionsunabhängiges (schnelles und effizientes) Verfahren (LIC; Abbildung 13) eingefügt werden.

Die nun mögliche Aufreinigung über Ni-IMAC und die Kombination von Ni-IMAC und CAC wurden in dieser Arbeit optimiert (siehe Kapitel 4.3.1.2 und 4.3.2). Durch Mock-Kontrollen war erkennbar, dass bei der Ni-IMAC mehr Proteine an das Säulenmaterial und den Affinitätsliganden binden, als an das Calmodulin-Säulenmaterial. Zusätzlich gab es Proteinkontaminationen, die direkt oder indirekt über die AtRECQs aufgereinigt wurden. Aber durch Waschschrte konnten diese Proteine weitestgehend abgetrennt werden. Nach der Optimierung wurde die Ni-IMAC mit Tris-Puffer, einem Waschschrte mit Triton-X-100 und einer Elution in 2 Stufen (einer Waschstufe (*E. coli* Proteine) und einer eigentlichen Elutionsstufe (AtRECQ)) durchgeführt. Für die Waschstufe wurde die jeweilig optimale Imidazolkonzentration bestimmt, bei der möglichst viele kontaminierende Proteine aber möglichst wenig AtRECQ von der Säule gewaschen wurde. Für AtRECQ3 war diese Aufreinigung effizient genug um alle störenden *E. coli* Enzyme abzureinigen, was, wie beschrieben, durch einen Vergleich der Aktivitäten von AtRECQ3 und AtRECQ3-K64M geschlossen werden konnte.

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass der Nachweis von *E. coli* Nukleasen in den Proteinfractionen vor allem in Abwesenheit von ATP möglich ist. Ist ATP in der Reaktion, ist das Ausmaß der Nuklease-Aktivität deutlich geringer. Dies ist vermutlich auf die chelatierende Wirkung von ATP zurückzuführen. Wie auch in Abbildung 29 erkennbar, sind bei einer Ursprungs Mg^{2+} -Konzentration von 1,8 mM bei Verwendung von 1,8 mM ATP kaum freie Magnesiumionen in der Lösung, die wiederum jedoch von den meisten Enzymen im DNA-Stoffwechsel, wie eben Nukleasen, benötigt werden. Die hier beobachtete Inhibierung von Nukleasen durch ATP hat Rosenberg (Rosenberg, 1987) bei der Isolierung von Nucleoproteinkomplexen genutzt.

Für die Aufreinigung von AtRECQ2 war die Ni-IMAC alleine nicht ausreichend (siehe Abbildung 19). Jedoch konnten nach einer Kombination von optimierten Ni-IMAC und CAC-Schritten keine Aktivitäten mit der AtRECQ2-K117M-Negativkontrolle gemessen werden (aber mit AtRECQ2).

Für die biochemischen Analysen der AtRECQ-Proteine wurden die Tags nicht abgetrennt, was auch für andere RecQ-Homologe, z.B. HsBLM, HsWRN und DmRECQ5 so veröffentlicht wurde (Karow *et al.*, 1997; Orren *et al.*, 1999; Özsoy *et al.*, 2001).

5.2. Klonierung, Expression und Aufreinigung von EcRECQ

In dieser Arbeit wurde aus zwei Gründen EcRECQ kloniert, exprimiert und aufgereinigt.

Zum einen war zu Beginn dieser Arbeit das Helikase-Assay-System nicht etabliert. Da AtRECQ2 und AtRECQ3 erst in dieser Arbeit biochemisch charakterisiert wurden, war anfangs nicht klar, welche Funktionen sie besitzen, und ob sie in der Lage sind, bestimmte Substrate umzusetzen oder nicht. Wohl aber waren einige Eigenschaften von EcRECQ publiziert. Daher wurde EcRECQ aufgereinigt (über in dieser Arbeit nicht dargestellte Standard Ni-IMAC mit Phosphatpuffer) und mit diesem EcRECQ, als Modellprotein, ein Strand-Displacement-Assay-System (siehe Abbildung 14) etabliert.

Zum anderen konnte der EcRECQ-katalysierte Umsatz an anderen Substraten analysiert werden (für diesen Zweck wurde EcRECQ ähnlich aufgereinigt wurde wie die AtRECQs, siehe Kapitel 3.2.3.2). Zum Teil gibt es hierzu schon veröffentlichte Daten, zum Teil fehlen aber auch viele Experimente in der Literatur, da die exakt gleichen Experimente in der Regel maximal mit einigen wenigen RecQ-Helikasen durchgeführt wurden (siehe unten).

Der ORF von EcRECQ wurde über nested PCR aus genomischer DH5 α DNA isoliert und mit HIS-Tag in einen Überexpressionsvektor eingebracht. Dabei wurden zunächst zwei Konstrukte hergestellt, EcRECQ mit N-terminalem HIS-Tag (in den vorangegangenen Kapiteln nicht dargestellt) und EcRECQ mit C-terminalem HIS-Tag. Beide konnten exprimiert und aufgereinigt werden, und beide zeigten DNA-Strangentwindungsaktivität. Für die weiteren Versuche wurde EcRECQ mit C-terminalem HIS-Tag verwendet, wie auch die AtRECQs sie besitzen.

5.3. Einordnung der untersuchten biochemischen Aktivitäten von AtRECQ2 und AtRECQ3

Zunächst einmal soll hervorgehoben werden, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass AtRECQ2 und AtRECQ3 Strangentwindungsaktivitäten besitzen. Dies ist nicht selbstverständlich, auch wenn AtRECQ2 und AtRECQ3 alle typischen Helikase-Motive besitzen. Dies ist auch für HsRECQ4 der Fall, für das mit einer Vielzahl von DNA-Substraten keine Entwindung beobachtet werden konnte (Macris *et al.*, 2006). Doch führt der Ausfall von HsRECQ4 z.B. zum Rothmund-Thomson-Syndrom (siehe Tabelle 1).

5.3.1. Reaktionsoptima

In dieser Arbeit wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Strangentwindung analysiert. Dabei wurde das M13-basierte Standardsubstrat verwendet, unter der Annahme, dass das pH- und Salzoptimum für den Umsatz aller Substrate ähnlich ist.

Diese Optimierung erfolgte bei 37 °C. Dies war auch das Temperatur-Optimum der Enzyme AtRECQ2 und AtRECQ3 (verglichen mit Raumtemperatur und 30 °C (Daten nicht gezeigt)).

Die Konzentration von ATP, BSA und des Reduktionsmittels DTT wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht verändert, sondern wie für EcRECQ durch Umezu *et al.*, 1990 verwendet. Auch die dort eingesetzte Glycerinkonzentration von etwa 2,5 % Endkonzentration wurde nicht verändert, da das Enzym in der Regel ein Zwanzigstel des Reaktionsvolumens ausmachte. Auf den Einfluss der Magnesiumionen-Konzentration wird in Kapitel 5.3.11 eingegangen.

Zur Analyse des pH-Bereichs von 6,5 bis 10 wurde sowohl Tris-Acetat als auch Bis-Tris-Propan Puffer verwendet. Aus Abbildung 22 geht hervor, dass das Puffersalz einen großen Einfluss auf die optimale Entwindungsaktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3 hat. Bei Tris-Acetat ist ein pH-Wert von etwa 8 optimal, bei Bis-Tris-Propan in etwa pH 9,5. Was aus Abbildung 22 jedoch nicht hervorgeht, ist der Einfluss des Puffers auf den Zerfall des Substrats in Abwesenheit des Enzyms (Berechnung des Umsatzes siehe Kapitel 3.2.5.4). Hierbei war nämlich zu beobachten, dass es beim Bis-Tris-Propan Puffer im Alkalischen zu einer leichten Destabilisierung des Substrats kommt. Damit verbunden könnte eine leichtere Prozessierbarkeit durch die Helikasen sein, selbst, wenn der pH-Wert für die Enzyme weniger optimal ist (Tris-Acetat Puffer).

Für die weiteren Experimente wurde Tris-Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 verwendet; dieser pH-Wert ist physiologisch und es wurden auch andere Enzyme bei diesem pH-Wert analysiert.

Verschiedene Salze NaCl, NaAc, KCl, KAc wurden in verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich ihres Einfluss auf die Strangentwindung getestet. Obwohl kein signifikanter Unterschied zu erkennen war, fiel aufgrund einer Tendenz (weniger Inhibition bei hohen Konzentrationen) die Wahl auf KAc, dessen Einfluss genauer analysiert wurde (Abbildung 23). Die Helikaseaktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3 ist bei etwa 50 mM zusätzlichem KAc in der Reaktion am größten; generell läuft die Reaktion zwischen 0 und 100 mM KAc in der Reaktion effizient ab. Mehr Salz in der Reaktion führt bei beiden Enzymen zu einer Inhibition, die jedoch bei AtRECQ3 deutlich stärker ausgeprägt ist, als bei AtRECQ2. In den folgenden Experimenten wurde 50 mM Kaliumacetat eingesetzt. Ebenso wie der pH-Wert von 8,0 liegt auch 50 mM KAc im physiologisch sinnvollen Bereich.

5.3.2. Zweiwertige Metall-Cofaktoren (Me^{2+})

Mit dem M13-basierten Standardsubstrat wurde getestet, welche zweiwertigen Ionen als Cofaktoren, für sowohl die ATP-Hydrolyse als auch die Strangentwindung, dienen können. In diesem Zusammenhang soll dargestellt werden, dass die ATP-Hydrolyse für Helikasen eine Voraussetzung für die Strangentwindung ist. Eine Auswahl der Experimente ist in Abbildung 24 dargestellt. Zunächst kann folgende Aussage getroffen werden: beide Enzymaktivitäten, Strangentwindung und ATPase, von beiden Enzymen, AtRECQ2 und AtRECQ3, werden durch Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} gefördert aber nicht durch Zn^{2+} . Bei genauerer Betrachtung der ATP-Hydrolyse mit Zn^{2+} in der Reaktion, im Vergleich zur Reaktion ohne zugesetzten Metallcofaktor (-, H_2O), sind die Phosphatfreisetzungen mit Zn^{2+} sogar geringer, was zum einen auf eine sehr geringe Kontamination der Proteinprobe (oder eines anderen Bestandteils der Reaktion) mit einem zweiwertigen Metallion (denn die Reaktion ist bei bisher allen untersuchten Enzymen Me^{2+} abhängig), und zum anderen auf eine Inhibition durch Zn^{2+} hindeutet. Insofern zeigen beide AtRECQs ein RecQ-typisches Verhalten. Die Strangentwindungsreaktion von ScSGS1 wird z.B. signifikant durch Zn^{2+} inhibiert, aber nicht durch Mn^{2+} oder Ca^{2+} (Bennett *et al.*, 1998). Für eine effiziente ATP-Hydrolyse kann für EcRECQ (Umezu *et al.*, 1990) und DmRECQ5B (Kawasaki *et al.*, 2002) Mg^{2+} durch Mn^{2+} und auch Ca^{2+} ersetzt werden, aber nicht durch Zn^{2+} .

5.3.3. ATPase-Aktivität

Im vorangegangenen Kapitel wurden mögliche Metall-Cofaktoren für die ATPase-Aktivität von AtRECQ2 und AtRECQ3 dargestellt. Dieses Kapitel fokussiert auf die DNA-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse und darauf, dass, wie zu erwarten, das Walker A Motiv für die ATP-Hydrolyse intakt sein muss.

Beides wurde in Abbildung 21 A gezeigt. Es wurde demonstriert, dass AtRECQ2-K117M und AtRECQ3-K64M kein ATP hydrolysieren. Neben dem Hinweis auf die Notwendigkeit des konservierten Lysins für diese Funktion, konnte damit gleichzeitig gezeigt werden, dass die ATPasen von *E. coli* erfolgreich abgereinigt wurden. In Abbildung 21 A und B konnte gezeigt werden, dass DNA die ATP-Hydrolyse von AtRECQ2 und AtRECQ3 stimuliert. Eine strikte Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von DNA kann aus den Abbildungen nicht gelesen werden, allerdings ist die geringe ATP-Hydrolyse ohne Zusatz von DNA wahrscheinlich auf eine DNA-Kontamination zurückzuführen, und die ATP-Hydrolyse ist DNA-abhängig.

Es wurde gezeigt, dass die ATP-Hydrolyse mit linearer doppelsträngiger DNA weniger gefördert wird als durch zirkuläre doppelsträngige DNA, und dass auch diese weniger effizient ist als lineare einzelsträngige DNA (mit 7944 nts). Am besten, stimuliert in dieser Reihe zirkuläre einzelsträngige DNA (M13mp18 ssDNA). Dies kann zum einen damit zusammenhängen, dass die zirkulären und die einzelsträngigen DNAs, und damit im besonderen Maße die einzelsträngige zirkuläre DNA, Sekundärstrukturen ausbilden, die von den RecQ-Helikasen erkannt und gebunden werden könnten. Zum anderen nimmt die Länge des zusammenhängenden, einzelsträngigen Bereichs, an dem die RecQ-Helikasen entlangwandern und dabei ATP hydrolysieren könnten, von supergecoilter zirkulärer doppelsträngiger DNA, über lineare einzelsträngige DNA, bis hin zur zirkulären einzelsträngigen DNA zu. Übereinstimmend steigt für AtRECQ3 die ATP-Hydrolyse mit der Länge der einzelsträngigen DNA: 80merdT (linear) < ss DNA 7944 nt (linear) < ss DNA 7249 nt (zirkulär). Für AtRECQ2 hingegen ist keine Steigerung der ATP-Hydrolyse durch das Anbieten eines längeren DNA-Einzelstrangbereichs zu beobachten (z.B. 80mer dT vs. M13mp18 ssDNA). Dieses für AtRECQ2 beobachtete Verhalten, zeigt auch HsBLM (Karow *et al.*, 1997).

Allgemein wurde auch für EcRECQ, HsBLM und DmRECQ5 beobachtet, dass einzelsträngige DNA die ATP-Hydrolyse stärker stimuliert als doppelsträngige (Umezu *et al.*, 1990; Özsoy *et al.*, 2001; Janscak *et al.*, 2003), und dass in der Regel, wie für AtRECQ3 beobachtet, zirkuläre ssDNA besser geeignet ist als lineare ssDNA um die ATP-Hydrolyse zu stimulieren.

5.3.4. Nukleosidtriphosphat (NTP)-Cosubstrate

Nachdem die bisherigen Analysen mit ATP durchgeführt wurde, stellt sich die Frage, ob auch andere NTPs oder dNTPs zur Hydrolyse (Daten nicht gezeigt, übereinstimmend mit Ergebnissen des SDA) bzw. zur DNA-Strangentwindung (Abbildung 25, M13 basiertes Modellsubstrat) genutzt werden können. In diesem Aspekt unterscheiden sich AtRECQ2 und AtRECQ3. AtRECQ2 kann alle angebotenen (d)NTPs für eine effiziente Strangentwindung nutzen, ATP oder dATP sind jedoch am besten geeignet. Diese Eigenschaften sind am ehesten mit denen der HsWRN-Helikase vergleichbar. Auch HsWRN bevorzugt ATP und dATP, gefolgt von dCTP und CTP. Eine DNA-Entwindung kann auch mit GTP, dGTP, UTP und dTTP gemessen werden, sie ist allerdings minimal (Shen *et al.*, 1998). Alle anderen RecQ-Helikasen, die hierauf analysiert wurden, sind in ihrer (d)NTP-Nutzung noch weiter eingeschränkt. Für die Strangentwindung durch die kleine Isoform von DmRECQ5 ist z.B. dATP am effizientesten, gefolgt von ATP, dGTP und GTP; CTP kann die Entwindung nur zu einem sehr geringen Anteil unterstützen, und mit dCTP, dTTP und UTP ist keine Entwindung zu beobachten (Özsoy *et al.*, 2001). Das Aktivitätsspektrum der anderen RecQ-Helikasen verhält sich wie das von AtRECQ3. AtRECQ3, ScSGS1 (Bennett *et al.*, 1998) und HsRECQ5B (Garcia *et al.*, 2004) können DNA nur mit ATP oder dATP entwinden, und für EcRECQ verhält es sich mit der Hydrolyse genauso (Umezu *et al.*, 1990).

5.3.5. Direktionalität

Für eine Aussage über die Direktionalität einer Helikase, wird die Annahme getroffen, dass das Enzym an einen DNA-Einzelstrang bindet, und an diesem entlangläuft und dabei eine Direktionalität zeigt: 3'-5' oder 5'-3'. Alle bisher charakterisierten RecQ-Helikasen sind 3'-5' Helikasen. Zunächst konnte dies für AtRECQ2, mit dem gleichen Substrat, das Shen *et al.* (1998) für HsWRN verwendet haben, gezeigt werden.

Nach einer Verkürzung der Länge des Doppelstrangbereichs war auch für AtRECQ3 eine eindeutige Klassifizierung als 3'-5' Helikase möglich.

5.3.6. Verhältnis von Enzym zu Substrat

Wie auch bei den Veröffentlichungen über RecQ-Helikasen in wissenschaftlichen Zeitschriften wurde auch in dieser Arbeit ein Überschuss von Enzym bezogen auf die Substratmenge verwendet. Zum Beispiel verwendeten Mohaghegh *et al.*, 2001 mit 1 nM DNA-Substrat 10 nM HsWRN oder sogar 20 nM HsBLM. Dies entspricht nicht der Vorstellung, dass ein Enzym viele katalytische Zyklen durchläuft und dabei viel Produkt zu

Substrat umsetzt. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen ist es möglich, dass ein wichtiger Cofaktor fehlt. In diesem Zusammenhang ist für einige RecQ-Helikasen beschrieben worden, dass ihre Aktivität durch andere Proteine beeinflusst wurde, z.B. die Prozessivität durch RPA (SSB). Auch Sekundärmodifikationen von RecQ-Helikasen wurden beschrieben, jedoch nicht direkt in Verbindung mit einer Steigerung der Helikaseaktivität.

Eine andere Erklärung führt zurück zu Kapitel 5.1. Dort wurde erwähnt, dass eine Fehlfaltung oft zur Bildung von Inclusion Bodies führt. Dies ist natürlich vom Ausmaß der Fehlfaltung abhängig. Gerade, da die Aufreinigung über Tags erfolgte, gab es keine Selektion auf korrekt gefaltetes Protein. Für letzteres hätte z.B. die Selektion auf Bindung von ATP durchgeführt werden können; z.B. ähneln einige Farbstoffe der Base Adenin, was eine Affinitätsaufreinigung z.B. über Blue Sepharose ermöglicht hätte. Aus dem soeben Geschriebenen folgt, dass unter Umständen nur ein sehr geringer Anteil des Proteins funktionell ist. Der Anteil inaktiven Enzyms könnte bei verschiedenen Enzymchargen unterschiedlich groß ausfallen, auch z.B. wenn diese unterschiedlich lang gelagert wurden. Mit diesen Argumenten könnte man z.B. das in Abbildung 41 zu beobachtende unterschiedliche Verhalten (bezüglich des Absolutumsatzes) zweier AtRECQ3 Chargen erklären.

Neben dem ungünstigen Verhältnis von Enzym zu Substrat, wurde zusätzlich im Verlauf dieser Arbeit festgestellt, dass die Zeitkinetiken abhängig vom jeweiligen DNA-Substrat enzymtypisch oder atypisch sein können. Zum Beispiel wurden die Holliday-Junction und die D-Loops deutlich über 20 Minuten hinaus umgesetzt – ein enzymtypisches Verhalten. Ebenso konnte eine Linearität der ATP-Hydrolyse für beide Enzyme über mehr als 60 Minuten gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Beim Umsatz des M13-basierten Standardsubstrats hingegen war ein stöchiometrischer Umsatz zu beobachten. Nach kurzer Zeit veränderte sich die Produktmenge nicht mehr, unabhängig von der Menge des eingesetzten Substrats (Daten nicht gezeigt). Da dieses Phänomen beim M13-basierten Substrat beobachtet wurde, wäre es denkbar, dass das Enzym am zirkulären M13-Einzelstrang hängen bleibt und damit der Reaktion entzogen ist, wobei es bei den oligonukleotidbasierten Substraten nach Beendigung der Reaktion freigesetzt wurde, wie für einen Katalysator erwartet. Andererseits könnte es sich hierbei um den Ausdruck einer Bevorzugung bestimmter Substrate handeln.

5.3.7. Umsatz von partieller Duplex-DNA

Da AtRECQ3 das ursprünglich gewählte Direktionalitätssubstrat nicht umsetzen konnte, wurden, einerseits die Länge des Duplexbereichs (Kapitel 4.8) und andererseits die Länge des 3' Überhangs (Kapitel 4.10) für AtRECQ2 und AtRECQ3 vergleichend analysiert.

Für beide Enzyme gilt, dass der Umsatz mit zunehmender Länge des Duplexbereichs abnimmt. Bei AtRECQ2 verringert sich der Umsatz bei einer Zunahme der Duplexlänge um nur acht Basenpaare (von 15 bp auf 23 bp) um etwa 80 %. Für AtRECQ3 konnte unter Standardbedingungen überhaupt nur mit 15 und 17 Basenpaar-Duplexen ein Umsatz gezeigt werden. Im Gegensatz dazu, wurde das M13-basierte Standardsubstrat mit 17 Basenpaaren und je 10 Nukleotiden 3' und 5' Überhängen von AtRECQ2 und AtRECQ3 in etwa gleich gut umgesetzt, und zwar von AtRECQ3 sogar deutlich besser als der 15 bp-Duplex.

Folglich unterscheiden sich AtRECQ2 und AtRECQ3 in diesem Aspekt signifikant. Der Unterschied kann auf mehrere Enzymeigenschaften zurückgeführt werden.

Zum einen könnte AtRECQ3 eine **echte Substratpräferenz** für eine DNA-Struktur haben, die durch das M13-Standardsubstrat dargestellt wird, z.B. für DNA-Gabelungen, wohingegen AtRECQ2 keine Präferenz für Gabelung im Vergleich zu einfachen 3' Überhängen hätte.

Zum zweiten könnten die Enzyme den **Duplexbereich** im unterschiedlichen Ausmaß **destabilisieren**. In diesem Zusammenhang soll kurz auf die Unterschiede von aktiven zu passiven Helikasen nach Betterton und Julicher, 2005 eingegangen werden (Abbildung 42).

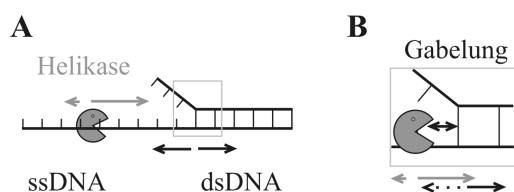


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Funktionsweise von aktiven und passiven Helikasen.

A, Die DNA-Helikase bewegt sich, entsprechend ihrer Direktionalität, auf die Gabelung zu. Die DNA an der Gabelung atmet, was bedeutet, Basenpaare lösen und bilden sich.

B, Ausschnitt an der Gabelung. Eine aktive Helikase destabilisiert die Basenpaare und trägt damit aktiv zum Lösen der Basenpaare bei. Eine passive Helikase verhindert (durch ihre Anwesenheit) das Schließen der DNA. Bei einer thermodynamisch bedingten Lösung des vorausliegenden Basenpaars „rückt sie vor“, was so nach und nach zur Strangentwindung führt.

Helikasen als Motorproteine oder Translokasen bewegen sich mit einer gewissen Direktionalität (siehe Kapitel 5.3.5) an ssDNA entlang. Treffen sie auf eine Kreuzung von einzelsträngiger mit doppelsträngiger DNA, wird die doppelsträngige DNA entwunden. Aktive Helikasen destabilisieren dabei die Basenpaare, wohingegen passive Helikasen von thermischen Fluktuationen der DNA abhängen.

Obwohl in beiden Fällen ein GC-Basenpaar ein größeres „Hindernis“ darstellt als ein AT-Basenpaar, so ist dieser Effekt bei passiven Helikasen deutlich stärker ausgeprägt.

Zurück zu AtRECQ2 und AtRECQ3 könnte man daher schließen, dass der aktive Anteil der Entwindung bei AtRECQ2 stärker ausgeprägt ist, als bei AtRECQ3, da AtRECQ3 das M13-basierte Substrat mit 8 ATs und 9 GCs deutlich besser umsetzen kann als das 3' Überhangssubstrat mit nur 5 ATs aber 12 GCs (Tabelle 9), AtRECQ2 jedoch beide in etwa gleich. Eine Einschränkung der Aussage ergibt sich durch die Beobachtung, dass für das M13-basierte Substrat und die 3' Überhangssubstrate unterschiedliche Mg^{2+} -Ionen-Optima festgestellt wurden (siehe Kapitel 5.3.11). Jedoch zeigte auch ein weiteres Experiment, dass AtRECQ3 das 15 bp- 3' Überhangssubstrat deutlich besser umsetzte als ein 3' Überhangssubstrat mit 13 bp mit 13 GCs (nicht dargestellt). Eine Aussage darüber zu treffen, ob AtRECQ3 tatsächlich eher eine passive Helikase ist, würde aufwendige Experimente erfordern.

Eine dritte Erklärung wären unterschiedliche **Prozessivitäten** der beiden Enzyme. Darunter versteht man, wie viele Bindungen im Durchschnitt gelöst werden, bevor die Helikase vom Substrat abfällt. In diesem Falle wäre es theoretisch denkbar, dass das M13-Standardsubstrat von beiden Seiten entwunden wird, was jedoch bei den 3' Überhängen nicht möglich ist. Generell wurde für RecQ-Helikasen in *in vitro* Systemen relativ geringe Prozessivitäten gemessen, die jedoch in der Regel durch die Zugabe von Einzelstrangbindeprotein SSB/RPA erhöht werden konnten.

Schließlich könnten sich AtRECQ2 und AtRECQ3 aber auch in ihren **Anforderungen an die Länge des 3' Überhangs** unterscheiden. Da bei dem Experiment immer der gleiche 46-nt-lange Gegenstrang verwendet wurde, wurde der Überhang mit zunehmender Länge des Duplexbereichs immer kürzer. Beim M13-Standardsubstrat hätte man einen quasi unendlich langen 3' Überhang. Daher wurde der Umsatz von AtRECQ2 und AtRECQ3, unter optimalen Magnesiumionen-Konzentrationen, an 3' Überhangssubstraten untersucht, die einen Duplexbereich von 15 bp aber unterschiedliche Längen des 3' Überhangs aufwiesen (Kapitel 4.10).

Tatsächlich braucht AtRECQ3 mindestens 14 Nukleotide Überhang um die 15 Basenpaare messbar zu entwinden, wohingegen bei AtRECQ2 bereits 5 Nukleotide ausreichen. Der Umsatz nahm mit zunehmender Länge des Überhangs für beide Enzyme zu. Allerdings war für AtRECQ3 selbst mit 31 Nukleotiden noch kein Optimum erreicht.

Dieses Experiment zeigt also klare Unterschiede zwischen AtRECQ2 und AtRECQ3 bei den Anforderungen an die Länge des 3' Überhangs auf.

5.3.8. Umsatz verschiedener D-Loop Strukturen

Bisher konnten für AtRECQ2 und AtRECQ3 Unterschiede bei der Verwendung von Nukleosidtriphosphaten und beim Umsatz verschiedener 3' Überhangssubstrate festgestellt werden. Von noch entscheidenderer Bedeutung ist allerdings die Analyse verschiedener DNA-Substrate, die Intermediate der Replikation oder der Rekombination darstellen, da dies gemäß der Literatur die biologisch relevanten Substrate für RecQ-Helikasen sind.

Um die Bedeutung von D-Loops und Holliday-Junctions besser darstellen zu können, sind in Abbildung 43 die wichtigsten Modelle zur Doppelstrangbruchreparatur skizziert. Doch, wie im Text vermerkt, können die Strukturen auch noch in anderem Kontext auftreten.

Damit die gewonnenen Daten besser mit den Literaturergebnissen verglichen werden können - gerade im Hinblick auf eine funktionelle Konservierung von Funktionen - wurden für die hier verwendeten Strukturen (D-Loops, X12-Holliday-Junction und Replikationsgabel) Sequenzen verwendet, die im RecQ-Kontext bereits veröffentlicht wurden.

D-Loop-Strukturen werden in einem frühen Schritt der homologen Rekombination ausgebildet, wenn einzelsträngige DNA (z.B. RAD51-vermittelt), in einen homologen doppelsträngigen DNA-Bereich einwandert und mit dem komplementären Strang des Duplexes paart (siehe Abbildung 4 und Abbildung 43). Dies ist nicht nur in der Meiose wichtig, sondern auch bei manchen DNA-Reparaturprozessen, ganz klar bei der Doppelstrangbruchreparatur durch HR. D-Loop Strukturen können aber z.B. auch auftreten, um arretierte Replikationsgabeln über homologe Rekombination neu aufzubauen (Haber, 1999; Kowalczykowski, 2000).

In dieser Arbeit wurden künstliche D-Loop-Strukturen hergestellt, bei denen der eingedrungene Strang entweder einen 3'-, einen 5'- oder keinen Überhang hatte. Außerdem wurde die zugrunde liegende Blasen/Bubble-Struktur hergestellt. Dabei wurden in einem Satz Experimente der eindringende Strang markiert (Abbildung 32 und Abbildung 33), in einem weiteren ein Strang der Bubble-Struktur (Abbildung 34).

Die Experimente wurden bereits größtenteils im Ergebnisteil bewertet. Hier sollen die Ergebnisse noch einmal kurz zusammengefasst, verglichen, und die biologische Relevanz dargestellt werden.

Doppelstrangbruch-reparaturmodelle

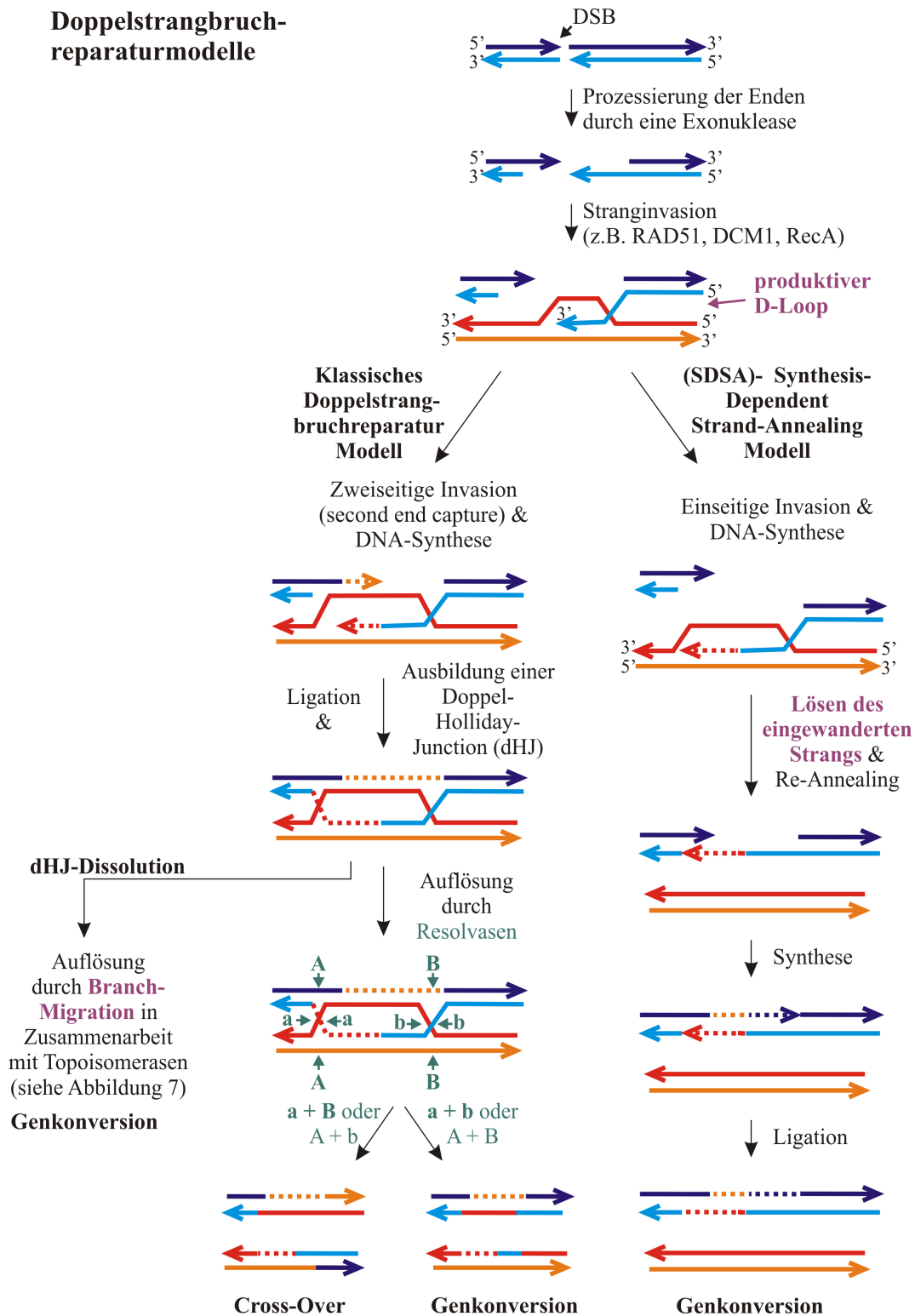


Abbildung 43: Darstellung der wichtigsten Doppelstrangbruchreparatur-Modelle.

Ein Doppelstrangbruch (DSB) kann grundsätzlich über illegitime Rekombination (z.B. NHEJ) oder über die homologe Rekombination repariert werden. Hier ist schematisch das klassische DSBR-Modell und das SDSA-Modell der HR dargestellt. Außerdem ist die Abzweigung zur dHJ-Dissolution skizziert. In dieser Arbeit wurden den AtRECQ-Helikasen verschiedene D-Loops und eine Holliday-Junction als Substrat angeboten. Wenn in der Diskussion gezielt auf diese Abbildung verwiesen wurde, sind die entsprechenden Stellen violett markiert. Hier könnten die AtRECQs eine Rolle spielen. Neu synthetisierte DNA-Abschnitte sind gepunktet. Die Pfeilspitze zeigt das 3' Ende an.

AtRECQ2 und AtRECQ3 können beide den eingedrungenen Strang aus allen D-loops herauslösen. Dabei ist bei AtRECQ2 keine Präferenz bezüglich des freien Überhangs des eindringenden Strangs zu erkennen, die Daten für ARECQ3 deuten jedoch an, dass ein eindringender Strang mit Überhang besser umgesetzt werden kann, als wenn kein Überhang vorhanden ist. Die Bubble-Struktur kann nur von AtRECQ2 aufgelöst werden.

Der D-Loop mit 5' Überhang-Strang, ist gleichzeitig derjenige, der ein eingedrunenes freies 3' OH-Ende hat, das durch eine Polymerase verlängert werden kann (siehe Abbildung 43). Nur diese D-Loops sind im Sinne der homologen Rekombination produktiv. Ein Auflösen solcher Strukturen kann also als anti-rekombinogen angesehen werden, besonders auch im Zusammenhang mit dem SDSA-Modell (siehe Abbildung 43). Eine Beteiligung beim SDSA und damit der Genkonversion ist zuträglich für die genomische Stabilität (siehe Einleitung) – und der Erhalt der genomischen Stabilität ist eine Funktion, die den RecQ-Helikasen generell zugeschrieben wird.

In der Natur jedoch, zumindest bei der Hefe und beim Menschen, katalysiert eines der für die D-Loop-Bildung notwendigen Enzyme, RAD51, eher die Einwanderung von 5' Enden (Mazin *et al.*, 2000), was zu unproduktiven D-Loops mit eingedrungenen Strängen mit 3' Schwänzen führt. Gerade hier wäre die Aktion von RecQ-Helikasen wichtig. Dies wurde bereits für HsBLM vorgeschlagen (van Brabant *et al.*, 2000; Bachrati *et al.*, 2006).

Die gleichen D-Loop-Strukturen wie in dieser Arbeit wurden auch für die Analyse von HsRECQ1 (Sharma *et al.*, 2005) und HsBLM (van Brabant *et al.*, 2000) verwendet. Sowohl HsRECQ1 als auch HsBLM lösen den eingedrungenen Strang mit der folgenden Präferenz aus dem D-Loop hinaus: 3' Überhang, 5' Überhang, kein Überhang. Übereinstimmend mit dieser Präferenzfolge konnte auch AtRECQ3 einen D-Loop mit eingedrunenem Strang ohne Überhang weniger effizient umsetzen als solche mit Schwänzen.

Für die Charakterisierung von HsWRN waren die D-Loops aus anderen Oligonukleotiden aufgebaut (Orren *et al.*, 2002). Hierbei setzte HsWRN, ähnlich wie AtRECQ2, die eingedrungenen Stränge aus allen drei D-Loops ähnlich effizient frei. Es wurde vorgeschlagen, dass HsWRN die Kreuzung von ssDNA und dsDNA erkennt und dort initiiert (Brosh *et al.*, 2002; Orren *et al.*, 2002). Dies wäre auch für AtRECQ2 denkbar, zumindest stehen alle bisher erhaltenen Daten hiermit im Einklang: Es wird kein langer Überhang benötigt (siehe Kapitel 4.10), und AtRECQ2 kann Strukturen auflösen, bei denen keine freien einzelsträngigen Enden vorkommen, wie die Bubble-Struktur und eine Holliday-Junction (siehe nächster Abschnitt).

5.3.9. Umsatz einer partiell mobilen Holliday-Junction

Nach der Bildung produktiver D-Loops können diese zu Holliday-Junctions umgesetzt werden (siehe Abbildung 43). Außerdem kann es auch bei der Reparatur von arretierten Replikationsgabeln zu HJ-ähnlichen Strukturen kommen (siehe nächstes Kapitel).

Holliday-Junctions stellen in der RecQ-Forschung die Substrate dar, an denen die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden. In dieser Arbeit wurde die partiell mobile X12-HJ nach Mohaghegh *et al.*, 2001 verwendet (siehe auch Abbildung 35).

Während AtRECQ3 die Holliday-Junction nicht umsetzen konnte, entstand durch die Katalyse von AtRECQ2 splayed Arm (gegabeltes) Produkt. Ein alternatives Produkt, das auch, allerdings nur in einer geringen Menge gefunden wurde, ist einzelsträngiges Oligonukleotid. Dieses könnte verbunden mit der gleichzeitigen Bildung einer 3-Wege-Struktur (die allerdings nicht beobachtet wurde) aus der HJ rausgelöst werden, oder in einem zweiten Schritt durch Entwindung des splayed Arm Produkts gebildet werden.

Das splayed Arm Produkt entstand bei AtRECQ2 wie erwartet, erstens enzymkonzentrationsabhängig, zweitens nur in Gegenwart von ATP, drittens zeitabhängig und wurde viertens nicht durch AtRECQ2-K117M gebildet.

Prinzipiell entstehen die splayed Arm Produkte durch Branch Migration, d.h. durch die Verschiebung des Kreuzungspunkts – hier bis an das Ende der DNA-Oligonukleotide. Damit „zerfällt“ die 4-Oligonukleotidstruktur in zwei 2-Oligonukleotidstrukturen (Abbildung 44 A). Aufgrund der heterologen Bereiche sind die 2-Oligonukleotidstrukturen nicht gänzlich, sondern nur partiell komplementär, so dass gegabelte (splayed arm) Strukturen entstehen. In Abbildung 44 B ist die Branch Migration durch den bakteriellen RuvAB-Komplex dargestellt.

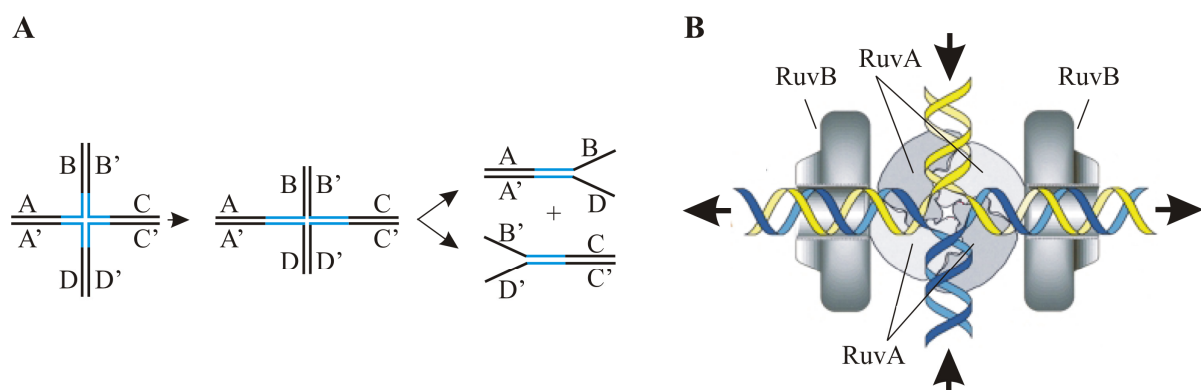


Abbildung 44: Modell der Branch Migration in dieser Arbeit und durch den RuvAB-Komplex.

A, Schematische Darstellung eines möglichen Ausgangs durch Branch Migration bei der in dieser Arbeit verwendeten X12-HJ. A und A' usw. bezeichnen komplementäre DNA-Sequenzen.

B, Das RuvA-Tetramer interagiert mit der eigentlichen Kreuzungsstruktur und bringt sie in eine planare Form. Die beiden RuvB-Hexamere umschließen gegenüberliegende DNA-Stränge und bewirken, als ATP-abhängige DNA-Motoren, den Ausstoß der Heteroduplex-DNA (gelb /blau). Abbildung verändert nach Ingleston *et al.*, 2000.

In der Natur bestimmt das Ausmaß der Branch Migration, wie viel genetisches Material zwischen homologen Bereichen ausgetauscht wird (siehe auch Abbildung 43) und für die genetische Variabilität muss auch der Austausch von nicht hundertprozentig identischem Erbmateriale in einem homologen Kontext gegeben sein (siehe z.B. Holmes *et al.*, 2001). Für RuvAB (des bakteriellen Resolvase-Systems RuvABC) (siehe Abbildung 44 B) konnte gezeigt werden, dass die Branch Migration von HJs in identischen DNA-Bereichen (entspricht hier dem mobilen Bereich, in Abbildung 35 und Abbildung 44 blau dargestellt) unidirektional und prozessiv ist. Jedoch auch heterologe Bereiche (in Abbildung 35 und Abbildung 44 schwarz dargestellt – verschiedene Buchstaben bedeuten Heterologie) konnten überwunden werden, jedoch deutlich weniger effizient (Dennis *et al.*, 2004).

Wie in Abbildung 44 B zu sehen, sind bei der Branch Migration durch das RuvAB-System mindestens drei Proteinkomplexe beteiligt: zwei RuvB-Hexamere und mindestens ein RuvA-Tetramer. Es ist zu vermuten, dass die RecQ-Helikasen die Branch Migration nach einem anderen Mechanismus katalysieren, z.B. durch koordiniertes Entwinden und Re-Annealen der Stränge (siehe auch nächstes Kapitel). In diesem Fall würde unter Umständen der heterologe DNA-Bereich an den Enden der X12-HJ weniger ins Gewicht fallen als bei der Branch Migration durch RuvAB. Auch in der RecQ-Literatur wird die Entstehung von splayed Arm ausgehend von der X12-HJ als Branch Migration gewertet.

Auch für andere RecQ-Helikasen ist splayed arm das Hauptprodukt. Dies wurde mit dem gleichen Substrat, der X12-HJ, für HsWRN (Mohaghegh *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006) und HsRECQ1 (Sharma *et al.*, 2005) gezeigt, und für HsRECQ5 β mit einer X26-HJ (Garcia *et al.*, 2004). Für HsRECQ1 und HsRECQ5 β wurde zusätzlich gezeigt, dass die Branch Migration durch RuvA inhibiert wird. Wie in Abbildung 44 B zu sehen, bindet das RuvA-Tetramer an die Kreuzung und blockiert diese dadurch für die RecQ-Helikasen.

Unter optimierten Mg²⁺-Bedingungen kann auch DmRECQ5 β die X12-HJ auflösen (Özsoy *et al.*, 2003). Auch EcRECQ löst, zumindest in der Gegenwart von SSB, die HJ auf (Harmon und Kowalczykowski, 1998). Leider ist für beide Enzyme nicht angegeben, zu welchen Produkten die HJs aufgelöst werden. Für ScSGS1 hingegen ist bekannt, dass die HJ komplett in die Einzelstränge aufgelöst wird (Bennett *et al.*, 1999)

Komplexer stellt sich die Situation für HsBLM dar. Dieses Enzym katalysiert an der X12-HJ die Bildung von Einzelsträngen, wahrscheinlich jedoch ausgehend von splayed arm Produkten, die zuerst gebildet wurden (Mohaghegh *et al.*, 2001; Janscak *et al.*, 2003; Bachrati *et al.*, 2006).

An Plasmid-basierten HJ, sogenannten α -Strukturen, ist Branch Migration sowohl durch HsBLM (Karow *et al.*, 2000) als auch durch HsWRN (Constantinou *et al.*, 2000) beobachtet worden. Das bekräftigt, dass HsBLM auch die Oligonukleotid-basierten HJs über Branch Migration auflöst.

Im Kontext der Holliday-Junctions konnte, wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe auch Abbildung 7 und Abbildung 43) für HsBLM gezeigt werden, dass dieses Enzym Doppel-Holliday-Junction in Zusammenarbeit mit u.a. HsTOPOIII α durch dHJ-Dissolution auflösen kann, was zu Genkonversionen führt (Wu und Hickson, 2003).

Im Hinblick auf die HJs wären in der Zukunft folgende Experimente interessant. Erstens könnte die Reaktion an HJs untersucht werden, die durch ihre Sequenz mehr oder weniger Heterologie (im Gegensatz zum mobilen Teil) bieten, um zu sehen, ob ein Einfluss auf die Branch Migration zu erkennen ist. Gerade im Hinblick auf AtRECQ3 könnten zweitens auch kürzere HJs untersucht werden, da unter Umständen AtRECQ3 nur nicht prozessiv genug ist, um die X12-HJ umzusetzen, prinzipiell jedoch mit der DNA-Struktur „Holliday-Junction“ umgehen kann.

5.3.10. Umsatz einer Modell-Replikationsgabel

In Abbildung 9 wurden bereits verschiedene mögliche Schicksale einer arretierten Replikationsgabel dargestellt, an derer Prozessierung auch RecQ-Helikasen beteiligt sind (Bachrati und Hickson, 2003). Eine Möglichkeit, die Replikation über die Läsion im Vorwärtsstrang hinweg zu führen, verläuft über die Ausbildung einer Holliday-Junction, die in diesem Kontext als Chicken-Foot-Struktur bezeichnet wird, durch Replikationsgabel-Regression (Abbildung 9, Struktur 3) (Cox, 2002). Die beiden neusynthetisierten Tochterstränge paaren und der Vorwärtsstrang kann durch eine Polymerase mit dem (längeren) Rückwärtsstrang als Template weitersynthetisiert werden. Durch reverse Branch Migration wird die Replikationsgabel wiederhergestellt und die Läsion ist überwunden.

Die Replikationsgabel in dieser Arbeit war durch die Wahl der Homologieregionen so entworfen, dass eine Replikationsgabelregression möglich war (Machwe *et al.*, 2006) (siehe auch Abbildung 39 und Abbildung 45).

Die Reaktionen an dieser Replikationsgabel wurden bereits mit einer Vielzahl von Enzymen, HsBLM, HsWRN und EcRECQ eingeschlossen, von Machwe *et al.*, 2006 analysiert.

In der gerade zitierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die von HsBLM und HsWRN vermittelte Bildung des Tochterduplexes charakteristisch für koordinierte DNA-Strang-Entwindung und -Paarung ist.

In einer zweiten Studie (Machwe *et al.*, 2007) wurde die Katalyse durch HsWRN an ähnlichen Replikationsgabeln genauer untersucht. In jener Arbeit konnte direkt die Bildung des Chicken-Foot-Intermediats durch die Zugabe von RusA, einem anderen HJ-bindenden Protein (siehe auch RuvA in Abbildung 44), gezeigt werden.

Die Tatsache, dass einige (z.B. alle menschlichen) RecQ-Helikasen Strand-Annealing katalysieren (Garcia *et al.*, 2004; Cheok *et al.*, 2005; Machwe *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Macris *et al.*, 2006; Muzzolini *et al.*, 2007) unterstützt die Idee der koordinierten Strang-Entwindung und -Paarung weiter.

Mit Hilfe dieser von Machwe *et al.* validierten Replikationsgabel konnte gezeigt werden, dass auch AtRECQ2 die Bildung des Tochterduplexes katalysiert (Abbildung 40 und Abbildung 41). Folglich ist AtRECQ2 wie auch HsWRN und HsBLM in der Lage Strang-Entwindung und -paarung zu koordinieren, um eine Regression der Replikationsgabel zu bewerkstelligen (Abbildung 45).

Im Gegensatz zu AtRECQ2 katalysiert EcRECQ die Vorwärtsentwindung (Abbildung 40, schematisch in Abbildung 45). Dieses Ergebnis bestätigt die Literaturdaten über EcRECQ (Machwe *et al.*, 2006). Dieser Unterschied wird auch an Plasmid-basierten gegabelten Modellsubstraten deutlich. HsBLM kann die Regression der gegabelten Struktur katalysieren, EcRECQ jedoch nicht (Ralf *et al.*, 2006). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde durch EcRECQ auch kein Strand-Annealing mit anderen Modellsubstraten beobachtet. Nach einem Modell von Hishida *et al.*, 2004 katalysiert EcRECQ zunächst die Vorwärtsentwindung, wechselt dann aber, wie in Abbildung 5 gezeigt, den Strang.

Der Vergleich von AtRECQ2 mit AtRECQ3 zeigt fundamentale Unterschiede zwischen den beiden Enzymen auf. Sie unterscheiden sich nicht nur im Optimum der Mg^{2+} -Konzentration (siehe nächstes Kapitel) sondern auch in den Reaktionsprodukten. Die Reaktionsprodukte von AtRECQ3 entsprechen zunächst nicht den in Abbildung 39 B dargestellten Möglichkeiten. Hiernach ist der markierte 27-er-Einzelstrang kein erwartetes Produkt. In Abbildung 45 wurde der Versuch unternommen, die Reaktionsprodukte zu erklären. Die zur Bestätigung notwendigen Experimente konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Nach dem Ablösen des orange-gezeichneten Tochterstrangs ausgehend von der Kreuzung in 3'-5' Richtung kommt es, enzymkatalysiert oder durch das Atmen der DNA (siehe Abbildung 42), zum Paaren der beiden parentalen Stränge. Diese Paarung setzt sich fort, bis der ^{32}P -markierte, rot gezeichnete Tochterstrang, gelöst ist. Da es nicht in großem Ausmaß zu einer spontanen Bildung des Tochterduplexes in der Reaktion kommt, wäre erklärt, wie es zu der Bildung des parentalen Duplex verbunden mit Tochtersträngen kommt – eine Reaktion, die bisher nicht als Hauptreaktion einer RecQ-Helikase an diesem Substrat beobachtet wurde.

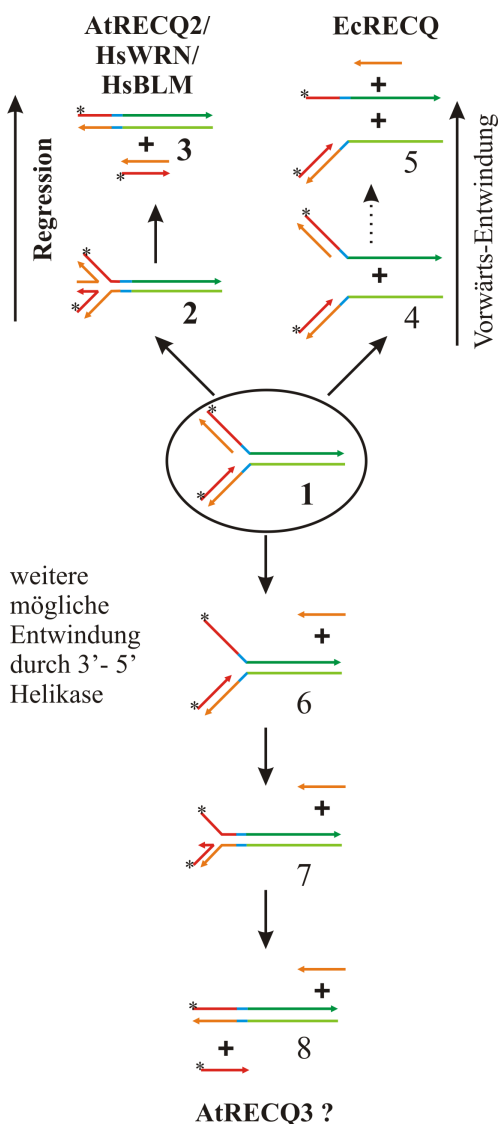


Abbildung 45: Erweiterte Darstellung der möglichen Reaktionen an der Modell-Replikationsgabel.

Die Replikationsgabel (siehe Abbildung 39 A) ist in (1) gezeigt. Die Pfeilspitzen markieren die 3'-Enden der Oligonukleotide. Durch die Homologien ist es möglich, dass es, wie durch AtRECQ2, HsWRN und HsBLM katalysiert, zu einer Rückfaltung – Regression – der Replikationsgabel kommt. Dabei entsteht aus Intermediat die in (2) gezeigte Holliday-Junction, die auch als Chicken-Foot bezeichnet wird. Der blau markierte Heterologiebereich verhindert, dass dieser Prozess spontan stattfindet. Weiterführende Branch Migration führt zur Entstehung von parentalem Duplex und Tochterduplex (3).

Ein weiterer, durch EcRECQ vermittelter, alternativer Umsatzweg ist die Vorwärtsentwindung. Hierbei entstehen gemischte Duplexe aus einem parentalen Strang und einem Tochterstrang (4), die dann u.U. weiter aufgelöst werden können z.B. in die in (5) gezeigten Produkte durch eine 3'-5'-Helikase.

Weiterhin ist es natürlich möglich (6), dass einfach nur ein Tochterstrang-Arm durch die Aktion einer Helikase abgelöst wird und eine 3-armige Struktur übrig bleibt, hier eingezeichnet für eine 3'-5'-Helikase. In (8) sind die Produkte dargestellt, die durch AtRECQ3 katalysiert werden. Da AtRECQ3 DNA-Substrate ohne Überhänge (blunt) nicht umsetzen kann, und vermutlich auch die Vorwärtsentwindung wegen der zu geringen Prozessivität nicht katalysieren kann, verläuft der Weg vermutlich über die Zwischenstruktur (6), die jedoch aufgrund der Trennschärfe des Gels nur erahnt werden kann (z.B. bei 11,71 mM Mg^{2+} in Abbildung 41). Enzymkatalysiert oder durch das Atmen der DNA (siehe Abbildung 42), kommt es zur Paarung der komplementären parentalen Stränge. Durch diese Paarung wird nach und nach der ^{32}P -markierte, rot gezeichnete Tochterstrang, verdrängt.

5.3.11. Bedeutung der Mg^{2+} -Konzentration in der Reaktion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Substrate bei unterschiedlichen freien Mg^{2+} -Konzentrationen am besten umgesetzt werden können (Kapitel 4.9). Dabei haben Magnesiumionen mindestens zwei Effekte: Zum einen wird ATP als MgATP^{2-} -Komplex für

die Entwindung zur Verfügung gestellt, zum anderen kann Mg^{2+} die Struktur (Konformation) von DNA-Substraten beeinflussen. In der Reaktion sieht man die Summe aller Effekte.

Für den Umsatz der meisten DNA-Substrate durch die AtRECQ-Helikasen war eine hohe $MgATP^{2-}$ -Konzentration verbunden mit einer minimalen freien Mg^{2+} -Konzentration optimal. Auch für andere RecQ-Helikasen wurde eine Hemmung durch freies Mg^{2+} beobachtet, z.B. für EcRECQ und HsRECQ1 (Harmon und Kowalczykowski, 2001; Sharma *et al.*, 2005).

Gerade durch diese geringe Mg^{2+} -Konzentration kommt es z.B. bei der Holliday-Junction zu einer offenen Konformation, die im Gegensatz zu einer, durch Kationen begünstigten, gestapelten Konformation steht (Shida *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2004). So wurde z.B. gezeigt, dass DmRECQ5 β wie auch AtRECQ2 die HJ-Struktur nur bei niedrigen freien Mg^{2+} -Konzentrationen umsetzen kann (Özsoy *et al.*, 2003).

So ist es denkbar, dass für den Umsatz der 3' Überhangssubstrate und der Replikationsgabel höhere freie Magnesiumkonzentrationen zu Konformationen führen, die von den AtRECQs umgesetzt werden können. Da AtRECQ2 und AtRECQ3 an der Replikationsgabel verschiedene Reaktionen katalysieren, denen vermutlich ein distinkter Mechanismus zu Grunde liegt, sind auch hier enzymabhängige Unterschiede im Mg^{2+} -Optimum plausibel.

Schließlich soll noch angemerkt werden, dass im Zusammenhang mit den 3' Überhängen festgestellt wurde, dass der Einfluss der Mg^{2+} -Ionenkonzentration um so schwächer ausgeprägt ist, je besser das Substrat an sich umgesetzt werden kann.

5.4. Schlussfolgerungen

Wenn man die Exonukleasedomäne von HsWRN unberücksichtigt lässt, kann man spekulieren, dass HsWRN und AtRECQ2 funktionelle Orthologe sind. Dafür spricht v.a. die physikalische Interaktion von AtRECQ2 und AtWRN_{exo}. Aber auch die Daten, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, unterstützen diese Hypothese: Die Spektren der (d)NTP-Nutzung sind bei diesen beiden Helikasen am ähnlichsten, ebenso der Umsatz verschiedener D-Loop-Strukturen. Allerdings ist es zu früh, diese Hypothese zur Theorie zu erklären – dafür sollten weitere Untersuchungen, gerade auch *in vivo* Untersuchungen, erfolgen.

Für AtRECQ3 ergibt sich keine klare funktionelle Zuordnung zu einem menschlichen Enzym. Betrachtet man die Domänenorganisation, ist HsRECQ5 β am ähnlichsten – dieses Enzym kann jedoch eine X26-HJ umsetzen. Angesichts des Mangels an veröffentlichten Daten ist keine funktionelle Zuordnung möglich. Es ist hingegen durchaus möglich, dass mit der biochemischen Analyse von AtRECQ3 in dieser Arbeit der Grundbaustein für die Charakterisierung eines pflanzenspezifischen RecQ-Homologs gelegt wurde.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurden einige interessante Ergebnisse erhalten, ob und wie AtRECQ2 und AtRECQ3 verschiedene DNA-Strukturen umsetzen, die z.B. bei der Replikation und DNA-Reparatur auftreten.

In der Zukunft sollten zunächst die Hypothesen bezüglich der Reaktion von AtRECQ3 (aber auch AtRECQ2) an der Replikationsgabel überprüft, bzw. das Phänomen genauer analysiert werden.

Weiterhin könnten zusätzliche DNA-Strukturen getestet werden, um bevorzugte Substrate von AtRECQ2 bzw. AtRECQ3 zu bestimmen, um so der biologischen Funktion der Proteine näher zu kommen. Dafür bieten sich zum Beispiel Quadruplex-Strukturen an (siehe Abbildung 8 und Abbildung 10).

Um die Hypothese der funktionellen Homologie von HsWRN mit AtRECQ2 und AtWRNexo fundamental zu stärken, sollte tatsächlich dieser Komplex mit definierten DNA-Substraten inkubiert werden, um zu sehen, ob eine Kooperation der beiden zu beobachten ist (siehe z.B. Opresko *et al.*, 2001).

Für die Auflösung von RAD51-Nukleoprotein-Filamenten (siehe Kapitel 1.3.3), konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion spezifisch für bestimmte RecQ-Homologe ist. Die Helikasen HsRECQ5 β und HsBLM können es, HsRECQ1 jedoch nicht (Bugreev *et al.*, 2007). Da HsRECQ5 β eine ähnliche Domänenstruktur hat wie AtRECQ3, sollte getestet werden, ob auch AtRECQ3 in der Lage ist, AtRAD51-DNA-Filamente aufzulösen.

Neben AtRECQ2 und AtRECQ3 laden aber auch die anderen AtRECQs zur Analyse der biochemischen Funktionen ein. Besonders interessant sind hier zunächst AtRECQ4A und AtRECQ4B, die trotz ihrer hohen Homologie unterschiedliche biologische Funktionen haben. Es wäre sehr interessant zu sehen, ob sich diese Einzelproteine in ihren biochemischen Eigenschaften unterscheiden, oder ob unterschiedliche Komplexpartner (siehe hierzu auch Kapitel 1.4.2) dafür verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang ist auch die EF-Hand von AtRECQ4A auffällig, die sonst in keinem RecQ-Homolog identifiziert worden ist.

AtRECQsim bietet in einem Protein gleich mehrere interessante Phänomene. Zunächst könnte jedoch analysiert werden, ob trotz der Unterbrechung der Helikasedomäne eine Helikasefunktion nachzuweisen ist (siehe auch Kapitel 1.5.3).

Falls durch mehrere Experimente, Indizien für Funktionen bestimmter Domänen gesammelt werden können, könnten diese entweder durch Mutationen, oder durch konstruierte chimäre RecQ-Proteine, biochemisch genauer charakterisiert werden.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei RecQ-Helikasen aus dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* biochemisch charakterisiert. Damit leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zur RecQ-Grundlagenforschung – vor allem hinsichtlich des Verständnisses der funktionellen Evolution und der Besonderheiten der pflanzlichen RecQ-Familie.

RecQ-Helikasen spielen eine wichtige Rolle beim Erhalt der genomischen Stabilität. Von den fünf verschiedenen RecQ-Homologen des Menschen, sind drei mit dem Auftreten verschiedener schwerwiegender Erbkrankheiten verbunden - nämlich mit Bloom's-, Werner- und Rothmund-Thomson-Syndrom. Diese sind u.a. durch Genominstabilität charakterisiert. Während *E. coli* und die Bäckerhefe nur ein RecQ-Homolog besitzen, hat *Arabidopsis thaliana* sogar sieben (AtRECQ1, -2, -3, -4A, -4B, -5 und AtRECQsim).

Die genaue Funktion ist bisher von keinem RecQ-Homolog bekannt. Sie spielen im gesamten DNA-Metabolismus (z.B. DNA-Replikation, Telomer-Erhalt, DNA-Reparatur) eine Rolle. Neben ihrem Vorkommen in Komplexen und regulatorischen Funktionen, haben RecQ-Homologe auch enzymatische Funktionen: Es sind 3'-5'-DNA-Helikasen, die eine Vielzahl von aberranten DNA-Strukturen auflösen können.

Letzteres wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal auch für zwei pflanzliche RecQ-Helikasen gezeigt. *AtRECQ2* und *AtRECQ3* konnten erfolgreich in Überexpressionsvektoren kloniert und in *E. coli* exprimiert werden. Die Aufreinigung der beiden Proteine über Ni-IMAC und Calmodulin-Affinitätschromatographie wurde optimiert. Der Erfolg der Aufreinigung - funktionelles Zielprotein ohne andere enzymatische Kontaminationen - konnte durch *AtRECQ2*-K117M und *AtRECQ3*-K64M kontrolliert werden (durch die Lysin zu Methionin Aminosäuresubstitutionen hatten diese Negativkontrollen kein Helikaseaktivitäten).

AtRECQ2 und *AtRECQ3* sind 3'-5' Helikasen mit einem Optimum bei pH 8 und 50 mM Kaliumacetat. Sie arbeiten, wie andere RecQ-Homologe auch, mit Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} aber nicht mit Zn^{2+} . Ebenso RecQ-typisch ist die DNA-abhängige ATP Hydrolyse.

Die Hypothese, dass es sich bei *AtRECQ2* und HsWRN (ohne Exonukleasefunktion) um funktionelle Homologe handelt, konnte in dieser Arbeit gefestigt werden: Im Gegensatz zu den anderen Homologen setzen *AtRECQ2* und HsWRN D-Loops mit der gleichen Präferenz um, und sie haben beide das weiteste (d)NTP-Nutzspektrum. Parallel aber nicht völlig abgrenzend von anderen RecQ-Homologen setzen *AtRECQ2* und HsWRN eine mobile Holliday-Junction und eine spezielle Replikationsgabel auf die gleiche Weise um.

Das ebenso in dieser Arbeit charakterisierte AtRECQ3 hebt sich deutlich von AtRECQ2 ab. Es kann erstens keinen partiellen Duplex mit 23 Basenpaaren und einem 3' Überhang von 23 Nukleotiden entwinden und braucht zweitens einen deutlich längeren 3' Überhang für den Umsatz eines 15-Basenpaar-Duplexes. Ebenso kann AtRECQ3 drittens die partiell mobile X12-Holliday-Junction und viertens die getestete Bubble-Struktur nicht auflösen.

D-Loops hingegen können auch von AtRECQ3 aufgelöst werden, jedoch wahrscheinlich mit einer unterschiedlichen Präferenz. Auch AtRECQ3 katalysiert einen Umsatz an der Replikationsgabel. Die katalysierte Reaktion wurde bisher für kein anderes RecQ-Homolog als Hauptreaktionsweg beobachtet. Sie bedarf einer genaueren Untersuchung in der Zukunft, könnte aber auf eine spezifische Funktion von AtRECQ3 hindeuten.

8. Summary

In this work two RecQ helicases from the plant model organism *Arabidopsis thaliana* were characterized biochemically. Therefore this work contributes notably to the basic research on RecQ-proteins – mainly to the understanding of the functional evolution and of the particularities of the plant RecQ-family.

RecQ helicases play an important role in the maintenance of the genomic stability. From the five RecQ helicases of humans, three can be related to severe genetic diseases – namely Bloom's-, Werner- and Rothmund-Thomson syndrome. Those are characterized by genomic instability. While there is just one RecQ homologue in *E. coli* and the baker's yeast, seven are present for *Arabidopsis thaliana* (AtRECQ1, -2, -3, -4A, -4B, -5 and AtRECQsim).

The precise function is not clear for any RecQ homologue. They are important for the whole DNA metabolism (e.g. replication and repair of DNA, maintenance of telomeres). Besides being part of complexes and having regulatory functions, RecQ homologues also have enzymatic functions: they are 3' to 5' DNA helicases, which are able to resolve a multitude of aberrant DNA structures.

The latter was shown in this work for the first time for two plant RecQ helicases. AtRECQ2 and AtRECQ3 were successfully cloned into overexpression vectors and expressed in *E. coli*. The purification of the two proteins by Ni-IMAC and calmodulin affinity chromatography was optimized. The success of the purification – which is functional protein of interest, without other enzymatic contaminations, – was controlled by AtRECQ2-K117M and AtRECQ3-K64M (these negative controls did not have helicase activity due to the lysine to methionine substitutions).

AtRECQ2 and AtRECQ3 are 3' to 5' helicases with an optimum at pH 8 and 50 mM of potassium acetate. They work, like the other RecQ homologues, with Mg²⁺, Mn²⁺ and Ca²⁺, but not with Zn²⁺. Typical for RecQ-helicases, they also show ATP hydrolysis that is dependent on DNA.

The hypothesis, that AtRECQ2 and HsWRN (without its exonuclease function) are functional homologues, could be consolidated in this work: in contrast to the other RecQ-homologues, AtRECQ2 and HsWRN don't show a preferential unwinding of different tested D-Loops and they both have the widest (d)NTP spectrum for hydrolysis coupled to unwinding. Also similar for both enzymes but not completely different from other RecQ-homologues, AtRECQ2 and HsWRN process a mobile Holliday junction and a special replication fork in the same manner.

AtRECQ3, also characterized in this work, is silhouetted against AtRECQ2. First, it can not disrupt a partial duplex with 23 base pairs and a 3' overhang of 23 nucleotides and second, it needs a significantly longer 3' overhang in order to disrupt a 15 base pair duplex. Third and forth it can not disrupt the partially mobile X12-Holliday junction or the tested bubble structure.

D-Loops, however, can be melted by AtRECQ3, probably with a different preference. AtRECQ3 catalyses also a transformation of the analyzed replication fork. The products of the catalyzed reaction were not shown to be main products for another RecQ-homologue. This reaction has to be further analyzed in the future. It may point to a function specific for AtRECQ3.

9. Résumé

Cette thèse comprend la caractérisation de deux hélicases de la famille RecQ d'un organisme modèle du règne végétal - *Arabidopsis thaliana*. C'est une contribution importante pour la recherche fondamentale concernant les hélicases RecQ – surtout pour comprendre l'évolution des fonctions de cette famille d'enzymes et la particularité des enzymes de ce règne.

Les hélicases RecQ jouent un rôle important dans la maintenance de la stabilité génomique. Des cinq hélicases RecQ de l'homme, trois sont liées à des maladies génétiques graves – le syndrome de Bloom, de Werner et de Rothmund-Thomson. Ces maladies sont caractérisées par l'instabilité du génome. Tandis qu'*E. coli* et *S. cerevisiae* ne possèdent qu'un seul homologue, il y en a sept pour *Arabidopsis thaliana* (AtRECQ1, -2, -3, -4A, -4B, -5 et AtRECQsim).

La fonction précise d'aucune des protéines homologues RecQ n'est connue jusqu'à présent. Elles sont impliquées dans l'ensemble du métabolisme de l'ADN (comme la réplication de l'ADN, le maintien des télomères et la réparation de l'ADN). En plus de leur présence dans des complexes protéiques et de leurs fonctions régulatrices, les homologues RecQ ont des fonctions enzymatiques : une fonction hélicase avec une directionalité de 3' à 5' qui permet de résoudre une multitude de structures d'ADN aberrants.

Ce dernier point a été démontré dans cette thèse pour la première fois pour des hélicases RecQ de plantes. AtRECQ2 et AtRECQ3 ont été clonées dans des vecteurs de surexpression et exprimées dans *E. coli* avec succès. La purification des deux protéines par Ni-IMAC et chromatographie d'affinité avec de la calmoduline a été optimisée. Le succès – la protéine fonctionnelle non contaminée par d'autres enzymes – a pu être contrôlé et démontré à l'aide d'AtRECQ2-K117M et AtRECQ3-K64M (ces contrôles négatifs n'ont pas d'activité hélicase du fait de la substitution de la lysine par la méthionine).

AtRECQ2 et AtRECQ3 sont des hélicases 3' à 5' avec un optimum à pH 8 et 50 mM d'acétate de potassium. Elles fonctionnent, comme les autres homologues RecQ, avec Mg^{2+} , Mn^{2+} et Ca^{2+} , mais pas avec Zn^{2+} . Comme les autres RecQ hélicases, elles hydrolysent également l'ATP de manière ADN-dépendante.

L'hypothèse de l'homologie fonctionnelle d'AtRECQ2 et HsWRN (sans sa fonction d'exonucléase) a pu être consolidée au cours de ce travail de thèse : contrairement aux autres homologues, AtRECQ2 et HsWRN démontrent la même spécificité pour les différentes structures D-Loops testées et toutes les deux ont le plus grand spectre d'utilisation des d(NTP)s. Un autre point sur lequel les deux protéines sont proches sans être complètement

différentes des autres homologues RecQ est qu'AtRECQ2 et HsWRN transforment une Holliday-Junction mobile et une fourche de réplication spéciale de manière équivalente.

La protéine AtRECQ3, caractérisée également au cours de cette thèse, se différencie d'AtRECQ2 sur différents aspects. Tout d'abord, AtRECQ3 ne peut pas dissocier un duplex partiel d'ADN comprenant 23 paires de bases et une extrémité 3' de 23 nucléotides de plus. AtRECQ3 a également besoin d'une extrémité 3' plus longue qu'AtRECQ2 pour transformer un duplex de 15 paires de bases. Enfin, AtRECQ3 ne peut pas dissocier une X12-Holliday-Junction et la structure « Bubble » étudiée.

Les D-Loops par contre peuvent être dissociées par AtRECQ3 mais probablement de manière préférentielle. AtRECQ3 catalyse également une transformation de la fourche de réplication analysée. Cette réaction n'a pas été observée comme transformation majeure d'un homologue RecQ. Elle nécessite une analyse plus détaillée, et pourrait indiquer une fonction spécifique pour AtRECQ3.

10. Referenzen

- Ahmad, S. I., Kirk, S. H. und Eisenstark, A. (1998). "Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes." Annu Rev Microbiol **52**: 591-625.
- Ahn, B., Harrigan, J. A., Indig, F. E., Wilson, D. M., 3rd und Bohr, V. A. (2004). "Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair." J Biol Chem **279**(51): 53465-74.
- Amor-Gueret, M. (2006). "Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis." Cancer Lett **236**(1): 1-12.
- Bachrati, C. Z. und Hickson, I. D. (2003). "RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging." Biochem J **374**(Pt 3): 577-606.
- Bachrati, C. Z., Borts, R. H. und Hickson, I. D. (2006). "Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase." Nucleic Acids Res **34**(8): 2269-79.
- Bagherieh-Najjar, M. B., de Vries, O. M., Kroon, J. T., Wright, E. L., Elborough, K. M., Hille, J. und Dijkwel, P. P. (2003). "Arabidopsis RecQsim, a plant-specific member of the RecQ helicase family, can suppress the MMS hypersensitivity of the yeast sgs1 mutant." Plant Mol Biol **52**(2): 273-84.
- Bagherieh-Najjar, M. B. (2004). "DNA recombination in plants - Molecular and functional analysis of *Arabidopsis thaliana*." Dissertation.
- Bagherieh-Najjar, M. B., de Vries, O. M., Hille, J. und Dijkwel, P. P. (2005). "Arabidopsis RecQ14A suppresses homologous recombination and modulates DNA damage responses." Plant J **43**(6): 789-798.
- Bartos, J. D., Wang, W., Pike, J. E. und Bambara, R. A. (2006). "Mechanisms by which Bloom protein can disrupt recombination intermediates of Okazaki fragment maturation." J Biol Chem **281**(43): 32227-39.
- Bateman, J. R. und Wu, C. T. (2007). "DNA replication and models for the origin of piRNAs." Bioessays **29**(4): 382-5.
- Beamish, H., Kedar, P., Kaneko, H., Chen, P., Fukao, T., Peng, C., Beresten, S., Gueven, N., Purdie, D., Lees-Miller, S., Ellis, N., Kondo, N. und Lavin, M. F. (2002). "Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM." J Biol Chem **277**(34): 30515-23.
- Bennett, R. J., Sharp, J. A. und Wang, J. C. (1998). "Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **273**(16): 9644-50.
- Bennett, R. J., Keck, J. L. und Wang, J. C. (1999). "Binding specificity determines polarity of DNA unwinding by the Sgs1 protein of *S. cerevisiae*." J Mol Biol **289**(2): 235-48.
- Bernstein, D. A. und Keck, J. L. (2003). "Domain mapping of *Escherichia coli* RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family." Nucleic Acids Res **31**(11): 2778-85.
- Bernstein, D. A., Zittel, M. C. und Keck, J. L. (2003). "High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core." Embo J **22**(19): 4910-21.
- Bernstein, D. A. und Keck, J. L. (2005). "Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain." Structure (Camb) **13**(8): 1173-82.
- Betterton, M. D. und Julicher, F. (2005). "Opening of nucleic-acid double strands by helicases: Active versus passive opening." Physical Review E **71**(1): 011904-1 bis 011904-11.
- Bjergbaek, L., Cobb, J. A., Tsai-Pflugfelder, M. und Gasser, S. M. (2005). "Mechanistically distinct roles for Sgs1p in checkpoint activation and replication fork maintenance." Embo J **24**(2): 405-17.

- Blackwell, J. R. und Horgan, R. (1991). "A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form." *FEBS Lett* **295**(1-3): 10-2.
- Boddy, M. N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W. D. und Russell, P. (2000). "Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1." *Mol Cell Biol* **20**(23): 8758-66.
- Brosh, R. M., Jr., Orren, D. K., Nehlin, J. O., Ravn, P. H., Kenny, M. K., Machwe, A. und Bohr, V. A. (1999). "Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A." *J Biol Chem* **274**(26): 18341-50.
- Brosh, R. M., Jr., Waheed, J. und Sommers, J. A. (2002). "Biochemical characterization of the DNA substrate specificity of Werner syndrome helicase." *J Biol Chem* **277**(26): 23236-45.
- Brosh, R. M., Jr. und Bohr, V. A. (2007). "Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases." *Nucleic Acids Res.*
- Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H. und Mazin, A. V. (2007). "Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase." *Genes Dev.*
- Chen, L., Huang, S., Lee, L., Davalos, A., Schiestl, R. H., Campisi, J. und Oshima, J. (2003). "WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair." *Aging Cell* **2**(4): 191-9.
- Cheng, W. H., Kusumoto, R., Opresko, P. L., Sui, X., Huang, S., Nicolette, M. L., Paull, T. T., Campisi, J., Seidman, M. und Bohr, V. A. (2006). "Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links." *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2751-60.
- Cheok, C. F., Wu, L., Garcia, P. L., Janscak, P. und Hickson, I. D. (2005). "The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA." *Nucleic Acids Res* **33**(12): 3932-41.
- Cobb, J. A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J. A. und Gasser, S. M. (2005). "Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations." *Genes Dev* **19**(24): 3055-69.
- Cogoni, C. und Macino, G. (1999). "Posttranscriptional gene silencing in Neurospora by a RecQ DNA helicase." *Science* **286**(5448): 2342-4.
- Comai, L. und Li, B. (2004). "The Werner syndrome protein at the crossroads of DNA repair and apoptosis." *Mech Ageing Dev* **125**(8): 521-8.
- Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J. K., Brosh, R. M., Bohr, V. A., Hickson, I. D. und West, S. C. (2000). "Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest." *EMBO Rep* **1**(1): 80-4.
- Cox, M. M. (2002). "The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination." *Mutat Res* **510**(1-2): 107-20.
- Crabbe, L., Jauch, A., Naeger, C. M., Holtgreve-Grez, H. und Karlseder, J. (2007). "Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7): 2205-10.
- Cromie, G. A., Millar, C. B., Schmidt, K. H. und Leach, D. R. (2000). "Palindromes as substrates for multiple pathways of recombination in Escherichia coli." *Genetics* **154**(2): 513-22.
- Davalos, A. R., Kaminker, P., Hansen, R. K. und Campisi, J. (2004). "ATR and ATM-dependent movement of BLM helicase during replication stress ensures optimal ATM activation and 53BP1 focus formation." *Cell Cycle* **3**(12): 1579-86.
- Davies, S. L., North, P. S., Dart, A., Lakin, N. D. und Hickson, I. D. (2004). "Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest." *Mol Cell Biol* **24**(3): 1279-91.

- De Felice, M., Aria, V., Esposito, L., De Falco, M., Pucci, B., Rossi, M. und Pisani, F. M. (2007). "A novel DNA helicase with strand-annealing activity from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*." Biochem J **408**(1): 87-95.
- Dennis, C., Fedorov, A., Kas, E., Salome, L. und Grigoriev, M. (2004). "RuvAB-directed branch migration of individual Holliday junctions is impeded by sequence heterology." Embo J **23**(12): 2413-22.
- Esteller, M. (2007). "Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome." Hum Mol Genet **16 Spec No 1**: R50-9.
- Frei, C. und Gasser, S. M. (2000). "RecQ-like helicases: the DNA replication checkpoint connection." J Cell Sci **113 (Pt 15)**: 2641-6.
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L. und Rothstein, R. (1994). "The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase." Mol Cell Biol **14**(12): 8391-8.
- Gangloff, S., Soustelle, C. und Fabre, F. (2000). "Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases." Nat Genet **25**(2): 192-4.
- Garcia, P. L., Liu, Y., Jiricny, J., West, S. C. und Janscak, P. (2004). "Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide." EMBO J **23**(14): 2882-91.
- Haber, J. E. (1999). "DNA recombination: the replication connection." Trends Biochem Sci **24**(7): 271-5.
- Hanada, K., Ukita, T., Kohno, Y., Saito, K., Kato, J. und Ikeda, H. (1997). "RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3860-5.
- Harmon, F. G. und Kowalczykowski, S. C. (1998). "RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination." Genes Dev **12**(8): 1134-44.
- Harmon, F. G., DiGate, R. J. und Kowalczykowski, S. C. (1999). "RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination." Mol Cell **3**(5): 611-20.
- Harmon, F. G. und Kowalczykowski, S. C. (2001). "Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the *Escherichia coli* RecQ helicase." J Biol Chem **276**(1): 232-43.
- Harrigan, J. A. und Bohr, V. A. (2003). "Human diseases deficient in RecQ helicases." Biochimie **85**(11): 1185-93.
- Hartung, F., Plchova, H. und Puchta, H. (2000). "Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res **28**(21): 4275-82.
- Hartung, F. und Puchta, H. (2006). "The RecQ gene family in plants." J Plant Physiol **163**(3): 287-96.
- Hartung, F., Suer, S., Bergmann, T. und Puchta, H. (2006). "The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRecQ4A." Nucleic Acids Res **34**(16): 4438-48.
- Hartung, F., Suer, S. und Puchta, H. (2007). "Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18836-18841.
- Heo, S. J., Tatebayashi, K., Ohsugi, I., Shimamoto, A., Furuichi, Y. und Ikeda, H. (1999). "Bloom's syndrome gene suppresses premature ageing caused by Sgs1 deficiency in yeast." Genes Cells **4**(11): 619-25.
- Hess, H. H. und Derr, J. E. (1975). "Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range." Anal Biochem **63**(2): 607-13.
- Heyer, W. D. (2004). "Damage signaling: RecQ sends an SOS to you." Curr Biol **14**(20): R895-7.

- Hishida, T., Han, Y. W., Shibata, T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H. und Shinagawa, H. (2004). "Role of the Escherichia coli RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks." *Genes Dev* **18**(15): 1886-97.
- Holmes, V. F., Benjamin, K. R., Crisona, N. J. und Cozzarelli, N. R. (2001). "Bypass of heterology during strand transfer by Saccharomyces cerevisiae Rad51 protein." *Nucleic Acids Res* **29**(24): 5052-7.
- Hu, J. S., Feng, H., Zeng, W., Lin, G. X. und Xi, X. G. (2005a). "Solution structure of a multifunctional DNA- and protein-binding motif of human Werner syndrome protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18379-84.
- Hu, Y., Lu, X., Barnes, E., Yan, M., Lou, H. und Luo, G. (2005b). "Recql5 and BLM RecQ DNA helicases have nonredundant roles in suppressing crossovers." *Mol Cell Biol* **25**(9): 3431-42.
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M. G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J. M., Barnes, E. L., Chi, P., Janscak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P. und Luo, G. (2007). "RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments." *Genes Dev*.
- Huber, M. D., Lee, D. C. und Maizels, N. (2002). "G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition." *Nucleic Acids Res* **30**(18): 3954-61.
- Humayun, M. Z. (1998). "SOS and Mayday: multiple inducible mutagenic pathways in Escherichia coli." *Mol Microbiol* **30**(5): 905-10.
- Ingleston, S. M., Sharples, G. J. und Lloyd, R. G. (2000). "The acidic pin of RuvA modulates Holliday junction binding and processing by the RuvABC resolvase." *Embo J* **19**(22): 6266-74.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. und Haber, J. E. (2003). "Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast." *Cell* **115**(4): 401-11.
- Irino, N., Nakayama, K. und Nakayama, H. (1986). "The recQ gene of Escherichia coli K12: primary structure and evidence for SOS regulation." *Mol Gen Genet* **205**(2): 298-304.
- Itaya, K. und Ui, M. (1966). "A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate." *Clin Chim Acta* **14**(3): 361-6.
- Janscak, P., Garcia, P. L., Hamburger, F., Makuta, Y., Shiraishi, K., Imai, Y., Ikeda, H. und Bickle, T. A. (2003). "Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the bloom syndrome protein." *J Mol Biol* **330**(1): 29-42.
- Johnson, F. B., Marciniak, R. A., McVey, M., Stewart, S. A., Hahn, W. C. und Guarente, L. (2001). "The Saccharomyces cerevisiae WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase." *Embo J* **20**(4): 905-13.
- Karow, J. K., Chakraverty, R. K. und Hickson, I. D. (1997). "The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase." *J Biol Chem* **272**(49): 30611-4.
- Karow, J. K., Constantinou, A., Li, J. L., West, S. C. und Hickson, I. D. (2000). "The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6504-8.
- Kawasaki, K., Maruyama, S., Nakayama, M., Matsumoto, K. und Shibata, T. (2002). "Drosophila melanogaster RECQ5/QE DNA helicase: stimulation by GTP binding." *Nucleic Acids Res* **30**(17): 3682-91.
- Kellermayer, R. (2006). "The versatile RECQL4." *Genet Med* **8**(4): 213-6.
- Khakhar, R. R., Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Hickson, I. D. und Gasser, S. M. (2003). "RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance." *Trends Cell Biol* **13**(9): 493-501.
- Killoran, M. P. und Keck, J. L. (2006). "Sit down, relax and unwind: structural insights into RecQ helicase mechanisms." *Nucleic Acids Res*.
- Kitano, K., Yoshihara, N. und Hakoshima, T. (2007). "Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN." *J Biol Chem* **282**(4): 2717-2728.

- Kowalczykowski, S. C. (2000). "Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication." *Trends Biochem Sci* **25**(4): 156-65.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., VILLEMAIN, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T. und Sung, P. (2003). "DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament." *Nature* **423**(6937): 305-9.
- Lämmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. und Candia, O. A. (1979). "An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate." *Anal Biochem* **100**(1): 95-7.
- Larizza, L., Magnani, I. und Roversi, G. (2006). "Rothmund-Thomson syndrome and RECQL4 defect: splitting and lumping." *Cancer Lett* **232**(1): 107-20.
- Lau, N. C., Seto, A. G., Kim, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Bartel, D. P. und Kingston, R. E. (2006). "Characterization of the piRNA complex from rat testes." *Science* **313**(5785): 363-7.
- Lee, J. W., Harrigan, J., Opresko, P. L. und Bohr, V. A. (2005). "Pathways and functions of the Werner syndrome protein." *Mech Ageing Dev* **126**(1): 79-86.
- Lee, J. Y., Kozak, M., Martin, J. D., Pennock, E. und Johnson, F. B. (2007). "Evidence that a RecQ helicase slows senescence by resolving recombining telomeres." *PLoS Biol* **5**(6): e160.
- Li, B., Conway, N., Navarro, S., Comai, L. und Comai, L. (2005). "A conserved and species-specific functional interaction between the Werner syndrome-like exonuclease atWEX and the Ku heterodimer in Arabidopsis." *Nucleic Acids Res* **33**(21): 6861-7.
- Lillard-Wetherell, K., Machwe, A., Llangland, G. T., Combs, K. A., Behbehani, G. K., Schonberg, S. A., German, J., Turchi, J. J., Orren, D. K. und Groden, J. (2004). "Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2." *Hum Mol Genet* **13**(17): 1919-32.
- Lillard-Wetherell, K., Combs, K. A. und Groden, J. (2005). "BLM helicase complements disrupted type II telomere lengthening in telomerase-negative sgs1 yeast." *Cancer Res* **65**(13): 5520-2.
- Liu, J. L., Rigolet, P., Dou, S. X., Wang, P. Y. und Xi, X. G. (2004). "The zinc finger motif of Escherichia coli RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding." *J Biol Chem* **279**(41): 42794-802.
- Liu, Z., Macias, M. J., Bottomley, M. J., Stier, G., Linge, J. P., Nilges, M., Bork, P. und Sattler, M. (1999). "The three-dimensional structure of the HRDC domain and implications for the Werner and Bloom syndrome proteins." *Structure* **7**(12): 1557-66.
- Lo, Y. C., Paffett, K. S., Amit, O., Clikeman, J. A., Sterk, R., Brennehan, M. A. und Nickoloff, J. A. (2006). "Sgs1 regulates gene conversion tract lengths and crossovers independently of its helicase activity." *Mol Cell Biol* **26**(11): 4086-94.
- Machwe, A., Xiao, L., Theodore, S. und Orren, D. K. (2002). "DNase I footprinting and enhanced exonuclease function of the bipartite Werner syndrome protein (WRN) bound to partially melted duplex DNA." *J Biol Chem* **277**(6): 4492-504.
- Machwe, A., Xiao, L., Groden, J., Matson, S. W. und Orren, D. K. (2005). "RecQ family members combine strand pairing and unwinding activities to catalyze strand exchange." *J Biol Chem* **280**(24): 23397-407.
- Machwe, A., Xiao, L., Groden, J. und Orren, D. K. (2006). "The werner and bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork." *Biochemistry* **45**(47): 13939-46.
- Machwe, A., Xiao, L., Lloyd, R. G., Bolt, E. und Orren, D. K. (2007). "Replication fork regression in vitro by the Werner syndrome protein (WRN): Holliday junction formation, the effect of leading arm structure and a potential role for WRN exonuclease activity." *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5729-5747.

- Macris, M. A., Krejci, L., Bussen, W., Shimamoto, A. und Sung, P. (2006). "Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome." DNA Repair **5**(2): 172-80.
- Magner, D. B., Blankschien, M. D., Lee, J. A., Pennington, J. M., Lupski, J. R. und Rosenberg, S. M. (2007). "RecQ promotes toxic recombination in cells lacking recombination intermediate-removal proteins." Mol Cell **26**(2): 273-86.
- Maizels, N. (2006). "Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1055-9.
- Mankouri, H. W. und Morgan, A. (2001). "The DNA helicase activity of yeast Sgs1p is essential for normal lifespan but not for resistance to topoisomerase inhibitors." Mech Ageing Dev **122**(11): 1107-20.
- Mankouri, H. W. und Hickson, I. D. (2007). "The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'?" Trends Biochem Sci.
- Matsuno, K., Kumano, M., Kubota, Y., Hashimoto, Y. und Takisawa, H. (2006). "The N-terminal noncatalytic region of Xenopus RecQ4 is required for chromatin binding of DNA polymerase alpha in the initiation of DNA replication." Mol Cell Biol **26**(13): 4843-52.
- Mazin, A. V., Zaitseva, E., Sung, P. und Kowalczykowski, S. C. (2000). "Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing." EMBO J **19**(5): 1148-56.
- Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Ui, A., Satoh, Y., Ohno, Y. und Enomoto, T. (2000). "Different domains of Sgs1 are required for mitotic and meiotic functions." Genes Genet Syst **75**(6): 319-26.
- Mohaghegh, P., Karow, J. K., Brosh Jr, R. M., Jr., Bohr, V. A. und Hickson, I. D. (2001). "The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases." Nucleic Acids Res **29**(13): 2843-9.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffler, S. und Hohn, B. (2004). "Interchromatid and interhomolog recombination in Arabidopsis thaliana." Plant Cell **16**(2): 342-52.
- Mueller, T. D., Kamionka, M. und Feigon, J. (2004). "Specificity of the interaction between ubiquitin-associated domains and ubiquitin." J Biol Chem **279**(12): 11926-36.
- Mullen, J. R., Kaliraman, V., Ibrahim, S. S. und Brill, S. J. (2001). "Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in Saccharomyces cerevisiae." Genetics **157**(1): 103-18.
- Mullen, J. R., Nallaseth, F. S., Lan, Y. Q., Slagle, C. E. und Brill, S. J. (2005). "Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex." Mol Cell Biol **25**(11): 4476-87.
- Muzzolini, L., Beuron, F., Patwardhan, A., Popuri, V., Cui, S., Niccolini, B., Rappas, M., Freemont, P. S. und Vindigni, A. (2007). "Different quaternary structures of human RECQ1 are associated with its dual enzymatic activity." PLoS Biol **5**(2): e20, 157-168.
- Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., Irino, N., Nakayama, Y. und Hanawalt, P. C. (1984). "Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of Escherichia coli K12: identification of a new mutation (recQ1) that blocks the RecF recombination pathway." Mol Gen Genet **195**(3): 474-80.
- Nakayama, H. (2005). "Escherichia coli RecQ helicase: a player in thymineless death." Mutat Res **577**(1-2): 228-36.
- Nakayama, K., Irino, N. und Nakayama, H. (1985). "The recQ gene of Escherichia coli K12: molecular cloning and isolation of insertion mutants." Mol Gen Genet **200**(2): 266-71.

- Nakayama, K., Kusano, K., Irino, N. und Nakayama, H. (1994). "Thymine starvation-induced structural changes in Escherichia coli DNA. Detection by pulsed field gel electrophoresis and evidence for involvement of homologous recombination." J Mol Biol **243**(4): 611-20.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-62.
- Oakley, T. J. und Hickson, I. D. (2002). "Defending genome integrity during S-phase: putative roles for RecQ helicases and topoisomerase III." DNA Repair (Amst) **1**(3): 175-207.
- Oganesyan, N., Ankoudinova, I., Kim, S. H. und Kim, R. (2007). "Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization." Protein Expr Purif **52**(2): 280-5.
- Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. und Enomoto, T. (2000). "Elevation of sister chromatid exchange in Saccharomyces cerevisiae sgs1 disruptants and the relevance of the disruptants as a system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene." Mutat Res **459**(3): 203-9.
- Opresko, P. L., Laine, J. P., Brosh, R. M., Jr., Seidman, M. M. und Bohr, V. A. (2001). "Coordinate action of the helicase and 3' to 5' exonuclease of Werner syndrome protein." J Biol Chem **276**(48): 44677-87.
- Opresko, P. L., Mason, P. A., Podell, E. R., Lei, M., Hickson, I. D., Cech, T. R. und Bohr, V. A. (2005). "POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates." J Biol Chem **280**(37): 32069-80.
- Orren, D. K., Brosh, R. M., Jr., Nehlin, J. O., Machwe, A., Gray, M. D. und Bohr, V. A. (1999). "Enzymatic and DNA binding properties of purified WRN protein: high affinity binding to single-stranded DNA but not to DNA damage induced by 4NQO." Nucleic Acids Res **27**(17): 3557-66.
- Orren, D. K., Theodore, S. und Machwe, A. (2002). "The Werner syndrome helicase/exonuclease (WRN) disrupts and degrades D-loops in vitro." Biochemistry **41**(46): 13483-8.
- Otterlei, M., Bruheim, P., Ahn, B., Bussen, W., Karmakar, P., Baynton, K. und Bohr, V. A. (2006). "Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest." J Cell Sci **119**(Pt 24): 5137-46.
- Ozgenç, A. und Loeb, L. A. (2005). "Current advances in unraveling the function of the Werner syndrome protein." Mutat Res **577**(1-2): 237-51.
- Özsoy, A. Z., Sekelsky, J. J. und Matson, S. W. (2001). "Biochemical characterization of the small isoform of Drosophila melanogaster RECQ5 helicase." Nucleic Acids Res **29**(14): 2986-93.
- Özsoy, A. Z., Ragonese, H. M. und Matson, S. W. (2003). "Analysis of helicase activity and substrate specificity of Drosophila RECQ5." Nucleic Acids Res **31**(5): 1554-64.
- Pereira, M., Mason, P., Szczesny, R. J., Maddukuri, L., Dziwura, S., Jedrzejczak, R., Paul, E., Wojcik, A., Dybczynska, L., Tudek, B., Bartnik, E., Klysik, J., Bohr, V. A. und Stepien, P. P. (2007). "Interaction of human SUV3 RNA/DNA helicase with BLM helicase; loss of the SUV3 gene results in mouse embryonic lethality." Mech Ageing Dev.
- Perry, J. J., Yannone, S. M., Holden, L. G., Hitomi, C., Asaithamby, A., Han, S., Cooper, P. K., Chen, D. J. und Tainer, J. A. (2006). "WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing." Nat Struct Mol Biol **13**(5): 414-22.

- Petkovic, M., Dietschy, T., Freire, R., Jiao, R. und Stagljar, I. (2005). "The human Rothmund-Thomson syndrome gene product, RECQL4, localizes to distinct nuclear foci that coincide with proteins involved in the maintenance of genome stability." *J Cell Sci* **118**(Pt 18): 4261-9.
- Plank, J. L., Wu, J. und Hsieh, T. S. (2006). "Topoisomerase III{alpha} and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11118-23.
- Plchova, H., Hartung, F. und Puchta, H. (2003). "Biochemical characterization of an exonuclease from *Arabidopsis thaliana* reveals similarities to the DNA exonuclease of the human Werner syndrome protein." *J Biol Chem* **278**(45): 44128-38.
- Ralf, C., Hickson, I. D. und Wu, L. (2006). "The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork." *J Biol Chem* **281**(32): 22839-22846.
- Rosenberg, N. L. (1987). "ATP as an alternative inhibitor of bacterial and endogenous nucleases and its effect on native chromatin compaction." *Mol Cell Biochem* **76**(2): 113-21.
- Saffi, J., Pereira, V. R. und Henriques, J. A. (2000). "Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* **37**(2): 75-8.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sangrithi, M. N., Bernal, J. A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W. G. und Venkitaraman, A. R. (2005). "Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome." *Cell* **121**(6): 887-98.
- Saydam, N., Kanagaraj, R., Dietschy, T., Garcia, P. L., Pena-Diaz, J., Shevelev, I., Stagljar, I. und Janscak, P. (2007). "Physical and functional interactions between Werner syndrome helicase and mismatch-repair initiation factors." *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5706-16.
- Sengupta, S., Shimamoto, A., Koshiji, M., Pedoux, R., Rusin, M., Spillare, E. A., Shen, J. C., Huang, L. E., Lindor, N. M., Furuichi, Y. und Harris, C. C. (2005). "Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase." *Oncogene* **24**(10): 1738-48.
- Sharma, S., Sommers, J. A., Choudhary, S., Faulkner, J. K., Cui, S., Andreoli, L., Muzzolini, L., Vindigni, A. und Brosh, R. M., Jr. (2005). "Biochemical analysis of the DNA unwinding and strand annealing activities catalyzed by human RECQ1." *J Biol Chem* **280**(30): 28072-28084.
- Sharma, S., Doherty, K. M. und Brosh, R. M., Jr. (2006). "Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability." *Biochem J* **398**(3): 319-37.
- Shen, J. C., Gray, M. D., Oshima, J. und Loeb, L. A. (1998). "Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A." *Nucleic Acids Res* **26**(12): 2879-85.
- Shida, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H. und Kyogoku, Y. (1996). "Characterization and comparison of synthetic immobile and mobile Holliday junctions." *J Biochem (Tokyo)* **119**(4): 653-8.
- Sinclair, D. A., Mills, K. und Guarente, L. (1997). "Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast sgs1 mutants." *Science* **277**(5330): 1313-6.
- Stofko-Hahn, R. E., Carr, D. W. und Scott, J. D. (1992). "A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase." *FEBS Lett* **302**(3): 274-8.
- Sun, H., Karow, J. K., Hickson, I. D. und Maizels, N. (1998). "The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA." *J Biol Chem* **273**(42): 27587-92.

- Swoboda, P., Gal, S., Hohn, B. und Puchta, H. (1994). "Intrachromosomal homologous recombination in whole plants." *Embo J* **13**(2): 484-9.
- Tripathi, V., Kaur, S. und Sengupta, S. (2007a). "Phosphorylation-dependent interactions of BLM and 53BP1 are required for their anti-recombinogenic roles during homologous recombination." *Carcinogenesis*.
- Tripathi, V., Nagarjuna, T. und Sengupta, S. (2007b). "BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination." *J Cell Biol* **178**(1): 9-14.
- Trowbridge, K., McKim, K., Brill, S. J. und Sekelsky, J. (2007). "Synthetic Lethality of *Drosophila* in the Absence of the MUS81 Endonuclease and the DmBlm Helicase Is Associated With Elevated Apoptosis." *Genetics* **176**(4): 1993-2001.
- Tuteja, N. und Tuteja, R. (2004). "Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function." *Eur J Biochem* **271**(10): 1849-63.
- Umez, K., Nakayama, K. und Nakayama, H. (1990). "Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5363-7.
- Vaitiekunaite, R., Butkiewicz, D., Krzesniak, M., Przybylek, M., Gryc, A., Snietura, M., Benedyk, M., Harris, C. C. und Rusin, M. (2007). "Expression and localization of Werner syndrome protein is modulated by SIRT1 and PML." *Mech Ageing Dev.*
- van Brabant, A. J., Ye, T., Sanz, M., German, I. J., Ellis, N. A. und Holloman, W. K. (2000). "Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase." *Biochemistry* **39**(47): 14617-25.
- van Houten, V., Denkers, F., van Dijk, M., van den Brekel, M. und Brakenhoff, R. (1998). "Labeling efficiency of oligonucleotides by T4 polynucleotide kinase depends on 5'-nucleotide." *Anal Biochem* **265**(2): 386-9.
- Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Nakagawa, T., Yoshimura, A., Otsuki, M., Kawabe, Y., Tada, S., Yagi, H., Ishii, Y. und Enomoto, T. (2003). "Functional relation among RecQ family helicases RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and sister chromatid exchange formation." *Mol Cell Biol* **23**(10): 3527-35.
- Watt, P. M., Louis, E. J., Borts, R. H. und Hickson, I. D. (1995). "Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo and is required for faithful chromosome segregation." *Cell* **81**(2): 253-60.
- Watt, P. M., Hickson, I. D., Borts, R. H. und Louis, E. J. (1996). "SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **144**(3): 935-45.
- Wu, L., Davies, S. L., Levitt, N. C. und Hickson, I. D. (2001). "Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51." *J Biol Chem* **276**(22): 19375-81.
- Wu, L. und Hickson, I. D. (2003). "The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination." *Nature* **426**(6968): 870-4.
- Wu, L., Bachrati, C. Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G. W. und Hickson, I. D. (2006). "BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(11): 4068-73.
- Wu, X. und Maizels, N. (2001). "Substrate-specific inhibition of RecQ helicase." *Nucleic Acids Res* **29**(8): 1765-71.
- Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y. und Ikeda, H. (1998). "Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast sgs1 mutant: implication for genomic instability in human diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8733-8.
- Yankiwski, V., Marciniak, R. A., Guarente, L. und Neff, N. F. (2000). "Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5214-9.

- Yin, J., Kwon, Y. T., Varshavsky, A. und Wang, W. (2004). "RECQL4, mutated in the Rothmund-Thomson and RAPADILINO syndromes, interacts with ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway." Hum Mol Genet **13**(20): 2421-30.
- Yu, J., Ha, T. und Schulten, K. (2004). "Conformational model of the Holliday junction transition deduced from molecular dynamics simulations." Nucleic Acids Res **32**(22): 6683-95.
- Zhang, R., Sengupta, S., Yang, Q., Linke, S. P., Yanaihara, N., Bradsher, J., Blais, V., McGowan, C. H. und Harris, C. C. (2005). "BLM helicase facilitates Mus81 endonuclease activity in human cells." Cancer Res **65**(7): 2526-31.

Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen (Botanik II) der Universität Karlsruhe (TH) in der Zeit vom September 2004 bis Dezember 2007 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung vom 21. Dezember 2001 (bzw. 15. Januar 2002) beachtet.

Datum, Ort

Daniela Kobbe

Lebenslauf

Daniela Claudia Kobbe

geboren am 20.03.1979 in Karlsruhe (Nationalität: deutsch)

- 1985-1989 Grundschule Aue I in Karlsruhe-Aue
- 1989-1998 Abitur am Markgrafen-Gymnasium in Karlsruhe-Durlach
Auszeichnungen für allgemein ausgezeichnete Leistung, Biologie, Französisch
- 1998-2000 Vordiplom in Biologie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
1999-2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Botanischen Institut I
- 2000-2003 Trinationaler Hauptstudiengang Diplom-Biotechnologie
als Kooperation der Universitäten in Basel, Freiburg, Karlsruhe und Straßburg
an der Ecole supérieure de Biotechnologie Strasbourg (ESBS)
2001 Praktikum am John Innes Centre (Prof. Dr. M. Bevan)
2002 Betriebspraktikum bei MicroMol GmbH (Dr. A. Dreusch)
2003 Diplomarbeit bei New England Biolabs (Dr. S.-Y. Xu):
 „Engineering type IIG restriction enzymes“
- 2003-2004 Europäisches Graduiertenkolleg „Pseudomonas: Pathogenicity and
Biotechnology“
- seit 2004 Doktorandin am Botanischen Institut II, Molekularbiologie und Biochemie der
Pflanzen der Universität Karlsruhe (TH) unter Prof. Dr. H. Puchta