

**Biochemische Charakterisierung der
MUS81-EME1A- und MUS81-EME1B-
Endonukleasekomplexe 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-Biologin Verena Geuting

aus Hamburg, Deutschland

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter
Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2008

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Puchta für die Möglichkeit der Promotion und für dieses sehr interessante und vielfältige Thema bedanken sowie für seine Bereitschaft, jederzeit neue Vorschläge, Fragestellungen und auch Probleme zu diskutieren.

Ausserdem bedanke ich mich für die Erfahrungen, die ich bei der Ausbildung und Betreuung von Biologielaboranten und Praktikanten sammeln durfte.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Tilman Lamparter, der die Aufgabe des Korreferenten übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Manfred Focke für die Betreuung, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft sowohl bei wissenschaftlichen als auch organisatorischen Arbeiten, seine vielen tollen Ideen und seinen riesigen Wissensschatz von dem ich sehr profitiert habe. Ausserdem möchte ich mich auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dipl. Biotechnol. Daniela Kobbe für die intensive Betreuung, ihre unzähligen Ratschläge und ihre Bereitschaft für strategische Diskussionen. Durch die Bearbeitung ähnlicher Fragestellungen kamen mir ihre wertvollen Erfahrungen sehr zu Gute.

Weiterhin danke ich der Biologielaborantin Frau Marion Förschle für die hervorragende und zuverlässige technische Unterstützung, ihre Hilfe und die tolle Zusammenarbeit während ihrer Ausbildung. Auch bei allen anderen wissenschaftlichen und technischen Kräften des Instituts Botanik II, im Speziellen der Biochemie-Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bedanken, die zu einer äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Insbesondere danke ich den Biologielaboranten-Auszubildenden Frau Carina Moock und Frau Ramona Bohnet, die mir nicht nur beim Gießen unzähliger Sequenziergele geholfen haben.

Besonders bei Frau Dipl. Biol. Stefanie Suer möchte ich mich sowohl für fachliche Diskussionen als auch eine schöne gemeinsame Zeit während der Doktorarbeit und darüber hinaus ganz herzlich bedanken. Auch Frau Dipl. Biol. Karin Fengler und Frau Dipl. Biol.

Anja Mannuß danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit und die vielen netten Gespräche. Frau Dipl. Biol. Kristina Wanieck sei gedankt für motivierende Gespräche und auch das Korrekturlesen dieses Manuskripts. Für einen reibungslosen Ablauf und die nette Atmosphäre danke ich ausserdem Frau Dipl. Biol. Sandra Blanck.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter Renate Geuting für ihre Unterstützung, die ständige Hilfsbereitschaft und Motivation während meiner gesamten Doktorarbeit und in allen Angelegenheiten darüber hinaus herzlich bedanken sowie bei meinem Bruder Markus Geuting und auch Verena Geyer.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Freunde, vor allem Dipl. Biol. Barbara Jung, Simone Dinser, Sandra Tuschel, Natalie Jilg und Steffen Gerber für den wertvollen Ausgleich, die Unterstützung und Motivation und dafür, dass sie immer da sind.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	II
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 DNA-Schäden und Reparatur.....	2
1.2 Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination.....	3
1.3 Nukleasen in der DNA-Reparatur	5
1.3.1 Holliday Junction-Resolvasen.....	6
1.3.2 FEN-1/XPG-Familie von Nukleasen	7
1.3.3 XPF/MUS81-Familie von Nukleasen	8
1.4 Die MUS81-Endonuklease.....	9
1.4.1 MUS81-Homologe in verschiedenen Organismen und ihre Funktion.....	10
1.4.2 Die MUS81-Endonuklease der Hefen.....	11
1.4.2.1 Genetische Analysen und Sensitivitätsstudien bei <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	12
1.4.2.2 Biochemische Analysen der MUS81-Endonuklease von <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	13
1.4.2.3 Meiotische Funktion der MUS81-Endonuklease in <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i> .	17
1.4.3 Die MUS81-Endonuklease in Säugetieren am Beispiel des Menschen und der Maus	20
1.4.3.1 Studien zur Funktionsaufklärung der MUS81-Endonuklease mit Säugetierzellkulturen	20
1.4.3.2 Untersuchungen am Maus-Modell.....	21
1.4.3.3 Biochemische Analysen der MUS81-Endonuklease des Menschen und der Maus	22
1.4.4 Die MUS81-Endonuklease und Krebs	23
1.4.5 Die MUS81-Endonuklease in der Fliege <i>Drosophila melanogaster</i>	24
1.4.6 Die MUS81-Endonuklease in <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
1.4.6.1 Funktionscharakterisierung der MUS81-Endonuklease von <i>A. thaliana</i>	26
1.4.6.2 Meiotische Funktion der MUS81-Endonuklease von <i>A. thaliana</i>	27
2. ZIEL DER ARBEIT.....	29
3. MATERIAL UND METHODEN.....	30

3.1	Material	30
3.1.1	Plasmide	30
3.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	30
3.1.3	Oligonukleotide.....	31
3.1.3.1	Primer für die Klonierung und Sequenzierung	31
3.1.3.2	Oligonukleotide für StrepII-Tag.....	32
3.1.3.3	Oligonukleotide für Endonuklease-Assays	32
3.1.4	Chemikalien	33
3.1.5	Marker, Enzyme und Kits	34
3.1.6	Verbrauchsmaterial	35
3.1.7	Ausgewählte Geräte und Software.....	35
3.1.8	Medien, Puffer und Lösungen.....	37
3.2	Methoden	40
3.2.1	Herstellung der Konstrukte, Klonierungen	40
3.2.1.1	<i>AtMUS81</i> in pETDuet-1.....	40
3.2.1.2	<i>AtMUS81(D470-471A)</i> in pETDuet-1	40
3.2.1.3	<i>AtEME1A</i> bzw. <i>AtEME1B</i> in pETDuet-1-MUS81 bzw. pETDuet-1-MUS81(D470-471A).....	41
3.2.1.4	Umklonierung: Austausch S-Tag durch StrepII-Tag	41
3.2.2	Expression und Proteinaufreinigungen	42
3.2.2.1	Expression	42
3.2.2.2	Aufreinigung	42
3.2.2.3	SDS-PAGE und Western-Blot	44
3.2.2.4	Proteinquantifizierung und -lagerung.....	45
3.2.3	Endonuklease-Assay	45
3.2.3.1	Prinzip	45
3.2.3.2	Herstellung der DNA-Substrate für den Endonuklease-Assay	45
3.2.3.3	Quantifizierung der DNA-Substrate.....	47
3.2.3.4	Durchführung und Auswertung des Endonuklease-Assays	49
4.	ERGEBNISSE	51
4.1	Klonierung der verwendeten <i>AtMUS81-EME1</i> -Konstrukte	51
4.2	Optimierung der Expression	53
4.3	Optimierung der Aufreinigung.....	54
4.4	Aufreinigung von <i>AtMUS81-EME1A</i> über Cu^{2+} -IMAC	55
4.4.1	Erhöhung der Imidazolkonzentration im Bindepuffer	56
4.4.2	Änderung des Elutionsgradienten	57
4.5	Aufreinigung von <i>AtMUS81-EME1A</i> über Cu^{2+} -IMAC mit anschließender Strep-Tactin-Chromatographie	58
4.6	Doppelaufreinigung von <i>AtMUS81-EME1B</i>	62
4.7	Quantifizierung der aufgereinigten Proteinproben	63
4.8	Nachweis der Endonukleaseaktivität	64

4.9	Assays mit dem 3'-Überhang-Substrat	65
4.9.1	Aktivitätsnachweis in Abhängigkeit des Aufreinigungsgrades	65
4.9.2	Aktivitätsnachweis nach der Cu ²⁺ -IMAC	65
4.9.3	Aktivitätsnachweis nach Doppelaффinitätschromatographie: Cu ²⁺ -IMAC und Strep-Tactin.....	65
4.9.4	Aktivitätsnachweis nach der Strep-Tactin-Chromatographie	66
4.9.5	Aktivitätsnachweis nach Doppelaффinitätschromatographie: Strep-Tactin und Cu ²⁺ -IMAC	67
4.9.6	Einfluss verschiedener Salze und ihrer Konzentrationen auf die AtMUS81-EME1A-Aktivität.....	67
4.9.7	Einfluss verschiedener Metallionen auf die AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Aktivität	68
4.9.8	Umsatz und Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte beim 3'-Überhang-Substrat.....	69
4.10	Assays mit den HJ- und nHJ-Substraten.....	71
4.10.1	Optimierung der Assaybedingungen für die HJ- und nHJ-Strukturen.....	72
4.10.2	Aktivitätsabgleich mit der nXO-1	72
4.10.3	Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die Enzymaktivität bei HJ-Strukturen	73
4.10.3.1	Substratumsatz	73
4.10.3.2	Produkte der endonukleolytischen Aktivität	75
4.10.4	Einfluss von MnCl ₂ auf die Enzymaktivität.....	76
4.10.5	Umsatz von HJ und nHJ als Funktion der Zeit	76
4.10.5.1	Umsatz und Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte der nHJ (nXO)	78
4.10.5.2	Umsatz und Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte der HJ (XO)	79
5.	DISKUSSION	84
5.1	Klonierung der AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Konstrukte.....	84
5.2	Optimierung der Expression	86
5.3	Optimierung der Aufreinigung mit AtMUS81-EME1A.....	86
5.4	Nachweis der Endonukleaseaktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B	90
5.5	Reaktionsbedingungen.....	90
5.6	Einfluss von Salzen.....	91
5.7	Einfluss divalenter Metallionen	92
5.8	Umsatz des 3'-Überhang-Substrates	93
5.9	Umsatz der HJ-Strukturen.....	95
5.10	Aktivitätsabgleich mit der nHJ und Optimierung der Assaysbedingungen für die HJ-Substrate	97

5.11 Einfluss divalenter Metallionen auf die Enzymaktivität und die Konformation der HJ	98
5.12 Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte bei den HJ-Strukturen.....	100
6. AUSBLICK.....	103
7. ZUSAMMENFASSUNG	105
8. SUMMARY	107
9. REFERENZEN	109
ERKLÄRUNG.....	115
LEBENS LAUF	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der homologen DSB-Reparatur nach Szostak <i>et al.</i> (1983) und des Synthesis-Dependent Strand-Annealing (SDSA).....	5
Abbildung 2: Substrate der MUS81-Endonukleasekomplexe der Hefen <i>S. pombe</i> und <i>S. cerevisiae</i>	15
Abbildung 3: Funktion der MUS81-Endonuklease aus Hefe bei der Reparatur von kollabierten und stehengebliebenen Replikationsgabeln.....	16
Abbildung 4: Modelle der homologen Rekombinationsreparatur eines DSB.....	19
Abbildung 5: Substrate der MUS81-Endonuklease des Menschen und der Maus.....	23
Abbildung 6: Schematische Struktur des MUS81-Proteins von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
Abbildung 7: Struktur und Sequenz der DNA-Substrate.....	46
Abbildung 8: Überblick und schematische Darstellung der Schritte zur Substratherstellung und für den Endonuklease-Assay.....	50
Abbildung 9: Einfluss von Glukose auf die Expression und die Löslichkeit von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B.....	54
Abbildung 10: Einfluss der Imidazolkonzentration im Bindepuffer auf die Elution von AtMUS81-EME1A bei der Cu ²⁺ -IMAC.....	56
Abbildung 11: Analyse der Elutionsfraktionen von AtMUS81-EME1A der Cu ²⁺ -IMAC.....	57
Abbildung 12: Einfluss des Elutionsgradienten und der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer auf die Reinheit von AtMUS81-EME1A während der Cu ²⁺ -IMAC.....	58
Abbildung 13: Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1A mittels Cu ²⁺ -IMAC und Strep-Tactin Superflow an der Flüssigchromatographie-Anlage.....	60
Abbildung 14: Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1A mittels Cu ²⁺ -IMAC und Strep-Tactin Superflow Schwerkraftsäule.....	61
Abbildung 15: Strep-Tactin Chromatographie von AtMUS81-EME1A.....	61
Abbildung 16: Analyse der Elutionsfraktionen von AtMUS81-EME1A-Doppelaufreinigung (Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC).....	62
Abbildung 17: Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1B (Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC).....	63
Abbildung 18: Proteinquantifizierung von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B.....	63
Abbildung 19: Aktivitätsnachweis von AtMUS81-EME1A nach der Doppelaффinitätschromatographie mit Cu ²⁺ -IMAC und Strep-Tactin.....	66

Abbildung 20: Aktivitätsnachweis von AtMUS81-EME1A nach der Doppelaффinitätschromatographie mit Strep-Tactin und Cu ²⁺ -IMAC.....	67
Abbildung 21: Einfluss verschiedener Salze auf die Aktivität von AtMUS81-EME1A.....	68
Abbildung 22: Einfluss verschiedener Metallcofaktoren auf die Aktivität von AtMUS81- EME1A und AtMUS81-EME1B.....	69
Abbildung 23: Umsatz des 3'-Überhang-Substrates von AtMUS81-EME1A und AtMUS81- EME1B im Verlauf der Zeit (Sequenziergel).....	70
Abbildung 24: Prozentualer Anteil der Schnittprodukte vom Gesamtprodukt beim 3'- Überhang.....	70
Abbildung 25: Aktivitätsabgleich von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B mit der nXO-1.....	73
Abbildung 26: Einfluss der Cofaktorkonzentration auf den Substratumsatz von AtMUS81- EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO-1 und nXO-1.....	74
Abbildung 27: Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die Aktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO-1 und nXO-1.....	75
Abbildung 28: Umsatz der XO-1 und nXO-1 von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B im Verlauf der Zeit (Sequenziergel).....	77
Abbildung 29: Prozessierung der nXO-1.....	78
Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Schnittprodukte vom Gesamtprodukt bei der nXO-1.....	79
Abbildung 31: Prozessierung der XO-1.....	80
Abbildung 32: Umsatz der XO-2/-3/-4 von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B im Verlauf der Zeit (Sequenziergel).....	80
Abbildung 33: Prozentualer Anteil der Schnittprodukte bei der XO.....	81
Abbildung 34: Schnittstellen von AtMUS81-EME1A bei der XO.....	81
Abbildung 35: Schnittstellen von AtMUS81-EME1B bei der XO.....	82
Abbildung 36: Wege der DSB-Reparatur.....	93
Abbildung 37: Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B beim 3'-Überhang.....	95
Abbildung 38: Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der nXO.....	100
Abbildung 39: Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO.....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Homologe der Endonukleasekomplexe der XPF/MUS81-Familie und ihre heterodimere Assoziation.....	8
Tabelle 2:	Gegenüberstellung der Bedeutung des MUS81-Endonukleasekomplexes in der Meiose von <i>S. pombe</i> und <i>S. cerevisiae</i>	18
Tabelle 3:	Übersicht über die in dieser Arbeit für Endonuklease-Assays verwendeten Oligonukleotide.....	32
Tabelle 4:	Herstellung der DNA-Substrate.....	46
Tabelle 5:	Konstrukte.....	51
Tabelle 6:	Eigenschaften aller Proteine und Proteinkomplexe.....	52
Tabelle 7:	Verwendete Proteinfraktionen und -Pools für die Endonuklease-Assays.....	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat
BS	Bloom`s Syndrom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CO	Cross-over
CPT	Camptothecin
CS	Cockayne Syndrom
D	Aspartat
Da/ kDa	Dalton/ kiloDalton
dHJ	doppelte Holliday Junction
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DPM	decays per minute
ds	Doppelstrang
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure-Tetranatriumsalz
FA	Fanconi Anämie
HCC	hepatocelluläres Carcinom
HhH	Helix-hairpin-Helix
His	Histidin
HJ	Holliday Junction
HR	homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
ICL	Interstrand-Cross-Link = Quervernetzungen komplementärer DNA-Stränge
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
KV	Kristallviolett
LSC	Liquid Scintillation Counter = Liquid Scintillation Analyzer
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MMC	Mitomycin C

MMS	Methylmethansulfonat
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	non-homologous end-joining = nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung
nHJ	nicked Holliday Junction = genickte Holliday Junction
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame = offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PNK	Polynukleotid-Kinase
PPR	Post-Replikative-Reparatur
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RTS	Rothmund-Thomson Syndrom
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDSA	Synthesis-Dependent Strand Annealing
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ss	Einzelstrang
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
UPM	Umdrehungen pro Minute
WS	Werner`s Syndrom
XP	Xeroderma Pigmentosum

1. Einleitung

Eine Voraussetzung für die Funktion eines Organismus und die Weitergabe der genetischen Information an seine Nachkommen ist, die genomische Stabilität und Integrität zu bewahren. Die DNA kann sowohl durch externe als auch interne Faktoren, wie z. B. UV- und ionisierende Strahlung oder zelluläre Prozesse geschädigt werden. Eine Anhäufung von DNA-Schäden kann zur Beeinträchtigung von Transkription und Replikation führen. Insbesondere können einige DNA-Schäden die Entstehung aberranter Chromosomenstrukturen induzieren, was eine Missegregation von Chromosomen zur Folge hat. Um diesen Schäden entgegenzuwirken und die genomische Integrität zu bewahren, haben alle Organismen ein komplexes Netzwerk aus Signaltransduktionswegen und DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, an denen eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind (Tuteja *et al.*, 2001; Übersicht in Ciccio *et al.*, 2008). Defekte in einem dieser Reparaturmechanismen können beim Menschen eine Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen auslösen, wie Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne-Syndrom (CS), Rothmund-Thomson-Syndrom (RTS), als auch Werner- (WS) und Bloom (BS)-Syndrom. All diese Erkrankungen sind mit genomischer Instabilität und einer Prädisposition für Krebs assoziiert (de Boer und Hoeijmakers, 2000).

Die meisten Erkenntnisse über die Mechanismen der DNA-Reparatur wurden in Bakterien, Hefen und Säugetieren gemacht, aber auch in Pflanzen, vor allem *Arabidopsis thaliana*, gibt es Fortschritte in der Untersuchung entsprechender Reparaturmechanismen und es können zunehmend neue Erkenntnisse erzielt werden (Britt, 1999).

Bestimmte Reparaturwege unterstützen die Schadenserkennung, gefolgt von der Beseitigung der DNA-Schäden, die im Allgemeinen durch nukleolytische Aktivität an den DNA-Strängen begleitet ist. Es existiert eine Vielzahl von Nukleasen, die DNA sowohl von ihren Enden her oder von Strangbrüchen aus abbauen können (Exonukleasen), als auch in Regionen innerhalb von einzelsträngiger (ss) oder doppelsträngiger (ds) DNA schneiden können (Endonukleasen) (Übersicht in Ciccio *et al.*, 2008).

Ein in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* erstmals identifiziertes Protein, welches durch die Interaktion mit der Replikations-Checkpoint-Kinase CDS1 entdeckt wurde, ist die MUS81-Endonuklease (Boddy *et al.*, 2000). Diesem Protein, das bereits bei Säugetieren und Hefen charakterisiert wurde, wird eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden und Replikationsgabeln sowie in der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten zugeschrieben. Es konnte auch ein Homolog der MUS81-Endonuklease im Genom von

Arabidopsis thaliana gefunden werden, allerdings ist über die biochemische Aktivität dieses Proteins bislang noch nichts bekannt. In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften und die Funktionsweise der AtMUS81-Endonuklease gewonnen.

1.1 DNA-Schäden und Reparatur

DNA-Moleküle sind ständig physikalischem und chemischem Stress endogenen oder exogenen Ursprungs ausgesetzt. UV- und ionisierende Strahlung, alkylierende Agenzien und freie Radikale können spontane Veränderungen in der DNA-Sequenz, wie z. B. chemische Modifikationen oder den Falscheinbau nicht komplementärer Basen während der Replikation, sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche, verursachen. Zudem können essentielle zelluläre Prozesse, wie die Replikation blockiert, werden. Die Zelle antwortet auf solche Schäden der DNA mit einem Zellzyklusarrest, welcher Zeit für die Reparatur bietet. Falls diese spontanen oder induzierten Veränderungen der DNA nicht behoben werden, würde dies relativ schnell zum Replikationsabbruch führen oder die Nukleotidsequenz verändern, was zum Funktionsverlust essentieller Enzyme oder Strukturproteine führen kann. Dies stellt ein signifikantes Risiko für die Zelle dar. Um diese potentiell schädlichen Auswirkungen der Mutationen zu verhindern, entwickelten sich in der Evolution effiziente DNA-Reparaturmechanismen (Buchanan *et al.*, 2000).

Einige der wichtigsten Mechanismen zur Reparatur von Basenschäden sind die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und die Post-Replikative-Reparatur (PPR) und zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen oder strukturellen Schäden die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ).

Die NER beispielsweise erkennt und repariert viele verschiedene Schäden in der DNA wie z. B. UV-induzierte Pyrimidin-Dimere und unförmige Basenaddukte, indem ein Oligonukleotidfragment von ~24-30 Nukleotiden der beschädigten DNA herausgeschnitten wird. Das Krankheitsbild Xeroderma Pigmentosum (XP) und auch das Cockayne Syndrom (CS) sind auf eine Mutation in einem der Gene des NER-Reparaturweges zurückzuführen (Hoeijmakers, 2001).

Doppelstrangbrüche (DSBs), welche z. B. durch ionisierende Strahlung oder kollabierte Replikationsgabeln verursacht werden, werden durch homologe Rekombination (HR) oder nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) repariert, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Der NHEJ-Mechanismus benötigt keine oder nur geringe Sequenzhomologien und ist oft von Deletionen und Insertionen begleitet (Puchta, 2004). In somatischen

Pflanzenzellen beispielsweise überwiegt der Mechanismus der NHEJ, welcher zu jeder Zeit des gesamten Zellzyklus aktiv und nicht auf bestimmte Zellphasen beschränkt ist (Tuteja *et al.*, 2001; Hoeijmakers, 2001).

Auf die Mechanismen der homologen Rekombinationsreparatur wird in den folgenden Kapiteln detailliert eingegangen, nachdem das Grundprinzip der HR erläutert wurde.

1.2 Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination

Genetische Rekombination spielt eine wichtige Rolle in der Evolution. Die Neukombinierung von DNA-Sequenzen und die Eliminierung schädlicher Genvarianten ermöglicht die Entstehung neuer Phänotypen (Buchanan *et al.*, 2000).

In den meisten Organismen ist für eine erfolgreiche meiotische Teilung eine vollständige Paarung (Synapsis) und Segregation der homologen Chromosomen eine essentielle Voraussetzung. Dabei findet über HR ein Austausch von genetischer Information zwischen den Homologen statt, wofür zunächst durch das Protein SPO11, dem Homolog zur Untereinheit A der Topoisomerase 6 aus Archaeobakterien, regelmäßig und gezielt DSBs induziert werden. Dabei kann es zur Bildung von Cross-overs (COs) kommen, so dass Gene neu kombiniert werden (Hartung und Puchta, 2001; Britt, 1999).

Das Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)-Modell zur Erklärung der homologen Rekombinationsreaktionen wurde zu Beginn der achtziger Jahre für meiotische Rekombinationsvorgänge in Hefe entwickelt (Szostak *et al.*, 1983).

Bei diesem klassischen DSBR-Modell nach Szostak *et al.* (1983) werden die 5'-Enden beiderseits des Bruchs nukleolytisch abgebaut, so dass einzelsträngige 3'-Enden entstehen. Beide 3'-Enden interagieren gleichzeitig mit homologen Sequenzen des Donormoleküls, so dass ein D-Loop-Intermediat ausgebildet wird. Die anschließende DNA-Synthese verlängert die invadierten Stränge und führt schließlich zur Ausbildung einer überkreuzten DNA-Struktur, der sogenannten doppelten Holliday Junction (dHJ) (Hollingsworth und Brill, 2004). Je nach Art der Auflösung dieser Zwischenstrukturen kann es entweder zu einem CO, dem Austausch von benachbarten DNA-Sequenzen, oder zu einem Konversionsereignis, dem nicht-reziproken Transfer genetischer Information, kommen (Abbildung 1A). Die Auflösung der Holliday Junctions erfolgt durch HJ-Resolvasen, welche strukturspezifische Endonukleasen darstellen, die koordinierte Einzelstrangschnitte in der Überkreuzungsstelle einführen (Übersicht in Paques und Haber, 1999).

Neben dem erstbeschriebenen DSBR-Modell zeigten weitere Untersuchungen jedoch, dass es Rekombinationsreparaturereignisse gibt, beschrieben durch das sogenannte „Synthesis-

Dependent Strand Annealing“-Modell (Nassif *et al.*, 1994), bei denen es nicht zur Bildung von COs kommt. Dieses neue Modell der DSBR (Abbildung 1B) beschreibt, dass die Invasion beider Enden des Bruchs unabhängig voneinander erfolgt oder, dass sogar nur eines der beiden Enden das Donormolekül invadiert, wie es in Abbildung 1B dargestellt ist (Puchta, 1999). Nach der Induktion eines Doppelstrangbruches im Akzeptormolekül werden einzelsträngige 3'-Enden mittels Exonuklease-katalysierter Reaktion produziert. Eines der beiden freien 3'-Enden invadiert nun das doppelsträngige Donormolekül und formt ein D-Loop-Intermediat, von welchem ausgehend die Reparatursynthese erfolgt. Der neu synthetisierte DNA-Strang wird dann von der Matrize verdrängt. Die weitere Prozessierung dieser Intermediate erfolgt entweder durch Annealing beider 3'-Enden des DSB im Falle von homologen Sequenzen oder durch illegitime Rekombination, wenn das invadierende 3'-Ende nicht komplementär zum anderen 3'-Ende des DSB ist. Es kommt hierbei nicht zur Ausbildung von HJs (Puchta, 2004; Nassif *et al.*, 1994).

Die meisten Erkenntnisse, die zum Verständnis der homologen Rekombination beigetragen haben, stammen aus Untersuchungen bakterieller Proteine, wie z. B. dem HJ Branch-Migration-Komplex RUVAB und der HJ-Resolvasen RUVK und RUSA. Bisher sind allerdings noch keine eukaryotischen Homologe zu RUVAB und RUVK bekannt. In den letzten Jahren ist jedoch erstmals in *Schizosaccharomyces pombe* (Boddy *et al.*, 2000), in *Saccharomyces cerevisiae* (Interthal und Heyer, 2000) und in *Homo sapiens* (Chen *et al.*, 2001), sowie *Mus musculus* (Abraham *et al.*, 2003) und *Drosophila melanogaster* (Johnson-Schlitz und Engels, 2006) das Protein MUS81 beschrieben worden. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle für das normale Zellwachstum, die Reparatur blockierter Replikationsgabeln und meiotische Rekombinationsprozesse (Übersicht in Haber und Heyer, 2001).

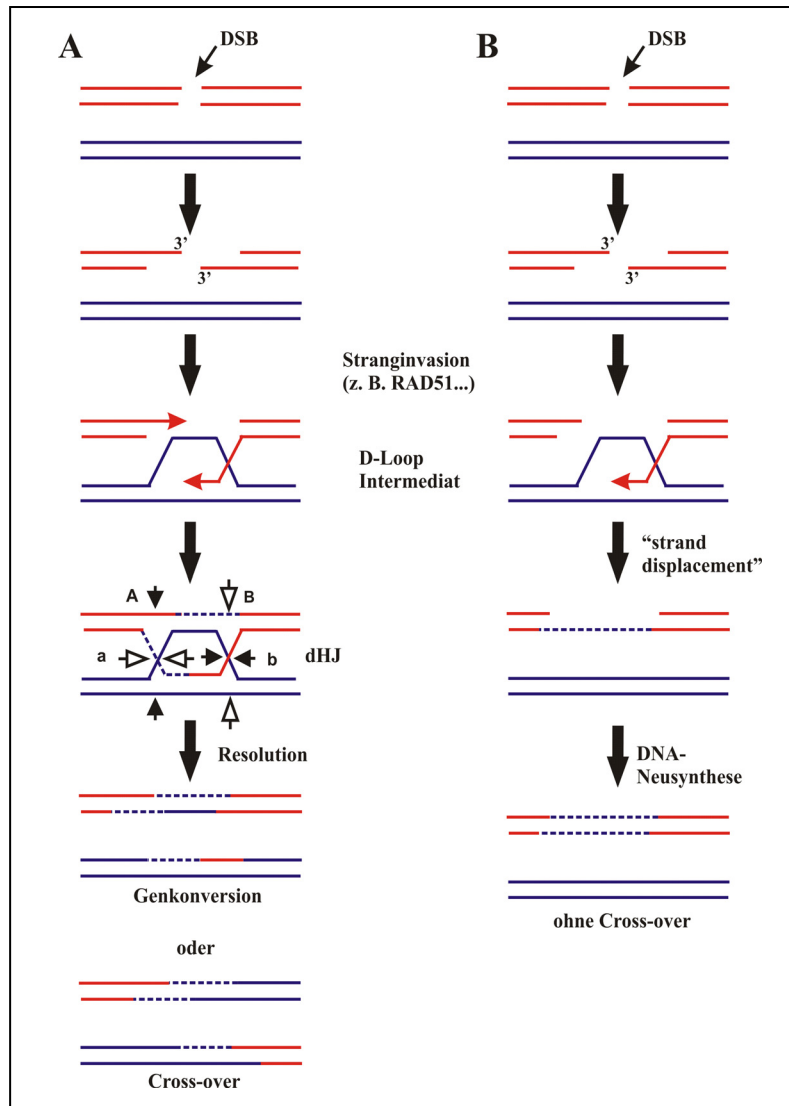


Abbildung 1: Mechanismus (A) der homologen DSB-Reparatur nach Szostak *et al.* (1983) und (B) des Synthesis-Dependent Strand-Annealing (SDSA). A, Die durch Resektion entstandenen 3'-Enden des DSB sind rekombinogen und können in den homologen Strang invadieren, um eine neue DNA-Synthese zu initiieren. Es kommt zur Ausbildung einer doppelten Holliday Junction (dHJ), die auf zwei unterschiedliche Arten aufgelöst werden kann. Die Resolution der dHJ in gegenüberliegender Orientierung (A+b oder a+B) führt zur Bildung von COs, die Resolution in gleicher Orientierung (A+B oder a+b) führt zur Genkonversion. B, Nach der Bildung des D-Loop-Intermediats durch Stranginvasion wird der jeweilige neu synthetisierte DNA-Strang (unterbrochene Linien) von der Matrize verdrängt („strand displacement“) und kann mit dem anderen Ende des DSB annealen. Es kommt nicht zur Bildung von COs. Dies stellt den Mechanismus der Doppelstrangbruchreparatur in somatischen Pflanzenzellen dar. (Übersicht in Paques und Haber, 1999; Puchta, 1999; Puchta 2004).

1.3 Nukleasen in der DNA-Reparatur

Nukleasen spielen entscheidende Rollen bei der Replikation sowie bei den verschiedensten DNA-Reparaturprozessen, wie z. B. der Doppelstrangbruchreparatur oder Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Während der Replikation oder Doppelstrangbruchreparatur neigt die DNA dazu irreguläre Strukturen auszubilden, wie z. B. überkreuzte und verzweigte

Strukturen oder so genannte Loops. Diese irregulären Zwischenstrukturen müssen jedoch wieder aufgelöst werden, um z. B. chromosomale oder genomische Schäden zu vermeiden (Nishino *et al.*, 2006). Nukleasen können als „molekulare Scheren“ bezeichnet werden, welche die Phosphodiesterbindungen zwischen dem Zucker und dem Phosphat der DNA hydrolysieren, was zur Bildung von 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl-Enden führt. Die Nukleasen beinhalten konservierte, minimale Motive, die gewöhnlich saure Aminosäurereste aufweisen und das aktive Zentrum ausbilden. Diese Aminosäurereste koordinieren die Bindung katalytisch essentieller divalenter Kationen.

In Abhängigkeit davon, ob am Ende oder innerhalb der DNA geschnitten wird, werden die DNA-Nukleasen als Exo- oder Endonukleasen klassifiziert. Endonukleasen können weiter in sequenz- oder strukturspezifische Endonukleasen eingeteilt werden. Strukturspezifische Endonukleasen werden aufgrund der von ihnen bevorzugten DNA-Substrate klassifiziert und unterscheiden sich somit deutlich von sequenzspezifischen Nukleasen, wie z.B. den Restriktionsenzymen (Übersicht in Nishino und Morikawa, 2002 und in Ciccina *et al.*, 2008). Obwohl die strukturspezifischen Endonukleasen im Vergleich zu anderen Enzymen in ihrer Primärstruktur stark voneinander abweichen, weisen sie eine konservierte Tertiärstruktur auf. In diese Kategorie fallen hauptsächlich strukturspezifische Nukleasen folgender Familien: HJ-Resolvasen, FEN-1/XPG-Familie von Nukleasen und die XPF/MUS81-Familie von Nukleasen. Sie erkennen jene DNA-Strukturen, die eine doppelsträngige oder einzelsträngige DNA-Abzweigung von einem doppelsträngigen DNA-Molekül aufweisen, wie z.B. HJs, Replikationsgabeln und Überhang-Strukturen (Nishino *et al.*, 2006).

1.3.1 Holliday Junction-Resolvasen

HJ-Resolvasen sind strukturselektive Nukleasen, welche 4-fach verzweigte DNA-Strukturen erkennen und koordinierte, bilateral symmetrische Einzelstrangbrüche innerhalb der HJ erzeugen, um sie in zwei individuelle Duplexe aufzulösen (Übersicht in Lilley und White, 2001; Whitby und Dixon, 1998). Die HJ stellt eines der wichtigsten Intermediate der genetischen Rekombination und der Rekombinationsreparatur in der Zelle dar (Liu und West, 2004). In Modellen der meiotischen Rekombination sind HJs CO-Strukturen, welche die homologen Chromosomen verbinden. In mitotischen Zellen werden HJs während der Reparatur kollabierter oder bei der Regression stehengebliebener Replikationsgabeln gebildet (Seigneur *et al.*, 1998). In diesen Situationen stellen HJs eine physische Verbindung zwischen DNA-Strängen dar, welche aufgelöst werden müssen, um eine Segregation der Chromosomen zu ermöglichen. Dieser Prozess wird von HJ-Resolvasen durchgeführt. Einige Vertreter dieser

Familie sind die Endonukleasen I und VII aus den Bakteriophagen T4 bzw. T7, RUVB und RUSA von *Escherichia coli* sowie die archaebakteriellen Resolvasen HJC und HJE. In Hefen sind die beiden mitochondrialen Proteine CCE1 und YDC2 bekannt (Whitby und Dixon, 1998; White und Lilley, 1997). Eine nukleare HJ-Resolvase in Eukaryoten konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Strukturanalysen ermöglichten eine weitere Einteilung der bekannten Proteine, entsprechend der Faltung ihres aktiven Zentrums. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Resolvasen Homodimere ausbilden, was die Positionierung zweier aktiver Zentren zur Auflösung der 4-fach überkreuzten DNA-Strukturen erleichtert. Eine weitere Eigenschaft, die alle Resolvasen aufweisen, ist ihre Fähigkeit die Struktur der HJ während ihrer Bindung zu verzerren (Giraud-Panis und Lilley, 1998; Übersicht in Aravind *et al.*, 2000 und in Heyer *et al.*, 2003).

E. coli besitzt neben der RUVB HJ-Resolvase, welche durch Interaktion mit dem HJ-Branch-Migration Komplex RUVAB HJ-Strukturen auflösen kann, noch eine weitere Resolvase, das RUSA Protein. RUSA stammt ursprünglich aus dem Phagen Lambda und ist der kleinste Vertreter der Familie der HJ-Resolvasen. Das Protein bindet die HJ ebenfalls in dimerer Form. Untersuchungen einer mutierten Proteinform von RUSA mit einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum bestätigen die Notwendigkeit saurer Aminosäurereste für die DNA-Restriktionsaktivität. Die Restriktionsreaktion ist, wie bei allen nukleolytisch aktiven Enzymen, abhängig von divalenten Metallionen, wie Mg^{2+} und Mn^{2+} , welche koordinative Bindungen mit den sauren Aminosäureresten des katalytischen Zentrums eingehen und gleichzeitig mit den Wassermolekülen in Wechselwirkung treten (Giraud-Panis und Lilley, 1998).

1.3.2 FEN-1/XPG-Familie von Nukleasen

Die strukturspezifische Nuklease FEN-1 (Flap-endonuclease 1) ist ein multifunktionelles Protein, welches in die Replikation und die DNA-Reparatur involviert ist. FEN-1 ist einerseits bei der Entfernung der RNA-Primer (Okazaki-Fragmente) im diskontinuierlichen Strang der Replikationsgabel als auch bei der Prozessierung von 5'-Überhängen der DNA am Verzweigungspunkt von Rekombinationsintermediaten beteiligt. Zusätzlich besitzt dieses Protein eine 5'-3' Exonukleaseaktivität (Shen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006;). Die verwandte Nuklease XPG (Xeroderma pigmentosum gene G) spielt eine Rolle in der eukaryotischen Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) (de Boer and Hoeijmakers, 2000).

1.3.3 XPF/MUS81-Familie von Nukleasen

Vetreter der XPF/MUS81-Familie von Nukleasen konnten in allen Eukaryoten und Archaea gefunden werden, allerdings nicht in Eubakterien. Sie sind an der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden, wie Quervernetzung von DNA-Strängen (sogenannte Cross-Links), sowie an der Replikation und Rekombination beteiligt. Die meisten Eukaryoten weisen vier Mitglieder dieser Protein-Familie auf. Diese assemblieren sich in zwei heterodimere Endonukleasekomplexe, bestehend aus jeweils einer katalytischen und einer nicht-katalytischen Untereinheit.

Tabelle 1: Homologe der Endonukleasekomplexe der XPF/MUS81-Familie und ihre heterodimere Assoziation. Die jeweiligen Homologen der verschiedenen Organismen sind in der gleichen Reihenfolge aufgelistet. EME1/2, Essential meiotic endonuclease 1/2; ERCC1, Excision repair cross complementarity group 1; FAAP24, Fanconi anemia-associated polypeptide of 240 kDa; FANCM, Fanconi anemia group M; MUS81, Methylmethane sulfonate and UV sensitive protein 81; RAD1/10/16, Radiation deficient; SWI10, Switch 10; XPF, Xeroderma pigmentosum gene F.

Organismus	katalytische Untereinheit	nicht-katalytische Untereinheit
<i>H. sapiens</i>	XPF MUS81 FANCM	ERCC1 EME1/EME2 FAAP24
<i>S. cerevisiae</i>	RAD1 MUS81	RAD10 MMS4
<i>S. pombe</i>	RAD16 MUS81	SWI10 EME1

Die katalytische Untereinheit aller Homologe der XPF/MUS81-Familie besitzt in der ERCC4-Endonukleasedomäne ein hochkonserviertes Aminosäuresequenzmotiv, ERKX₃D, welches das katalytische Zentrum der Enzyme darstellt. Die sauren Aminosäurereste dieses Motivs werden für die Metallionen-abhängige Endonukleaseaktivität benötigt, jedoch nicht für die Bindung der DNA-Strukturen (Enzlin und Scharer, 2002; Nishino *et al.*, 2003). Ein Aminosäureaustausch in dieser zentralen Nukleasedomäne führt zum Funktionsverlust (Aravind *et al.*, 1999; Übersicht in Haber und Heyer, 2001). Die XPF-Homologe weisen zwei konservierte Helix-hairpin-Helix (HhH)-Domänen auf, welche C-terminal als Tandem (HhH)₂ vorliegen. Sie dienen zum einen der Dimerisierung mit der nicht-katalytischen Untereinheit und sind für die sequenzunspezifische DNA-Interaktion verantwortlich. Der „hairpin“ der (HhH)₂-Domäne vermittelt die Interaktion mit der kleinen Furche der Duplex-DNA

(Doherty *et al.*, 1996). Zudem konnte eine Typ II Restriktionsendonuklease-ähnliche Domäne identifiziert werden (Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008).

Die nicht-katalytische Untereinheit besteht aus zwei Domänen, wovon die konservierte zentrale Domäne strukturelle Ähnlichkeit zur ERCC4-Domäne aufweist, allerdings keine Nukleaseaktivität besitzt. Die C-terminale (HhH)₂-Domäne dimerisiert mit der äquivalenten Domäne der katalytischen Untereinheit und dient der DNA-Bindung (de Laat *et al.*, 1998; Nishino *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2005). Es wird außerdem vermutet, dass die HhH-Domänen auch die Substratspezifität der einzelnen Endonukleasekomplexe bestimmen könnten (Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008). Die Domänenorganisation von MUS81 und EME1 konnte kürzlich durch eine Bestimmung der Kristallstruktur des MUS81-EME1-Komplexes des Menschen bestätigt werden (Chang *et al.*, 2008).

Archaeobakterielle Homologe zur katalytischen Untereinheit wirken hingegen als homodimere Komplexe und ähneln in ihrer Sequenz und Struktur dem eukaryotischen XPF-ERRC1-Komplex. Funktionell zeigen die Enzyme jedoch Ähnlichkeit mit dem eukaryotischen MUS81-EME1-Komplex mit einer Präferenz für MUS81-typische Substrate, wie z. B. D-Loops, genickte HJs und 3'-Überhänge (Roberts und White, 2005).

Ausschließlich in Vertebraten kommt der FANCM-FAAP24 vor. Bislang konnte allerdings noch keine Endonukleaseaktivität dieses Proteinkomplexes festgestellt werden (Nishino *et al.*, 2006; Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008).

1.4 Die MUS81-Endonuklease

Das Protein MUS81 wurde erstmals in der Hefe bei einem „Two-hybrid“-Screen von Proteinen entdeckt, welche mit der FHA1 (Forkhead-associated)-Domäne der Replikations-Checkpoint-Kinase CDS1 in *Schizosaccharomyces pombe* (RAD53 Homolog in *S. cerevisiae* bzw. CHK2 Homolog des Menschen) interagieren (Boddy *et al.*, 2000).

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte die physische Interaktion von MUS81 und dem Rekombinationsreparaturprotein RAD54 nachgewiesen werden. Analysen von *mus81 rad54*-Doppelmutanten deuten darauf hin, dass beide Proteine im gleichen Weg der Reparatur bzw. Toleranz von UV-induzierten DNA-Schäden agieren, also epistatisch sind (Interthal und Heyer, 2000).

Zusammen mit seinen Interaktionspartnern EME1 bzw. MMS4 bildet MUS81 eine funktionelle Endonuklease, welche nur als heterodimerer Komplex enzymatisch aktiv ist.

Obwohl das *MUS81*-Gen in den Genomen aller Eukaryoten vorhanden ist, jedoch nicht in Bakterien vorkommt, ist die biologische Funktion der MUS81-Endonuklease in den

verschiedenen Organismen teilweise unterschiedlich (Kaliraman *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002; Ciccia *et al.*, 2003). Diese funktionalen Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten werden in den folgenden Kapiteln ausführlich erläutert.

Der MUS81-Endonukleasekomplex ist im Zellkern lokalisiert (Fu und Xiao, 2003; Higgins *et al.*, 2008) und in den Nukleoli angehäuft (Gao *et al.*, 2003), und kann eine Vielzahl von verschiedenen, häufig überkreuzten DNA-Strukturen schneiden. Diese Strukturen repräsentieren Intermediate der Reperatur von stehengebliebenen oder kollabierten Replikationsgabeln oder Intermediate der homologen Rekombination.

Während die konservierten HhH-Domänen der XPF-Homologe im C-terminalen Bereich als Tandem vorliegen, ist jeweils eine dieser HhH-Domänen bei MUS81 im N- bzw. C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert (Boddy *et al.*, 2000; Interthal und Heyer, 2000; Chen *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 2005). Die C-terminale Region von MUS81 beinhaltet zusätzlich ein pseudo-HhH-Motiv, welches sich allerdings aufgrund einer Insertion von der Sequenz des klassischen HhH-Motivs unterscheidet. Es ist nicht bekannt, ob dieses pseudo-HhH-Motiv funktional ist (Doherty *et al.*, 1996; Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008).

Ein Sequenzvergleich der MUS81-Proteine in den beiden Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* zeigt eine Identität von 24,7 %. Das menschliche MUS81-Protein weist 22,7 % Identität zu *S. pombe* bzw. 23,4 % zu *S. cerevisiae* MUS81 auf. Außerdem wurden zwei EME-Homologe im Menschen identifiziert, wobei nur EME1 *in vitro* einen stabilen Komplex mit MUS81 bildet. EME1 und EME2 weisen 44 % Identität auf, welche sich ausschließlich auf die hochkonservierte C-terminale Region beschränkt, welche die HhH-Domäne aufweist. Wie es bereits für die Homologe des XPF-Komplexes bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass auch MUS81 und EME1 bzw. MMS4 C-terminal miteinander interagieren (Boddy *et al.*, 2001; Ciccia *et al.*, 2003; Fu und Xiao, 2003).

1.4.1 MUS81-Homologe in verschiedenen Organismen und ihre Funktion

Die MUS81-Endonuklease wurde bereits in einer Reihe von Organismen identifiziert und charakterisiert, neben den Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* auch in den Säugern *H. sapiens* und *M. musculus* sowie ansatzweise in *D. melanogaster*. Die Funktionsaufklärung der Endonukleasekomplexe durch entsprechende Mutantanalysen bzw. cytologische Untersuchungen sowie durch biochemische Charakterisierung der Proteine, verdeutlicht funktionale Unterschiede in den verschiedenen Organismen. Mittels Sensitivitätsstudien

MUS81-defizienter Mutanten gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien, welche beispielsweise die Replikation blockieren oder zu Strangquervernetzungen führen, konnten überwiegend übereinstimmende Erkenntnisse erzielt werden. Diese bestätigen die Involvierung des MUS81-Endonukleasekomplexes in Reparaturmechanismen verschiedener DNA-Schäden, beispielsweise in der Reparatur stehengebliebener oder kollabierter Replikationsgabeln, in allen untersuchten Organismen. Auch die typischen Ausprägungen von Defekt-Mutationen, wie z. B. die synthetische Letalität der Doppelmutanten von *mus81* und einer entsprechenden RECQ-Helikase des jeweiligen Organismus sowie die Repression dieses Phänotyps durch die Expression der RUSA-Resolvase konnten für alle untersuchten Organismen bestätigt werden. Dies führte zu der Annahme, dass die MUS81-Endonuklease auch bei der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten beteiligt ist.

Auffallend sind hingegen ganz besonders die deutlich unterschiedlichen, teilweise sogar widersprüchlichen Ergebnisse der meiotischen Analysen. Hierbei wurden nicht nur gegensätzliche Erkenntnisse bei den verschiedenen Organismen erlangt, sondern auch bei unabhängigen Studien von ein und demselben Modellorganismus. So wurden beispielsweise Daten bei Maus-Modellen (McPherson *et al.*, 2004; Dendouga *et al.*, 2005) und auch bei *Arabidopsis* (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008) erzielt, welche sowohl für eine Rolle des MUS81-Komplexes in meiotischen Vorgängen als auch gegen eine Involvierung in der Meiose sprechen.

Diese Widersprüche setzen sich teilweise auch in biochemischen Analysen fort, welche einen essentiellen Teil der Funktionsaufklärung von Enzymen darstellen. Es herrscht Unklarheit darüber, was die Fähigkeit der endogenen oder rekombinanten Enzymkomplexe *in vitro* eine HJ-Struktur zu prozessieren, beeinflusst. Vermutet werden neben aktivierender Proteinfaktoren oder post-translationaler Modifikationen auch die Oligomerisierung der Endonukleasekomplexe (Doe *et al.*, 2002; Gaillard *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2007).

Aufgrund dieser, in vielerlei Hinsicht widersprüchlichen Erkenntnisse, ist es von besonderem Interesse das biochemische Verhalten der MUS81-Endonukleasekomplexe weiterer Organismen zu untersuchen, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten oder auch Besonderheiten klarer definieren zu können.

1.4.2 Die MUS81-Endonuklease der Hefen

Da die meisten Erkenntnisse mit der Bäcker- (*S. cerevisiae*) und Spaltheefe (*S. pombe*) gewonnen wurden, werden im Folgenden die Funktionen und die Beteiligung der MUS81-Endonuklease in Reparaturmechanismen am Beispiel der Hefe detailliert erläutert.

1.4.2.1 Genetische Analysen und Sensitivitätsstudien bei *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Defektmutationen in einem der Gene *MUS81* oder *EME1* bzw. *MMS4* führen zum gleichen vegetativen Phänotyp: die Hefemutanten sind zwar lebensfähig, reagieren aber sensitiv auf UV-, jedoch nicht auf ionisierende Strahlung. Zudem zeigen sie Hypersensitivitäten gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, wie der alkylierenden Substanz Methylmethansulfonat (MMS) und Hydroxyurea (HU), welches die Replikation inhibiert (Boddy *et al.*, 2000; Interthal und Heyer, 2000; Body *et al.*, 2001; Odagiri *et al.*, 2003). Die *S. cerevisiae*-Doppelmutante *mus81 rad1* zeigt eine stärkere Sensitivität gegenüber UV-Strahlung als die jeweilige Einzelmutante, was die Vermutung nahe legt, dass beide Proteine in unabhängigen Reparaturwegen von UV-Schäden eine Rolle spielen (Interthal und Heyer, 2000). Zudem reagieren *mus81*- und *emel*-Zellen sensitiv auf das Topoisomerasegift Camptothecin, was zum Kollabieren von Replikationsgabeln und somit zur Anhäufung von möglicherweise letalen Doppelstrangbrüchen führt (Paques und Haber, 1999; Doe *et al.*, 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Zellen mit einer Doppelmutation von *MUS81* und der RECQ-Helikase *RQH1* von *S. pombe* (Boddy *et al.*, 2000) bzw. *MUS81* und *SGS1* (*RQH1*-Homolog) von *S. cerevisiae* (Mullen *et al.*, 2001) nicht lebensfähig sind. Der wahrscheinliche Grund für diese synthetische Letalität der Doppelmutanten ist, dass das Fehlen der Helikase zur Anhäufung von HJs führt und aufgrund der fehlenden Resolvase *MUS81* diese HJs nicht prozessiert werden können. Dies liegt darin begründet, dass beide Proteine vermutlich bei alternativen Wegen der homologen Rekombinationsreparatur von DSBs und blockierten Replikationsgabeln beteiligt sind, wobei die Helikasen im nicht-rekombinativen Weg eine Rolle spielen. Sowohl die Hypersensitivitäten der Einzelmutanten *mus81*, *emel* bzw. *mms4* und *rqh1* als auch der synthetisch letale Effekt der Doppelmutante *mus81 rqh1*, bzw. *mus81 sgs1* können durch die Komplementation mit der bakteriellen Resolvase *RUSA* unterdrückt werden. Die *RQH1*-Helikase katalysiert die reverse Migration von HJs, was unter Auflösung der Strukturen zum Neustart revertierter Replikationsgabeln führt. Dadurch werden der Zusammenbruch der Replikationsgabel und gleichzeitig die Neuordnung genetischen Materials durch Rekombinationsreparatur verhindert (Doe *et al.*, 2000). Diese Erkenntnisse verdeutlichen eine neben den RECQ-Helikasen wichtige Rolle der *MUS81*-Endonuklease bei der Reparatur von stehengebliebenen und kollabierten Replikationsgabeln (Abbildungen 3A und 3B) (Kaliraman *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002; Fabre *et al.*, 2002; Odagiri *et al.*, 2003).

Mit Hilfe von Mutantenganalysen von Homologen der *RAD52*-Epistasegruppe von Genen, welche essentiell für die homologe Rekombination und an der Reparatur von kollabierten

Replikationsgabeln beteiligt sind, konnte auch gezeigt werden, dass die MUS81-Endonuklease in beiden Hefen hauptsächlich in einem Rekombinationsweg beteiligt ist, welcher unabhängig von RAD51 (bzw. seinem Homolog RHP51 in *S. pombe*) verläuft. Das RECA-Homolog RAD51 bindet exponierte einzelsträngige DNA-Enden, wie sie z. B. als 3'-Enden bei einem DSB entstehen, und katalysieren die Stranginvasion eines homologen DNA-Moleküls unter Ausbildung eines D-Loops. Die Einleitung der Rekombination, also das Rekrutieren von RAD51 an die DNA und die Stranginvasion, ist abhängig von dem Protein RAD52 (bzw. seinem Homolog RAD22 in *S. pombe*). In einigen Fällen kann dieses Protein, aufgrund seiner Fähigkeit komplementäre DNA-Einzelstränge miteinander zu verbinden, sogar die Ausbildung eines D-Loops ohne Beteiligung von RAD51 bewerkstelligen (Übersicht in Paques und Haber, 1999). Somit existieren sowohl RAD51-abhängige als auch -unabhängige Wege der Rekombination, welche beide von RAD52 abhängig sind. Der MUS81-Komplex ist epistatisch zu RAD52 und fast ausschließlich im RAD52-abhängigen (aber RAD51-unabhängigen) Rekombinationsweg zur Reparatur von DNA-Schäden beteiligt (Doe *et al.*, 2002; Odagiri *et al.*, 2003; Doe *et al.*, 2004; Li und Brill, 2005). Die synthetische Letalität der Doppelmutante *mus81 rqh1* konnte durch die Eliminierung der homologen Rekombination, also durch die zusätzliche Mutation in einem der Gene der *RAD52*-Epistasegruppe, wieder aufgehoben werden (Fabre *et al.*, 2002; Bastin-Shanower *et al.*, 2003).

1.4.2.2 Biochemische Analysen der MUS81-Endonuklease von *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Die Aktivität der MUS81-Endonuklease benötigt kein ATP, ist jedoch abhängig von der Anwesenheit eines divalenten Kations, vorzugsweise eines Magnesiumions, welches an die sauren Aspartat-Reste (D) des konservierten katalytischen Zentrums mit der Aminosäuresequenz ERKX₃D bindet und als Cofaktor die endonukleolytische Aktivität katalysiert (Aravind *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 2005). Boddy *et al.* zeigten 2001 erstmals, dass ein Aminosäureaustausch der Aspartat-Reste durch Alanin-Reste im aktiven Zentrum von MUS81 zur Inaktivierung der Endonuklease führt. Auch in der Hefe ist die Mutante identisch mit der entsprechenden Deletionsmutante *mus81* bezüglich der Sensitivitäten und Sporenlebensfähigkeit. Die mutierte und somit inaktive Proteinform von MUS81 interagiert weiterhin mit EME1 und kann in biochemischen Analysen als Negativkontrolle hinzugezogen werden. Somit stellt sie eine wichtige Qualitätskontrolle der Proteinpräparationen bei der Charakterisierung der MUS81-vermittelten Endonukleaseaktivität dar.

Wie bereits erwähnt, wurden in verschiedenen Arbeiten Abweichungen in der Substratspezifität der MUS81-Endonuklease aus verschiedenen Präparationen festgestellt, speziell die HJ betreffend. Es konnten Unterschiede zwischen den in *E. coli* exprimierten MUS81-EME1- bzw. MUS81-MMS4-Komplexen und endogenem Protein aus Zellextrakten festgestellt werden. Doe *et al.* (2002) und Gaillard *et al.* (2003) sehen diesen Unterschied der Schneideaktivität von rekombinantem und endogenem Protein in der Fähigkeit begründet den ersten Schnitt bei einem HJ-Substrat zu bewerkstelligen. Dies ist wohl auf die Anwesenheit akzessorischer Proteinfaktoren, wie Chaperonen oder post-translationaler Modifikationen, wie Phosphorylierung der Proteine, in endogenen Proteinextrakten zurückzuführen. Die bereits in Abschnitt 1.4 erwähnte Assoziation von SpMUS81 mit der Checkpoint-Kinase CDS1 stellt ein Beispiel der möglichen Regulation der MUS81-Endonukleaseaktivität dar. CDS1 reguliert die *in vivo* Phosphorylierung und somit einige Funktionen der MUS81-Endonuklease (Boddy *et al.*, 2000; Kai *et al.*, 2005). Experimente mit *S. pombe* weisen darauf hin, dass die CDS1-abhängige Phosphorylierung von MUS81 eine Assoziation mit dem Chromatin regulieren kann (Kai *et al.*, 2005; Froget *et al.*, 2008).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wird die Notwendigkeit der Anwesenheit solcher aktivierenden Faktoren oder Modifikationen jedoch abgelehnt. So postulieren Gaskell *et al.* (2007), dass das Prozessierungsverhalten der MUS81-Endonuklease bezüglich der HJ auf einem Effekt beruht, welcher die Dimerisierung zu einem tetrameren MUS81-EME1- bzw. MUS81-MMS4-Komplex voraussetzt. Zur Auflösung von HJs wird ein Mechanismus vorgeschlagen, welcher die gekoppelte Schneideaktivität von MUS81-EME1 bzw. ScMUS81-MMS4 an gegenüberliegenden Strängen der Struktur vorsieht, den sogenannten „Nick-counternick“-Mechanismus. Der erste Schnitt erfolgt relativ langsam und stellt somit den limitierenden Schritt dar. Der zweite Schnitt erfolgt sehr schnell, fast gleichzeitig, und ist spezifisch für den gegenüberliegenden Strang. Die Produkte sind lineare, unverzweigte Duplices (Gaillard *et al.*, 2003).

Dies bestätigt die vergleichsweise 70- bis 90-fache Aktivität von rekombinantem MUS81-EME1 bzw. MUS81-MMS4 bei HJs mit einem Einzelstrangbruch, so genannten genickten HJs (nHJ), im Gegensatz zur intakten HJ (Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Roberts und White, 2005). Gleiches gilt für 3'-Überhang- und Replikationsgabel- sowie „Regressed-fork“-Strukturen, HJs mit einem unvollständigen Duplex-Arm (siehe Abbildung 3B, Schritt 2 und Abbildung 2) (Kaliraman *et al.*, 2001; Bastin-Shanower *et al.*, 2003; Fricke *et al.*, 2005; Ehmsen und Heyer, 2008).

Gaskell *et al.* (2007) konnten hingegen HJ-Schneideaktivität bei rekombinant exprimierten MUS81-Komplexen von *S. pombe* und *S. cerevisiae* nachweisen. Die Aktivität war nur in solchen Proteinfractionen festzustellen, welche bei einem Aufreinigungsverfahren als tetramerer Komplex aufgereinigt wurden. Dieser tetramere Komplex besteht aus jeweils zwei Untereinheiten MUS81 und EME1 bzw. MMS4, welcher vermutlich die intakte HJ nach dem vorgeschlagenen „Nick-counternick“-Mechanismus aufgrund des Vorhandenseins zweier aktiver Zentren schneiden kann.

Ein weiteres Modell, welches neben dem klassischen DSBR-Modell zur Bildung von COs führt, ohne ein HJ-Intermediat auszubilden, bezieht die Aktivität der MUS81-Endonuklease mit ein. Aufgrund der Tatsache, dass MUS81-EME1 bzw. MUS81-MMS4 intakte HJs nur sehr ineffizient schneidet, die Bildung von COs in mitotischen und meiotischen Zellen aber begünstigt, blieb die Frage zu klären, wie COs ohne Bildung von HJs entstehen können. Die Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der MUS81-Komplex bereits die überkreuzten DNA-Strukturen (D-Loops) schneidet, bevor sich die eigentliche HJ ausbildet, und es folglich zum CO kommt. Biochemische Analysen bestätigten die MUS81-Endonukleaseaktivität bei diesem D-Loop-Substrat (siehe Abbildung 4) (Osman *et al.*, 2003).

Ein Überblick der verschiedenen DNA-Substrate, welche von MUS81-EME1 und MUS81-MMS4 geschnitten werden können, ist in Abbildung 2 dargestellt.

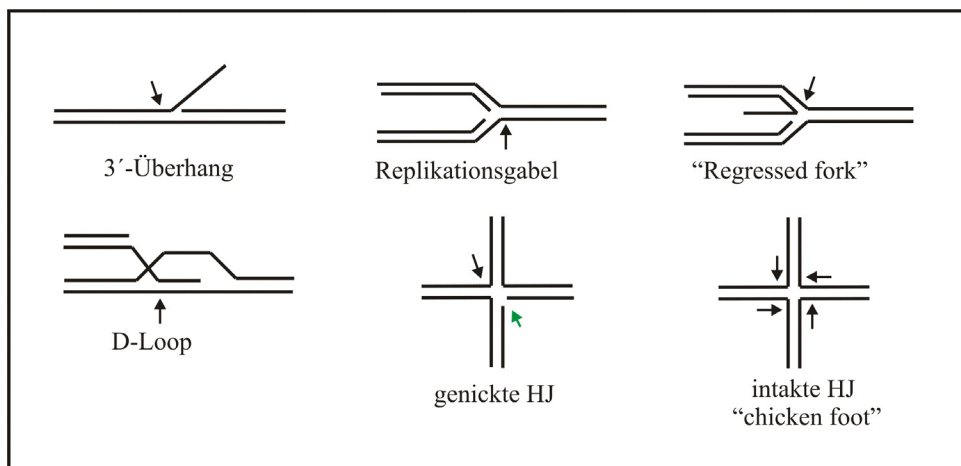


Abbildung 2: Substrate der MUS81-Endonukleasekomplexe der Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae*. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Schnittstellen der MUS81-Endonuklease, der grüne Pfeil markiert den Nick in der nHJ (Übersicht in Osman und Whitby, 2007; Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008; verändert).

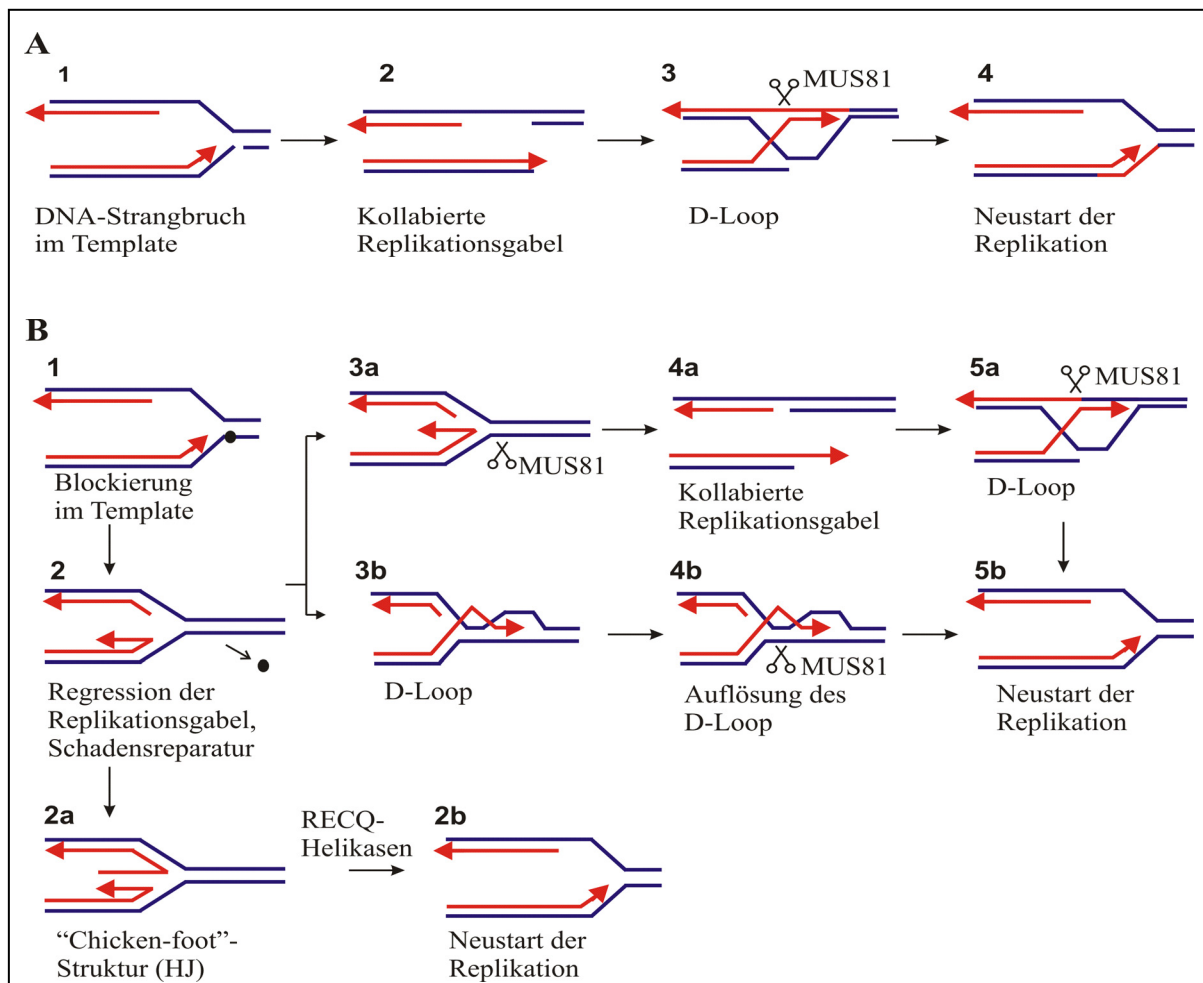


Abbildung 3: Funktion der MUS81-Endonuklease aus Hefe bei der Reparatur von (A) kollabierten und (B) stehengebliebenen Replikationsgabeln. **A**, Im Falle eines Strangbruchs im kontinuierlichen, parentalen DNA-Strang (1) kommt es zum Zusammenbruch der Replikationsgabel (2). Die kollabierte Replikationsgabel kann nun durch homologe Rekombinationsreparatur repariert werden, indem das freie 3'-Ende in den homologen DNA-Strang invadiert und einen D-Loop ausbildet, an welchem sich das Replisom wieder neu bilden kann. Dieser D-Loop kann durch die MUS81-Endonuklease geschnitten werden (3), was zur Wiederaufnahme der Replikation führt (4). **B**, Eine Blockierung der Replikationsgabel (1) kann zu ihrer Regression führen (2), um die Schadensreparatur einzuleiten. Dies hat eine Disassemblierung des Replisoms und somit die Notwendigkeit des Neustartes der Replikation zur Folge. Die revertierte Replikationsgabel stellt ein gutes Substrat für MUS81 dar und kann geschnitten werden (3a), wodurch es zum Kollabieren der Replikationsgabel kommt (4a). Durch Einleiten der homologen Rekombinationsreparatur kann ein D-Loop-Intermediat ausgebildet werden, welches erneut durch die Aktivität der MUS81-Endonuklease geschnitten werden kann (5a), so dass es durch die Reassemblierung des Replisoms zum Neustart der Replikationsgabel kommt (5b). Alternativ können Rekombinasen die Invasion des revertierten, neusynthetisierten DNA-Stranges in die parentalen Stränge der Replikationsgabel katalysieren, was zur Ausbildung eines D-Loops führt (3b). MUS81 kann nun diese D-Loop-Struktur der revertierten Replikationsgabel auflösen, ohne dabei ein einzelsträngiges DNA-Ende zu erzeugen (4b), woraufhin die Replikation neu gestartet werden kann (5b). MUS81, MUS81-EME1 bzw. MUS81-MMS4-Endonukleasekomplex. Alternativ kann ein Fortschreiten der Replikationsgabelregression (2a) zur Ausbildung einer sogenannten „Chicken-foot“-Struktur (HJ) führen und die anschließende Auflösung der entstandenen HJ kann dann durch die Aktivität von RECQ-Helikasen katalysiert werden. Dies stellt den nicht-rekombinativen Weg der Reparatur von stehengebliebenen Replikationsgabeln dar (2b). Wird die Schadensreparatur der revertierten Replikationsgabel in (2) nicht eingeleitet, so kann die Replikation weitergeführt werden, indem der diskontinuierliche Strang als Matrize dient und so die schadhafte Stelle im parentalen Strang übersprungen wird (vergleichbar mit 2a und 2b). (Whitby *et al.*, 2003; Doe *et al.*, 2004; Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008; verändert).

1.4.2.3 Meiotische Funktion der MUS81-Endonuklease in *S. cerevisiae* und *S. pombe*

MUS81 Hefe-Mutanten zeigen einen auffälligen Phänotyp, wie er für HJ-Resolvase-Mutanten bekannt ist.

Erkenntnisse aus den Untersuchungen der Sporenlebensfähigkeit und CO-Häufigkeit (Tabelle 2) führten zu der Annahme, dass der MUS81-EME1-Komplex in *S. pombe*, im Gegensatz zu MUS81-MMS4 in *S. cerevisiae*, eine wesentliche Rolle in der Meiose spielt (Osman *et al.*, 2003). Der offensichtliche Grund dafür ist, dass *S. cerevisiae* eine alternative Resolvase besitzt, wohingegen bei *S. pombe* Rekombinationsintermediate nur durch die MUS81-Endonuklease prozessiert werden können (de los Santos *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass COs in zwei unterschiedlichen Wegen in *S. cerevisiae* entstehen können, von denen einer von MUS81-MMS4 (Klasse II) (Abbildung 4, Schritte 1 und 5 bis 8) und der andere von MSH4-MSH5 (Klasse I) (Abbildung 4, Schritte 1 bis 4) abhängig ist. Nur der MSH4-MSH5-abhängige Weg zeigt CO-Interferenz, ein Phänomen, bei dem das Vorhandensein eines COs weitere Rekombinationsvorgänge in benachbarten chromosomalen Stellen hemmt. Folglich zeigt die *mus81 msh5*-Doppelmutante von *S. cerevisiae* eine niedrigere Sporenlebensfähigkeit als die jeweiligen Einzelmутanten. Gleiches gilt für die Doppelmutante *mms4 msh5*. Dies verdeutlicht, dass MUS81-MMS4 und MSH4-MSH5 die Entstehung zweier grundsätzlich unterschiedlicher Klassen von COs fördern, wobei der letztere Weg in *S. cerevisiae* überwiegt. Dies und die Erkenntnis, dass MUS81-MMS4 *in vitro* bevorzugt 3'-Überhang-Strukturen prozessiert, legt die Vermutung nahe, dass die MUS81-Endonuklease von *S. cerevisiae* vorwiegend für die Prozessierung dieser Strukturen während der meiotischen Rekombination benötigt wird. Diese Überhänge entstehen beispielsweise im SDSA-Modell der Reparatur von DSBs (siehe Abbildung 36), wenn die Sequenz des neusynthetisierten Stranges länger ist als das andere freie 3'-Ende des DSB. Außerdem wird das Vorhandensein eines weiteren, dritten CO-Weges diskutiert, da die Sporenlebensfähigkeit der *msh5 mus81* bzw. *mms4*-Zellen nur reduziert ist, aber nicht die vollständige Sterilität bedingt (Kaliraman *et al.*, 2001; de los Santos *et al.*, 2001; de los Santos *et al.*, 2003; Argueso *et al.*, 2004). Das Fehlen von MSH4-MSH5-Homologen in *S. pombe* erklärt die fehlende CO-Interferenz und die starke Abhängigkeit von MUS81-EME1 bezüglich der Sporenlebensfähigkeit und dem Auftreten von COs (Osman *et al.*, 2003). Diese meiotischen Defekte in *S. pombe mus81*- bzw. *emel*-Zellen und ihre Unterdrückung in Komplementationsversuchen durch die Expression der bakteriellen Resolvase RUSA lässt vermuten, dass die MUS81-Endonuklease in der Auflösung von HJs in der Meiose involviert

sein muss (Boddy *et al.*, 2000; Boddy *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Roseaulin *et al.*, 2008).

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2) sind die wichtigsten Aspekte der meiotischen Analysen zusammengefasst.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Bedeutung des MUS81-Endonukleasekomplexes in der Meiose von *S. pombe* und *S. cerevisiae*.

	<i>S. pombe</i> <i>mus81/eme1</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>mus81/mms4</i>
Sporenenlebensfähigkeit	1 % Veränderung des Größenunterschiedes und der Ploidie, ungleichmäßig verteilte Anzahl von Sporen in den Mutanten-Asci (Segregationsdefekt)	10-50 %
CO-Häufigkeit	um die Hälfte reduziert	kaum beeinträchtigt
Doppelmutation mit RECQ-Helikase (<i>rqh1</i> bzw. <i>sgs1</i>)	synthetisch letal	synthetisch letal
CO-Interferenz	Nein (Klasse II COs)	Ja (Klasse I COs)
	↓ Unterdrückung der meiotischen Defekte und Letalität durch Komplementation mit RUSA	
Bedeutung der MUS81- Endonuklease in der Miose (Bildung von COs)	abhängig von MUS81- EME1	alternative Resolvase, MSH4-MSH5- abhängiger Weg überwiegt in Meiose

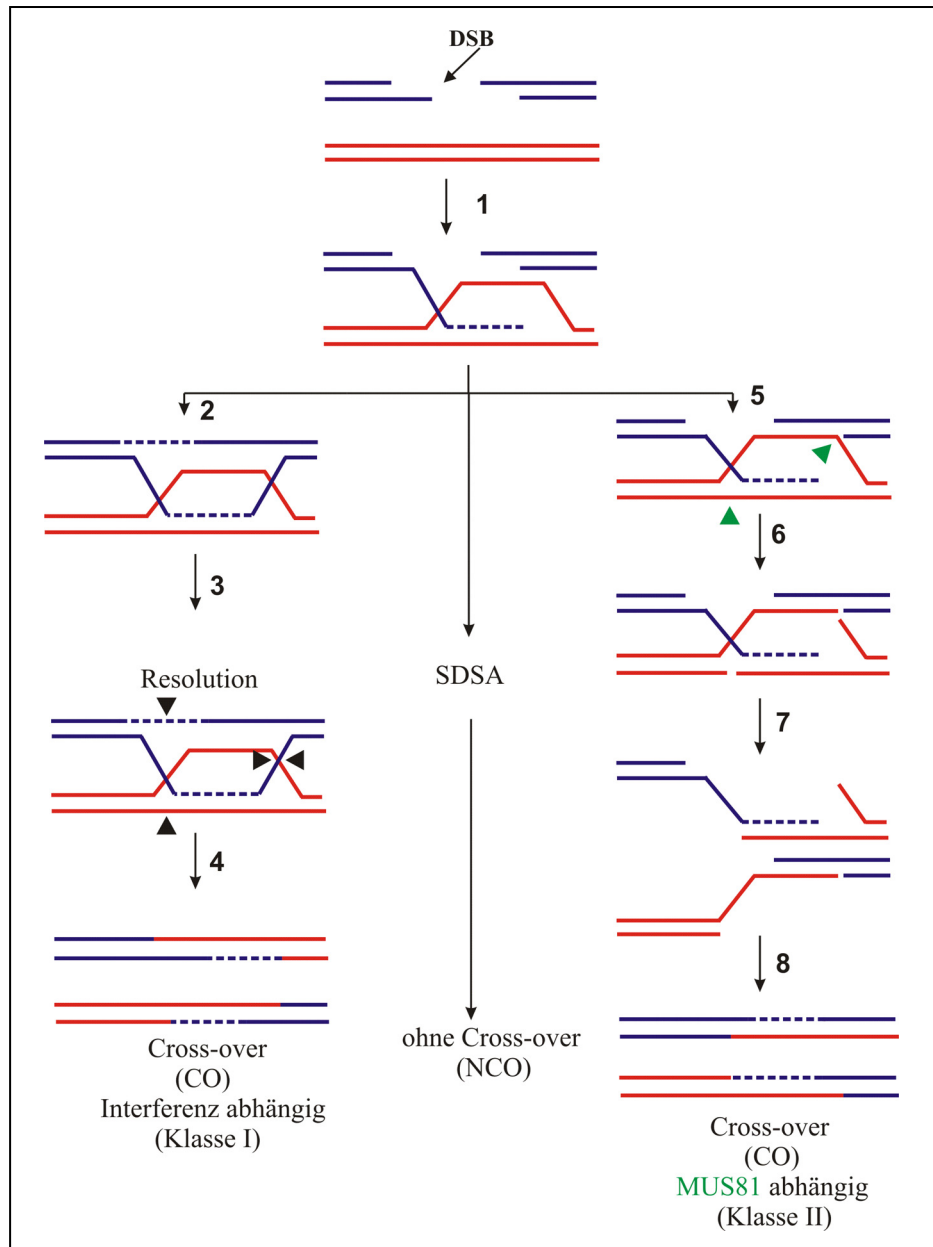


Abbildung 4: Modelle der homologen Rekombinationsreparatur eines DSB. In der Meiose werden DSBs gezielt durch das Protein SPO11 eingeführt und durch homologe Rekombination repariert. Das freie 3'-Ende invadiert in den homologen DNA-Strang unter Ausbildung eines D-Loops (1). Erfolgt eine weitere DNA-Synthese (unterbrochene Linien) durch die Stabilisierung des D-Loop-Intermediats durch die Meiose-spezifischen Proteine MSH4-MSH5, wird eine doppelte HJ (dHJ) ausgebildet (2), welche weiterhin durch die Bindung der Proteine stabilisiert wird. Die Resolution dieses Rekombinationsintermediats kann nun durch eine bislang noch unbekannte Resolvase erfolgen (3), was zur Ausbildung eines Cross-overs (CO) führt (4). Dieser Mechanismus stellt den Interferenz abhängigen Weg (Klasse I) dar, welcher in *S. cerevisiae* überwiegt. In Abwesenheit der Meiose-spezifischen Proteine zur Stabilisierung der Rekombinationsintermediate wird der SDSA-Mechanismus eingeleitet, der ohne Ausbildung von Cross-overs (NCO) einhergeht (siehe Abbildung 1). In beiden Hefen resultieren NCOs aus diesem SDSA-Mechanismus. Alternativ kann bereits der anfangs gebildete D-Loop und die resultierende genickte HJ von der MUS81-Endonuklease geschnitten werden (5, 6), was zur Ausbildung von Interferenz-unabhängigen COs (Klasse 2) führt (7, 8). COs in *S. pombe* werden ausschließlich über diesen Weg gebildet. Eine weitere Möglichkeit ist die Dissolution der gebildeten dHJ-Intermediate durch die Aktivität von RECQ-Helikasen in Kooperation mit Topoisomerasen (nicht dargestellt). Schwarze/grüne Pfeile, Schnittstellen der Resolvase bzw. der MUS81-Endonuklease (Übersicht in Hollingsworth und Brill, 2004; Übersicht in Whitby, 2005; Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008; verändert).

1.4.3 Die MUS81-Endonuklease in Säugetieren am Beispiel des Menschen und der Maus

Im Menschen konnten neben einem MUS81-Homolog (Ogrunc und Sancar, 2003) erstmals zwei EME-Homologe, EME1 und EME2, identifiziert werden (Chen *et al.*, 2001), die eine Identität von 44 % aufweisen. Lediglich das EME1-Protein bildet *in vitro* einen stabilen Komplex mit HsMUS81 (Chen *et al.*, 2001; Blais *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Vermutlich wird MUS81 benötigt, um in proliferierenden Zellen Schäden zu beheben, die während der Replikation entstanden sind. Somit erklärt sich die zunehmende Ansammlung des MUS81-Komplexes in der S-Phase, vor allem in den Nukleoli menschlicher Zellen, was vermutlich der schnellen Rekrutierung des Proteins zu Regionen von DNA-Schäden dient (Gao *et al.*, 2003; Hiyama *et al.*, 2006).

1.4.3.1 Studien zur Funktionsaufklärung der MUS81-Endonuklease mit Säugetierzellkulturen

RNA-Interferenzexperimente zur Unterdrückung der MUS81-Expression in menschlichen somatischen Zellen bestätigten eine reduzierte Lebensfähigkeit der Zellen und eine reduzierte mitotische Rekombination. Die Expression der bakteriellen Resolvase RUSA unterdrückt diesen mitotischen Defekt und die Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, welche die Blockierung von Replikationsgabeln verursachen (Blais *et al.*, 2004).

Es gibt außerdem Hinweise auf teilweise überlappende Funktionen der MUS81-Endonuklease und des Fanconi Anämie (FA)-Weges in der homologen Rekombinationsreparatur sowie in der Zellproliferation in somatischen Zellen des Menschen. Vermutlich spielen beide Reparaturwege eine wichtige Rolle bei der Reparatur von kollabierten Replikationsgabeln, wobei MUS81-EME1 die homologe Rekombinationsreparatur durch Sister-Chromatid-Exchange (homologe Rekombination mit dem Schwesterchromatid) vermittelt (Nomura *et al.*, 2007).

Anhand von Experimenten mit embryonalen Stammzellen (ES) der Maus konnte gezeigt werden, dass der komplette Verlust beider *MUS81*- bzw. *EME1*-Allele zu Hypersensitivität gegenüber der DNA-quervernetzenden Substanz Mitomycin C (MMC) und Hydroxyurea (HU) führt (Abraham *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2004; Hanada *et al.*, 2006; Hanada *et al.*, 2007). Dies deutet auf eine Funktion des MUS81-EME1-Komplexes von Säugetieren in der Reparatur von stehengebliebenen Replikationsgabeln und von Interstrand-Cross-Links (ICLs, Quervernetzungen komplementärer DNA-Stränge) hin, welche speziell die Replikation und

Transkription blockieren und somit zu einer Anhäufung von Strukturintermediaten führen. Die fehlende Auflösung dieser Strukturen kann zum Zelltod durch kollabierte Replikationsgabeln und DSBs führen. Die fehlende Sensitivität von *MUS81*- und *EME1*-defizienten ES-Zellen gegenüber UV-Strahlung und MMS verdeutlicht jedoch den Unterschied in der Reaktion auf stehengebliebene Replikationsgabeln in Säugetierzellen verglichen mit Hefezellen.

1.4.3.2 Untersuchungen am Maus-Modell

Untersuchungen von Mäusen zeigten, dass homozygote *mus81*-Mutanten sowohl lebensfähig, als auch fertil waren und offenbar keinerlei Defekte in der Gametogenese zeigten, was darauf hindeutet, dass der MUS81-EME1-Komplex in Säugetieren weder für die Embryonalentwicklung und Lebensfähigkeit noch für meiotische Rekombinationsprozesse benötigt wird (Abraham *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2004). Hingegen wurde gezeigt, dass homozygote *msh4*- bzw. *msh5*-Mäuse steril sind und Defekte in der Chromosomenpaarung während der Meiose I aufweisen. Dies lässt vermuten, dass COs in Säugetieren ausschließlich über den MSH4-MSH5-abhängigen Weg entstehen (siehe Abbildung 4) (Übersicht in Whitby, 2005).

Die *mus81*- bzw. *eme1*-Mutanten-Mäuse sind morphologisch gleich mit dem Wildtyp. Bezüglich der Prädisposition für Krebs wurden in verschiedenen Maus-Modellen widersprüchliche Erkenntnisse gewonnen. Bei einigen Mäusen wurden keine Tumore festgestellt und sie entwickelten keine Erkrankungen (über 90 % der Tiere blieben in den ersten 15 Monaten gesund) (Dendouga *et al.*, 2005), wohingegen einige der Tiere nur das erste Lebensjahr überlebten und unter Tumoren litten (nur etwa 27 % der homozygoten und 50 % der heterozygoten Tiere blieben gesund, im Gegensatz zu 95 % der Wildtyp-Mäuse) (McPherson *et al.*, 2004).

Diese und weitere Erkenntnisse weisen auf eine entscheidende Rolle für die biallelische Expression von *MUS81* in somatischen Säugetierzellen in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und auch der Tumorsuppression hin. Der Verlust eines *MUS81*-Allels reicht schon aus, um genomische Schäden zu verursachen (McPherson *et al.*, 2004).

1.4.3.3 Biochemische Analysen der MUS81-Endonuklease des Menschen und der Maus

Biochemische Analysen mit verschiedenen DNA-Substraten ergaben, dass der endogene MUS81-Komplex des Menschen und der Maus die HJ zwar schneidet, aber eine höhere Aktivität für Replikationsgabel- und 3'-Überhang-Strukturen aufweist (Chen *et al.*, 2001; Constantinou *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2003; Taylor und McGowan, 2008). Diese Strukturen wurden auch bevorzugt durch den rekombinanten, in *E. coli* exprimierten Proteinkomplex vom Menschen und der Maus geschnitten, im Gegensatz zur sehr schwachen Aktivität bei der HJ (Ciccina *et al.*, 2003; Blais *et al.*, 2004).

Zhang *et al.* (2005) konnten ausserdem zeigen, dass die zur Familie der RECQ-Helikasen gehörende BLM-Helikase die endonukleolytische Aktivität von endogenem MUS81-Komplex des Menschen beim 3'-Überhang-Substrat und bei der einfach genickten HJ stimuliert. Dies beruht vermutlich auf einer verstärkten Bindung von MUS81-EME1 an die DNA-Substrate. Dieser Effekt konnte ebenfalls bei der Prozessierung der intakten HJ beobachtet werden, umgekehrt hat MUS81 aber keinen Effekt auf die Helikaseaktivität von BLM (Zhang *et al.*, 2005). Ein Überblick der verschiedenen DNA-Substrate der MUS81-EME1-Endonuklease von Säugetieren ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die Kombination der Erkenntnisse aus biochemischen und genetischen Analysen deutet auf eine Beteiligung der MUS81-Endonuklease an der Reparatur und dem Neustart von Replikationsgabeln und bei der Auflösung von Rekombinationsintermediaten in somatischen Säugetierzellen hin. Das Protein ist somit ein wichtiger Faktor bei der Erhaltung der Genomstabilität.

Die HJ stellt eines der wichtigsten Intermediate der homologen Rekombination und der homologen Rekombinationsreparatur dar. Ein wichtiger Mechanismus zur Reparatur von stehengebliebenen Replikationsgabeln (siehe Abbildung 3) stellt die Regression der Gabel dar, was zur Ausbildung einer sogenannten „Chicken foot“-Struktur, also einer HJ, führt (Constantinou *et al.*, 2002; Ciccina *et al.*, 2003). Die Regression erlaubt nun die Reparatur des Schadens, so dass die Replikationsgabel durch die Aktivität von Helikasen der RECQ-Familie, wie z. B. der Bloom (BLM)- oder Werner (WRN)-Helikase des Menschen, durch ihre Branch-Migration-Aktivität wiederhergestellt werden kann (siehe Abbildung 3B, Schritte 2a und 2b). Alternativ kann die stehengebliebene Replikationsgabel selbst bzw. die durch ihre Regression gebildete „Chicken foot“-Struktur von der MUS81-Endonuklease geschnitten werden. Der resultierende DSB kann nun die homologe Rekombinationsreparatur initiieren,

was zum Neustart der Replikation führt (siehe Abbildung 3). Die enzymatischen Eigenschaften der MUS81-Endonuklease des Menschen, also das Schneiden von sowohl Replikationsgabelstrukturen als auch von HJs deuten daraufhin, dass der MUS81-Komplex in zwei der genannten Reparaturwege involviert ist und somit eine wichtige Funktion in der Reparatur und dem Neustart stehengegebliebener oder blockierter Replikationsgabeln einnimmt (Constantinou *et al.*, 2002; Ciccia *et al.*, 2003).

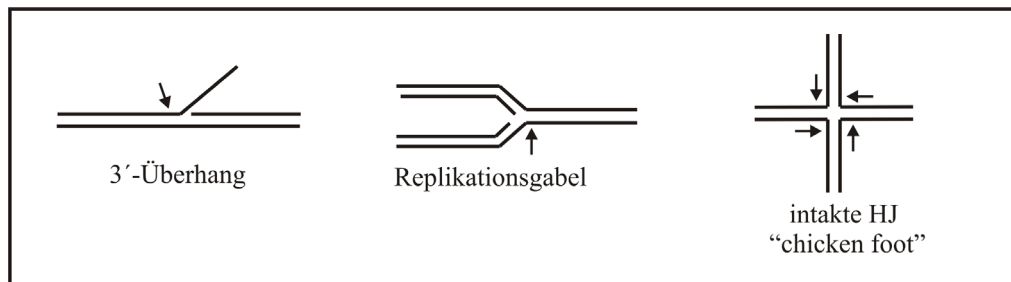


Abbildung 5: Substrate der MUS81-Endonuklease des Menschen und der Maus. Die Pfeile kennzeichnen die Schnittstellen der MUS81-Endonuklease (Übersicht in Osman und Whitby, 2007; Übersicht in Ciccia *et al.*, 2008; verändert).

1.4.4 Die MUS81-Endonuklease und Krebs

Bei hetero- und homozygoten *MUS81*-defizienten Mäusen und Zellen konnte neben einer erhöhten Genominstabilität auch eine starke Prädisposition für Krebs und die spontane Entwicklung von Tumoren nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.4.3.2) (McPherson *et al.*, 2004). Weiterführende Studien stellten außerdem eine erhöhte Aktivierung von p53 in homozygoten *MUS81*-defizienten Zellen als Antwort auf ICL-induzierte DNA-Schäden fest. Die Inaktivierung von p53 hebt die Hypersensitivität von homozygoten *mus81*-Zellen gegenüber ICL-induzierenden Agenzien, wie MMC, völlig auf. Dies bedeutet, dass p53 für die Eliminierung von MMC-geschädigten *mus81*-Zellen wichtig ist. p53 besitzt die Fähigkeit den Zellzyklus DNA-geschädigter Zellen zu arretieren und verhindert somit die Anhäufung chromosomaler Aberrationen, welche sonst zu krebsauslösenden genetischen Veränderungen führen können. Um die genetische Interaktion von *MUS81* und p53 in der Tumorsuppression aufzuklären, wurden doppelt homozygote *mus81 p53* Knock-out Mäuse auf die Entwicklung spontaner Tumore untersucht. Dabei wurde eine für weibliche Mäuse spezifische, embryonale Letalität der entsprechenden Doppelmutanten beobachtet, wohingegen männliche Tiere eine normale embryonale Entwicklung zeigten. Der Verlust beider Gene *MUS81* und p53 resultiert sowohl in der Veränderung des Tumorspektrums als auch in der Bildung multipler Tumore. Das Auftreten von Aneuploidie und eine erhöhte Rate chromosomaler Brüche in *mus81*-, p53-

und *mus81 p53*-Zellen nach der Behandlung mit MMC deuten daraufhin, dass p53 eine wichtige Rolle in der Suppression genomischer Instabilität in *MUS81*-defizienten Zellen spielt.

MUS81 wird somit die Rolle eines wichtigen haploinsuffizienten Tumorsuppressors zugeschrieben, welcher in Kooperation mit p53 die Bildung bösartiger Tumore des Mesodermgewebes, sogenannte Sarkome, unterdrückt (Pamidi *et al.*, 2007).

Kürzlich wurde eine Studie über die Korrelation der *MUS81*-Expression und der Prognose von Patienten, die an hepatocellulärem Karzinom (HCC) erkrankt sind, veröffentlicht. Es konnte eine Abnahme der Expression von *MUS81*-mRNA und -Protein in Gewebeproben von HCC-Patienten beobachtet werden, welche mit dem Grad der Bösartigkeit der Tumore beim Menschen korrelierte. Die Untersuchungen deuteten daraufhin, dass die abnehmende *MUS81*-Expression in menschlichem HCC-Gewebe mit der Prognose korrelierte und *MUS81* als neuartiger prognostischer Marker bei HCC dienen könnte (Wu *et al.*, 2008).

Diese und weitere Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass auch eine *MUS81*-assoziierte genomische Instabilität die Entwicklung von Tumoren induzieren kann.

1.4.5 Die *MUS81*-Endonuklease in der Fliege *Drosophila melanogaster*

In der Fliege *D. melanogaster* konnte bei *mus81*-Mutanten eine normale Fertilität und nur eine geringe Reduktion von COs festgestellt werden (Johnson-Schlitz und Engels, 2006; Trowbridge *et al.*, 2007). Die meisten CO-Ereignisse in *D. melanogaster* benötigen die NER-Endonuklease MEI-9-ERCC1. In *MEI-9*-defizienten Mutanten werden etwa 90 % der COs eliminiert (Sekelsky *et al.*, 1995). Die restlichen 10 % COs konnten nicht durch die zusätzliche Mutation von *MUS81* eliminiert werden, was vermuten lässt, dass *MUS81* in *D. melanogaster* keine wichtige Rolle in der Ausbildung von COs in der Meiose spielt. Dies stimmt mit den Erkenntnissen der Maus-Modelle überein, unterscheidet sich aber deutlich von den Ergebnissen von *S. pombe*. Hypersensitivitäten der *mus81*-Mutanten gegenüber einiger DNA-schädigender Agenzien deuten auch hier auf eine Funktion der *MUS81*-Endonuklease von *Drosophila* in der Reparatur von stehengebliebenen und geschädigten Replikationsgabeln hin, wie es bereits für Hefen und Säugetiere gezeigt werden konnte. Vergleichbar mit den Erkenntnissen aus diesen Organismen sind Doppelmutationen von *MUS81* und *MMS4* mit dem RECQ-Helikase-Gen *BLM* synthetisch letal. Dieser Effekt konnte ebenfalls teilweise durch die Eliminierung der HR unterdrückt werden (Trowbridge *et al.*, 2007).

1.4.6 Die MUS81-Endonuklease in *Arabidopsis thaliana*

In *A. thaliana* Ökotyp Columbia-0 konnten homologe Gene für *MUS81* und *EME1* identifiziert und eine vollständige Sequenzbestimmung durchgeführt werden. Die korrekte Sequenz von *MUS81* (At4g30870) besteht aus 15 Exons und 14 Introns. Der resultierende offene Leserahmen (ORF) ist 1980 Nukleotide lang und codiert für ein 659 Aminosäuren langes Protein. Ein Vergleich der gesamten Proteinsequenz von AtMUS81 mit den Sequenzen in den bereits untersuchten Organismen *H. sapiens*, *S. pombe* und *S. cerevisiae* zeigt eine Identität zwischen 19,8 % und 21,2 % zu den jeweiligen Proteinen. Vergleicht man nur den konservierten C-terminalen Bereich von MUS81, einschließlich der ERCC4-Endonukleasedomäne mit dem konservierten Aminosäuresequenzmotiv der XPF-Endonuklease Familie und der DNA-bindenden HhH-Domäne, konnte immerhin eine Identität von 28,2 % zwischen *A. thaliana* und *H. sapiens*, verglichen mit 28,6 % zwischen *S. pombe* und *S. cerevisiae* MUS81 gefunden werden.

Es können drei Domänen innerhalb des AtMUS81-Proteins identifiziert werden (Abbildung 6). Eine Polymerase- β -Domäne, die ERCC4-Endonukleasedomäne und eine Domäne, die der C-terminalen Region von RUVA ähnlich ist. Die N-terminale Polymerase- β -Domäne enthält eines der beiden HhH-Motive, die in allen untersuchten MUS81-Proteinen identifiziert wurden. Die zweite HhH-Domäne befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins. Einzig die RUVA-Domäne konnte ausschließlich in AtMUS81 gefunden werden, ihre Funktion ist jedoch bislang unklar. Datenbankuntersuchungen ergaben ein zweites *MUS81*-ähnliches Gen in *Arabidopsis* (At5g39770), welches jedoch als nicht-funktionales Pseudogen identifiziert wurde (Hartung *et al.* 2006).

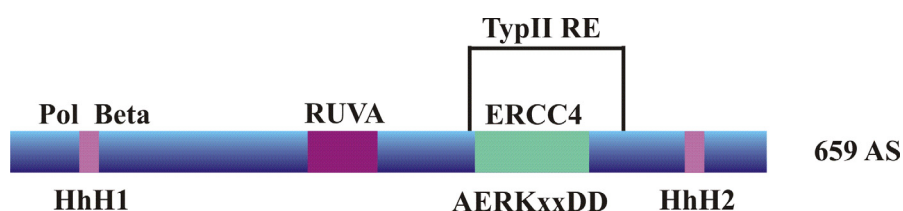


Abbildung 6: Schematische Struktur des MUS81-Proteins von *Arabidopsis thaliana*. MUS81 von *A. thaliana* (659 Aminosäuren (AS) lang) besitzt N- und C-terminal gelegen jeweils eine Helix-hairpin-Helix-Domäne (HhH1, HhH2, rosa), welche der DNA-Bindung bzw. der Dimerisierung mit seinem Interaktionspartner EME1 dient. Ebenfalls im C-terminalen Bereich befindet sich die ERCC4-Endonukleasedomäne einschließlich des hochkonservierten katalytischen Zentrums mit dem Sequenzmotiv AERKxxDD (grün). Dieser Bereich weist eine Typ II Restriktionsendonuklease-ähnliche Domäne (TypII RE, schwarzer Kasten) auf, welche alle Proteine der XPF/MUS81-Familie gemeinsam haben. Außerdem besitzt das Protein eine Domäne, die der C-terminalen Region von RUVA ähnlich ist (RUVA, lila) und bislang nur bei *A. thaliana* gefunden wurde.

Überraschenderweise konnten in unserem Institut zwei *EME1*-Homologe in *A. thaliana* identifiziert werden. Beide Homologe, *EME1A* (At2g21800) und *EME1B* (At2g22140) zeigen auf Proteinebene eine Identität von 62,7 % und werden ähnlich stark transkribiert. Die pflanzlichen Gene bestehen aus jeweils 12 kodierenden Exons. *EME1A* kodiert für ein 546 Aminosäuren und *EME1B* für ein 551 Aminosäuren langes Protein. Für *EME1B* konnten fünf Positionen für aberrantes Spleißen festgestellt werden, welche in jeweils einem vorgezogenen Stoppcodon resultieren und somit nicht-funktionelle Transkripte erzeugen. In *EME1A* wurde nur eine Stelle für alternatives Spleißen gefunden, welche zu einem 3 Aminosäuren längerem Protein führt. Real-Time-PCR-Transkriptionsanalysen konnten zeigen, dass *MUS81* nicht gewebespezifisch und etwa 4 bis 8-fach stärker transkribiert wird als *EME1A* und *EME1B*, die ebenfalls nicht gewebespezifisch exprimiert werden.

1.4.6.1 Funktionscharakterisierung der MUS81-Endonuklease von *A. thaliana*

Für die Funktionscharakterisierung des Endonukleasekomplexes *in vivo* wurden Mutagenassays mit Arabidopsis-Pflanzen mit einer T-DNA-Insertion im *MUS81*-Gen, was eine Inaktivierung des Gens zur Folge hat, durchgeführt. Diese zeigten z. T. übereinstimmende Ergebnisse mit den Daten von Hefemutanten und Säugetierzellen. Die *mus81*-Pflanzen wiesen eine hohe Sensitivität gegenüber Methylmethansulfonat (MMS), aber auch MMC (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007), Cisplatin und ionisierender Strahlung auf (Berchowitz *et al.*, 2007). Die entsprechenden Mutagen-behandelten *mus81*-Keimlinge waren wesentlich kleiner und gelblicher im Vergleich zum Wildtyp (Hartung *et al.*, 2006) und wiesen eine Zunahme der Transkriptionsrate von *MUS81* auf (Berchowitz *et al.*, 2007). In somatischen Pflanzenzellen konnte kein Effekt der Mutation in *MUS81* auf die basale homologe Rekombination nachgewiesen werden. Jedoch konnte eine Abnahme der Induktion der HR beobachtet werden, nachdem die *mus81*-Pflanzen genotoxischem Stress durch Mutagenbehandlung ausgesetzt wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch AtMUS81 bei der homologen Rekombinationsreparatur in somatischen Zellen sowie an der Reparatur von kollabierten Replikationsgabeln beteiligt ist (Hartung *et al.*, 2006).

Der synthetisch letale Effekt der *mus81*-Mutante in Kombination mit einer Mutation der RECQ-Helikasen *RQH1* bzw. *SGS1* (in *S. pombe* bzw. *S. cerevisiae*) und *BLM* beim Menschen konnte auch bei der entsprechenden Doppelmutante *mus81 recq4A* bei *A. thaliana* beobachtet werden. Diese Erkenntnis und die bekannte Funktion einiger RECQ-Helikasen bei der Reparatur von stehengebliebenen Replikationsgabeln legen die Vermutung nahe, dass beide Proteine MUS81 und RECQ4A in parallelen Wegen zur Auflösung stehengebliebener Replikationsgabeln involviert sind (siehe Abbildung 3). Die Zellen sind also nur dann

lebensfähig, wenn einer dieser beiden Wege verfügbar ist. Sobald beide Wege ausfallen, ist eine Fortführung der Replikation unmöglich (Hartung *et al.*, 2006).

1.4.6.2 Meiotische Funktion der MUS81-Endonuklease von *A. thaliana*

MUS81-defiziente T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana* zeigten normales Wachstum und waren fertil, d. h. die Anzahl produzierter Samen war vergleichbar mit der des Wildtyps. Eine Analyse der Pollen der *mus81*-Pflanzen bestätigte die vollständige Lebensfähigkeit der Pollenmutterzellen. Dies deutet daraufhin, dass *MUS81* keine wichtige Rolle in der Meiose in *A. thaliana* spielt, wie es auch für Säugetiere gezeigt werden konnte, jedoch kann eine Beteiligung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine cytologische Untersuchung der *mus81*-Mutante zeigte auch keine Defekte in der Morphogenese der Chromosomen, sowie eine normale Chromosomenpaarung und -trennung (Higgins *et al.*, 2008).

In einer anderen Studie hingegen wurde eine Abnahme der Lebensfähigkeit der Samen der *mus81*-Pflanzen, eine Reduktion von meiotischen COs um 10 % (Berchowitz *et al.*, 2007) sowie eine erhöhte Expression von *MUS81* in reproduktivem Gewebe, wie z. B. in den Antheren, festgestellt. Dies und die beobachtete Ko-Lokalisation mit dem frühen Rekombinationsprotein RAD51 in den Nuklei von Pollenmutterzellen während der meiotischen Prophase I (Higgins *et al.*, 2008) sprechen wiederum für eine Beteiligung der *MUS81*-Endonuklease an der Meiose (Berchowitz *et al.*, 2007). Wie es bereits für *S. cerevisiae* bekannt ist, wurden auch für *A. thaliana* zwei alternative Wege zur Entstehung von COs vermutet. Bei diesen könnte entweder die *MUS81*-Endonuklease in einem Interferenz-unabhängigen Weg (Klasse II) oder der *MSH4*-*MSH5*-Komplex in einem Interferenz-abhängigen Weg (Klasse I) involviert sein (siehe Abbildung 4). Die Doppelmutante *mus81 msh4* von *A. thaliana* zeigte einen stärkeren meiotischen Rekombinationsdefekt als die jeweiligen Einzelmutanten, was eine Unabhängigkeit beider Wege verdeutlicht (Berchowitz *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008). Die Doppelmutante zeigte zudem eine Reduktion in Rekombinationsereignissen um etwa 90 % im Vergleich zu einer Reduktion um 85 % bei der *msh4*-Mutante und 5 % bei der *mus81*-Mutante. Bislang ist noch unklar, woher die restlichen 10 % COs stammen, allerdings wird das Vorhandensein eines dritten Weges vermutet, welcher in Abwesenheit von *MUS81* und *MSH4* für die Bildung von COs verantwortlich sein könnte (de los Santos *et al.*, 2003; Argueso *et al.*, 2004; Berchowitz *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008). Als ein möglicher Kandidat wurde das Protein *RAD1* vermutet, welches zusammen mit *RAD10* in Hefe für die Prozessierung von Rekombinationsintermediaten verantwortlich ist. Die entsprechende Mutante *rad1* von *A. thaliana* weist einen starken

Defekt in homologen Rekombinationsereignissen auf (Dubest *et al.*, 2002). Es konnte allerdings kein Effekt auf die CO-Häufigkeit der *A. thaliana* Dreifachmutante *mus81 msh4 rad1* im Vergleich zur *mus81 msh4*-Doppelmutante festgestellt werden, weshalb ausgeschlossen wurde, dass RAD1 für die restlichen COs verantwortlich ist (Higgins *et al.*, 2008).

2. Ziel der Arbeit

Der MUS81-Endonukleasekomplex spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität und Stabilität. Im Speziellen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung an der Reparatur von stehengebliebenen und kollabierten Replikationsgabeln sowie an der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten. Homologe von *MUS81* konnten in den Genomen aller Eukaryoten gefunden werden und es wurden Unterschiede in der biologischen Funktion der MUS81-Endonukleasekomplexe von verschiedenen Organismen festgestellt. Aufgrund vieler widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich der Fähigkeit intakte HJs prozessieren zu können, herrscht Unklarheit über die Funktion des MUS81-Endonukleasekomplexes als HJ-Resolvase.

In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden, neben einem MUS81-Homolog, zwei Homologe des Interaktionspartners, AtEME1A und AtEME1B, identifiziert. Das Ziel dieser Arbeit war es, die beiden Endonukleasekomplexe MUS81-EME1A und MUS81-EME1B von *A. thaliana* biochemisch zu analysieren und Gemeinsamkeiten und Unterschiede in ihren enzymatischen Aktivitäten zueinander und im Vergleich zu bereits charakterisierten MUS81-Endonukleasekomplexen anderer Organismen herauszuarbeiten.

Um dies zu erreichen sollten AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B funktionell exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Dazu sollten ein geeignetes Expressionssystem und -bedingungen gewählt, sowie eine optimierte Reinigungsstrategie ausgearbeitet werden. Als Qualitätskontrolle der Aufreinigung sollten nicht-funktionelle AtMUS81-EME1-Komplexe mit einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum der katalytischen Untereinheit AtMUS81 hergestellt werden. Nach der Überprüfung der Qualität der aufgereinigten AtMUS81-Endonukleasekomplexe sollten die Reaktionsbedingungen der Enzymassays optimiert und einige grundlegende biochemische Eigenschaften von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B analysiert werden. Im Vordergrund stand die Analyse der Prozessierung der HJ-Struktur, welche ein zentrales Rekombinationsintermediat darstellt. Dafür sollte die Prozessierung einer intakten und einer genickten HJ im Vergleich getestet und eine genaue Bestimmung der Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B in allen vier HJ-Armen vorgenommen werden. Dadurch sollte ein komplettes Schnittmuster der HJ-Prozessierung für beide Homologe erstellt werden. Als weiteres DNA-Substrat sollte eine 3'-Überhang-Struktur getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Plasmide

pETDuet-1, Novagen

Der Vektor pETDuet-1 besitzt zwei multiple Klonierungsstellen (MCS) zur Ko-Expression zweier rekombinanter Gene. Die klonierten Gene beider MCS stehen unter der Kontrolle eines T7/lacO-Promotors, was die Expression in einem geeigneten Wirtstamm (BL21(DE3)) ermöglicht.

pETDuet-1-MUS(d)- EME1A, (Dürr, 2004)

pETDuet-1-MUS(d)- EME1B, (Dürr, 2004)

pETDuet-1-MUS81-/ MUS81(D470-471A)-EME1A, (Geuting, 2005)

pETDuet-1-MUS81-/ MUS81(D470-471A)-EME1B, (Geuting, 2005)

pETDuet-1-MUS81-/ MUS81(D470-471A)-EME1A-StrepII, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-MUS81-/ MUS81(D470-471A)-EME1B-StrepII, in dieser Arbeit kloniert

Die Bezeichnung MUS81(D470-471A) bedeutet, dass zwei Aminosäureaustausche im MUS81-Protein in den Positionen 470 und 471 vorhanden sind, bei denen jeweils die Aminosäure Aspartat (D) durch Alanin (A) ausgetauscht wurde.

3.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Klonierungsstamm

DH5 α , Genotyp: F⁻, ϕ 80dlacZAM15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA96, relA1

Expressionsstämme

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

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]

Die Expressionsstämme besitzen eine chromosomale, durch IPTG-induzierbare Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, welches unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht, und das zugehörige Repressor-Gen *LACI*. In Verbindung mit dem pET-Vektorsystem, bei dem die

rekombinanten Gene unter Kontrolle des T7/lacO-Promotors stehen, kann die Expression der Zielproteine mittels Induktion der T7-RNA-Polymerase kontrolliert werden.

3.1.3 Oligonukleotide

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

3.1.3.1 Primer für die Klonierung und Sequenzierung

Mutagenese- und Klonierungsprimer

Start- und Stopp-Codon sowie die entsprechenden Restriktionsschnittstellen sind fett markiert. Das unterstrichene T in VG3-Mus-BglII wurde in den Primer eingefügt, um den richtigen Leserahmen zu erhalten. In dem Primerpaar Mus_M_F1 und Mus_M_R1 ist die Punktmutation fett markiert und unterstrichen.

AtMUS81

VG1-Mus-**ATG** 5`- TG **ATG** GAT GAC GAG AGA C
VG2-Mus-**Stop** 5`- **TCA** TTC ACC CCA AAC TAA C
VG3-Mus-**BglII** 5`- TG CTA **GAT CTT** GAT GAC GAG AGA CGG GTA C
VG4-Mus-**Sall** 5`- T GCT **GTC GAC TCA** TTC ACC CCA AAC TAA C

AtMUS81(D470-471A)

Mus_M_F1 5`- AGG AAG AAC GTT **GCT GCT** ATG CGC TCA TCA
Mus_M_R1 5`- TGA TGA GCG CAT **AGC AGC** AAC GTT CTT CCT

Sequenzierungsprimer

Die Werte in den Klammern geben die Lage der Primer auf dem pETDuet-1 Vektor an.

Multiple-Klonierungsstelle 1: (AtMUS81 bzw. AtMUS81(D470-471A))

FW1new 5`- GAT GCG TCC GGC GTA GAG (5357-5374)
RW1new 5`- GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA (228-209)

Multiple-Klonierungsstelle 2: (AtEME1A bzw. AtEME1B)

FW2 5`- GTA ATC GTA TTG TAC ACG (180-197)
RW2 5`- GGT TAT GCT AGT TAT TGC (472-455)
PrevA 5`- GAA CCA TCA CCC TAA TCA AG (668-649)

pETDuet-1-StrepII

Strep_int_fw 5`- GG AGC CAC CCG CAG TTC (301-317)

AtMUS81 bzw. AtMUS81(D470-471A)

Mus81seq1 5`- CTC ATC TTC TTT GGC ATC A (ORF: 1149-1167)

Mus81-REV 5`- GAT GTT GAA TTC AGA GCA TAT G (ORF: 1338-1317)

Mus81_fw 5`- CAA TCA GCG ATG TAT TTG C (ORF: 1793-1811)

AtEME1A

Eme1seq2 5`- GAA AAA AGC AGA CCA TAA CTT C (ORF: 506-527)

AtEME1B

Eme1B_fw 5`- CTT AAG GTT TAT ATG GAT CG (ORF: 1450-1469)

Eme2seq1 5`- GAG GTT GTT TCT GAC CAA G (ORF: 496-514)

3.1.3.2 Oligonukleotide für StrepII-Tag

StrepII_sense 5`- C AGT GCT TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA C

StrepII_antisense 5`- CT AGG TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA AGC
ACT GGT AC



3.1.3.3 Oligonukleotide für Endonuklease-Assays

Die Oligonukleotide für die Substratherstellung wurden HPLC-gereinigt.

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

Die mit folgenden Farben gekennzeichneten Oligonukleotide stellen komplementäre Sequenzen dar: hellblau und dunkelblau, orange und rot, hellgrün und dunkelgrün, sowie rosa und violett. Das jeweils radioaktiv markierte Oligonukleotid am 5'-Ende ist fett markiert und geht keine Basenpaarung ein.

Oligo	Sequenz 5'-3'	Anzahl (Nt)
HJ1	GAACGTCATAGACGATTACATTGCTACATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGA	50
HJ2	GTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGATCACTGGCACTGGTAGAATTCGGC	50
HJ3	TGCCGAATTCTACCAGTGCCAGTGATGGACATCTTTGCCACGTTGACCC	50

HJ4	TGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCTATGACGTT	50
nHJ3a	TGCCGAATTCTACCAGTGCCAGTGAT	26
nHJ3b	GGACATCTTTGCCACGTTGACCC	24

Für die Marker der Sequenziergele wurden die Sequenzen der entsprechenden Oligonukleotide des jeweiligen radioaktiv-markierten Stranges gewählt.

3.1.4 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in reiner Form von den Firmen Roth, Serva, Merck, Applichem oder BioRad bezogen.

Antikörper

Anti-His-Tag monoklonaler Antikörper (aus der Maus), Novagen

Anti-Maus Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (aus der Ziege), Novagen

Strep-Tactin Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat, IBA

Expression und Aufreinigung

Desthiobiotin, IBA

(2-[4'-Hydroxy-benzenazo] Benzoessäure (HABA), IBA

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Duchefa Biochemie

Kupfersulfat, Serva

Protease-Inhibitoren Mix HP, Serva

Nuklease-Assay

[γ-³²P] ATP, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, GE Healthcare

[γ-³²P] ATP, 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Hartmann Analytic

Albumin aus Rinderserum rein, Serva Feinbiochemica GmbH

Calciumchlorid, Merck

Dithiothreitol (DTT), AppliChem

Magnesiumchlorid, AppliChem

Manganchlorid, Serva

Nickelsulfat, Serva

Tris-HCl, AppliChem/ Roth

Zinkchlorid, Serva

Gelelektrophorese

Bind-Silan, Amersham Biosciences

Repel-Silan ES, GE Healthcare

3.1.5 Marker, Enzyme und Kits

Enzyme

Antarctic Phosphatase, NEB

AvrII/ XmaJI, Fermentas

BamHI, Amersham

BglII, NEB

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP), Fermentas

ExTaq Polymerase, Takara

HindIII, Fermentas

KpnI, Fermentas

Lysozym, Roche Diagnostics

Phusion Polymerase, Finnzymes MJ Bioworks

Sall, Amersham

ScaI, NEB

Taq DNA Polymerase, Biomaster

T4 DNA Ligase, Fermentas

T4 Polynukleotid Kinase, NEB

XmaJI, NEB

Kits

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

GeneRuler™1 kb DNA Ladder, Fermentas

PageRuler Prestained Protein Ladder (Plus), Fermentas
PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas
Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas

3.1.6 Verbrauchsmaterial

Affinitätsmaterial

HiTrap Chelating HP Säulen (1 ml), GE Healthcare
Strep-Tactin Superflow Säulenmaterial (50 %), IBA

Gelfiltrationsmaterial

Illustra NAPTM5 Säulen, GE Healthcare
MicroSpinTM G-25 Columns, GE Healthcare
PD10 Säulen, Sephadex G25-M, GE Healthcare
Probe QuantTM G50 Micro Columns, GE Healthcare

Weiteres

Cellophan Folien, Roth
Cellulose-Acetat Filter (0,45 µm Porengröße), Sartorius AG
D-TubeTM Dialyzer Midi, MWCO 3,5 kDa, Novagen
Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran (0,45 µm Porengröße), Roth
NeptuneTM 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

3.1.7 Ausgewählte Geräte und Software

Aufreinigung (sowie Expression und Detektion)

Certomat® IS Inkubationsschüttler, B. Braun Biotech International
Millipore Wasseraufbereitungssystem, SimplicityTM
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

Autoradiographie

BAS-Kassetten 2040, FUJIFILM Japan

BIO-Imaging-Analyser BAS-1500, FUJIFILM Japan

Geltrockner, Phero-Temp 60, Biotec- Fisher

Imaging Platten, 20 x 40 cm, FUJIFILM Japan

Instant Imager, Canberra Packard Company

Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100 TR, Packard Instrument Company

Nuklease-Assay

Heiz/ Kühlblock ThermoE, Biostep

Thermo Cooler, BIOzym

ThermoStat Plus, Eppendorf

Thermo Shaker TS-100, lab4you

Vortex-Zentrifuge, NeoLab

Gelelektrophorese-Systeme

PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S, Peqlab Biotechnologie GmbH

SE 600 Series, Hoefer Scientific Instruments

Sequenziergelsystem Model S2, Bethesda Research Laboratories

Sequenziergelglasplatten, GIBCO BRL S2, 39,4 cm x 33,3 cm, 41,9 cm x 33,3 cm, Whatman
Biometra

Kamm mit 32 Taschen 0,4 mm, Biometra

Spacer-Set 0,4 mm, Biometra

Whatman Multigel-Long, Biometra

Software

DNASTar Version 5.03, Lasergene, DNASTAR Inc.

ImageJ, Version 1.36b, Wayne Reasband, 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

Aida Image Analyzer v.3.11

3.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und MilliQ Wasser (doppelt-deionisiert, dd) hergestellt.

Acrylamidgele (Lösungen und Puffer)

30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5:1, Rotiphorese, Roth

40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 19,0:1, Rotiphorese, Roth

36 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 36,0:4, Rotiphorese, Roth

Die Acrylamid-Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und anschließend mit Mischbett-Ionenaustauscher TMD-8 (Sigma) versetzt, Lagerung bei 4 °C

Ammoniumpersulfat (APS): 10 % (w/v) in ddH₂O, Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C

Nativer Nukleinsäure-Puffer (5x): 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25 % Glycerin, 5 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylene-Cyanol FF, BioRad

Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lösung: 10 % (w/v) in ddH₂O

SDS-PAGE Laufpuffer (10x): 250 mM Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3

SDS-PAGE Probenpuffer, denaturierend (2x): 125 mM Tris, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % Thioglycerin, pH 6,8

SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Lagerung bei 4 °C

SDS-PAGE Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, Lagerung bei 4 °C

TBE-Puffer (10x): 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0

Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese-Ladepuffer (6x): 0,2 % Orange G, 0,05 % Xylene-Cyanol FF, 10 % Glycerin, 60 mM EDTA

Kristallviolett (KV)-Ladepuffer (6x): 30 % Glycerin, 0,02 M EDTA, 0,1 mg/ml KV in ddH₂O

TAE-Puffer (50x): 242 g Tris-Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

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

DNA-Substrataufreinigung

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

Nuklease-Assays

Standard Assay-Puffer (5x): 250 mM Tris-HCl, 12,5 mM MgCl₂, pH~7,0, später: 125 mM
Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 500 µg/ml BSA, 5 mM DTT

Standardreaktionsbedingungen (1x): 50 mM/25 mM Tris-HCl, 2,5 mM/1 mM MgCl₂,
100 µg/ml BSA, 1 mM DTT

Stopp-Lösung (3x): 50 mM EDTA, 0,6 % SDS, 20 % Glycerin, 0,1 % Xylencyanol, 0,1 %
Bromphenolblau

Formamid-Mix (1x): 100 % Formamid, 0,1 % Xylene-Cyanol FF, 0,1 % Bromphenolblau

TBE-Urea-Puffer (2-3x): 89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 7 M

Harnstoff, 12 % Ficoll, 0,01 % Bromphenolblau, 0,0 2% Xylene-Cyanol FF

Der TBE-Urea-Puffer wurde sowohl 2x (20 µl Probe + 20 µl Puffer), als auch 3x (20 µl
Probe + 10 µl Puffer) eingesetzt.

Medien

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

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

Proteinaufreinigungen

Binde-/Waschpuffer für Cu-IMAC (Puffer C): 50 mM Na₂HPO₄, 200 mM KCl, 40 mM
Imidazol, 10 % Glycerin, pH 7,0

Binde-/Waschpuffer für Strep-Tactin (Puffer A): 100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM
DTT, 0,1 % Tween20, pH 7,0

Elutionspuffer für Cu-IMAC (Puffer D): 50 mM Na₂HPO₄, 200 mM KCl, 400 mM Imidazol,
10 % Glycerin, pH 7,0

Elutionspuffer für Strep-Tactin (Puffer B): 100 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT,
0,1 % Tween20, 3 mM Desthiobiotin, pH 7,0

Enzym-Glycerinpuffer (1x): 50 mM Tris-HCl, 12,5 mM KCl, 50 % Glycerin, 1x Serva

Proteaseinhibitoren, 5 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 % Tween20

Glycerin-Mix für Proteinfractionen (2x): 100 % Glycerin, 2x Serva Proteaseinhibitoren,

10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,2 % Tween20

Lagerungspuffer für Proteinfractionen (1x): 100 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, pH 7,0

Regenerationspuffer für Strep-Tactin: 100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 %

Tween20, 5 mM HABA, pH 7,0

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

Kolloidal-Coomassie-Färbung nach Neuhoff (1988)

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 % Ethanol 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

Fixier-Lösung für SDS-Gele: 40 % Ethanol (v/v), 10 % (v/v) Essigsäure

Western-Blot

AK-Lösung (1x): PBS-Puffer (später TBS) + 0,25 % Tween20, 1 % BSA, Spur Natriumazid

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

Alkalische Phosphatase Puffer (AP-Puffer) für NBT/BCIP (1x): 100 mM Tris-HCl,

100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,5

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

Färbelösung Western Blot: 10 ml 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

Anti-Maus Alkalische Phosphatase-Konjugat (aus der Ziege) (Novagen): 1:10000 in AK-Lösung

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

Strep-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat (IBA): 1:4000 in AK-Lösung

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 Herstellung der Konstrukte, Klonierungen

3.2.1.1 *AtMUS81* in pETDuet-1

Das *MUS81*-Gen wurde in einer PCR mit den Primern VG1-Mus-ATG und VG2-Mus-Stop aus der cDNA von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia mit der ExTaq Polymerase in 15 Zyklen amplifiziert. Anschließend wurde ein Teil des aufgereinigten PCR-Produktes mittels der Linker-Primer VG3-Mus-BglII und VG4-Mus-Sall in weiteren 20 Zyklen mit der Phusion-Polymerase mit terminalen Restriktionsschnittstellen versehen. Um die Konstrukte in die gewünschte Klonierungsschnittstelle des Plasmides zu inserieren, wurde das PCR-Produkt mit BglII und Sall geschnitten. Der pETDuet-1 Vektor wurde mit BamHI und Sall geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Die Schnittstellen von BamHI und BglII sind kompatibel. Das DNA-Insert wurde in die erste MCS des vorbereiteten Vektors ligiert und erhielt somit einen N-terminalen Hexa-Histidin-Tag (His-Tag). Die korrekte Nukleotidsequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert (Geuting, 2005).

3.2.1.2 *AtMUS81(D470-471A)* in pETDuet-1

Boddy *et al.* konnten 2001 zeigen, dass die *MUS81*-Endonuklease durch gezielt eingeführte Punktmutationen im aktiven Zentrum, was zum Austausch der Aspartat-Reste (D) durch Alanin (A) führt, endonukleolytisch inaktiv ist. Daher wurden in den ORF des *MUS81*-Gens durch ortsspezifische Mutagenese (Overlap-Extension-PCR) die entsprechenden zwei Punktmutationen eingeführt. Dazu wurde in einem ersten Schritt zur Einführung der Punktmutationen das *AtMUS81* PCR-Produkt in zwei getrennten PCRs mit den Primerpaaren VG3-Mus-BglII/ Mus_M_R1, bzw. VG4-Mus-Sall/ Mus_M_F1 in 20 Zyklen amplifiziert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Assemblierung der beiden Teil-PCR-Produkte mit den Primern VG3-Mus-BglII und VG4-Mus-Sall in weiteren 20 Zyklen. Beide Reaktionen wurden mit der Phusion-Polymerase durchgeführt. Das fertige Mutantenkonstrukt wurde entsprechend dem *AtMUS81* ORF in die erste MCS des pETDuet-1-Vektors ligiert und erhielt

somit einen N-terminalen His-Tag. Die korrekte Nukleotidsequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert (Geuting, 2005).

3.2.1.3 *AtEME1A* bzw. *AtEME1B* in pETDuet-1-MUS81 bzw. pETDuet-1-MUS81(D470-471A)

In einem zweiten Klonierungsschritt wurde in die Vektoren pETDuet-1-MUS81 bzw. pETDuet-1-MUS81(D470-471A) der ORF für die beiden homologen Interaktionspartner von MUS81, nämlich *AtEME1A* bzw. *AtEME1B* eingefügt. Dazu wurde der jeweilige ORF aus den Vektoren pETDuet-1-MUS(d)-EME1A bzw. pETDuet-1-MUS(d)-EME1B herausgeschnitten und in die zweite MCS der bereits vorhandenen Vektoren pETDuet-1-MUS81 bzw. pETDuet-1-MUS81(D470-471A) über die Schnittstellen BglII und KpnI ligiert. Sie erhielten somit einen C-terminalen S-Tag (Geuting, 2005).

Da eine Aufreinigung von Proteinen über das S-Tag-System nicht unter nativen Bedingungen möglich war und die Methode einen Verlust von Zielprotein zur Folge hatte, wurde ein alternatives Affinitäts-Tag-System gewählt (Geuting, 2005).

Ausgehend von diesen bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Geuting, 2005) klonierten Vektoren, wurde der im Ursprungsvektor pETDuet-1 vorhandene S-Tag durch einen StrepII-Tag durch weitere Klonierung ersetzt.

3.2.1.4 Umklonierung: Austausch S-Tag durch StrepII-Tag

Der StrepII-Tag wurde durch Erhitzen und langsames Abkühlen der Oligonukleotide StrepII_sense und StrepII_antisense gebildet. Nachdem der S-Tag aus den Vektoren pETDuet-1-MUS81-/ MUS81(D470-471A)-EME1A bzw. pETDuet-1-MUS81-/ MUS81(D470-471A)-EME1B ausgeschnitten wurde, wurde der fertige StrepII-Tag mit den Schnittstellen KpnI und XmaII in die jeweiligen Vektoren ligiert. Die korrekte Nukleotidsequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

3.2.2 Expression und Protein-Aufreinigungen

3.2.2.1 Expression

Die Expression der Proteine erfolgte für die endgültigen Aufreinigungen in BL21(DE3)-Zellen. Dazu wurden 1 µl des jeweiligen Plasmids durch Hitzeschock-Transformation in die kompetenten Zellen eingebracht und die Zellen auf LB-Ampicillin-Platten selektioniert.

Für die Vorkultur wurde LB-Medium mit dem selektionierenden Antibiotikum Carbenicillin mit ca. 3 Kolonien pro 100 ml Medium angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. Für die Expressionskultur wurden je 500 ml LB-Medium mit 50 ml Vorkultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,6-0,9 erreicht war. Dann wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und für weitere 6 Stunden bei einer Temperatur von 21 °C wachsen gelassen. Die Ernte der Expressionskultur erfolgte für 15 min bei 4 °C und 4000 Upm, das Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert.

Variationen zur Optimierung der Proteinexpression werden hier nicht einzeln aufgeführt und sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

3.2.2.2 Aufreinigung

Hier werden nur jene Bedingungen aufgeführt, die für die endgültigen Aufreinigungen von AtMUS81-EME1A, AtMUS81-EME1B und der jeweiligen Mutanten-Konstrukte verwendet wurden. Variationen zur Optimierung sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Vorbereitung der Probe:

Zellkultur-Ausgangsvolumen (als Zellpellet) 750 ml

- 1) Pellet auf Eis auftauen und in 30 ml Puffer A resuspendieren
- 2) Zugabe von 0,1 mg/ml Lysozym (in Puffer A)
- 3) Inkubation auf Eis für 45 min auf dem Taumelschüttler
- 4) Ultraschallaufschluss auf Eis: 6 Zyklen (Leistung 53 %, Duty Cycle 5, 10 sec), nach jedem Intervall 1 min auf Eis, um Überhitzung zu vermeiden
- 5) Ultrazentrifugation 40000 g, 30 min, 4 °C
- 6) Überstand durch Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran filtrieren

=> **Lösliche Proteinfraktion**

- 7) Zugabe von 2 µg/ml Avidin (soll Bindung biotinylierter Proteine an Säulenmaterial verhindern)

Vorbereitung des Strep-Tactin-Säulenmaterials:

Für jedes Konstrukt wurde gesondertes Affinitätsmaterial und eine eigene Schwerkraftsäule verwendet.

- 8 ml Suspension (entspricht 4 ml Säulenmaterial) in Puffer A equilibrieren

Strep-Tactin-Chromatographie:

- Lösliche Proteinfraction auf die Säule laden
- viermal mit je 2 ml Puffer A waschen, anschließend mit weiteren 10-15 ml Puffer A waschen
- 10 Mal je 1 ml Puffer B auf die Säule pipettieren und Eluat auffangen

Regeneration des Strep-Tactin-Säulenmaterials:

- 20 ml Regenerationspuffer für Strep-Tactin
- Affinitätsmaterial in 4 ml Regenerationspuffer mit Natriumazid bei 4 °C aufbewahren

Weiterbehandlung der Elutionsfraktionen:

- Eluat der Strep-Tactin-Chromatographie auf 10 ml mit Puffer B auffüllen
- Umpuffern über equilibrierte PD10-Säulen in Puffer C

Vorbereitung der 1ml HiTrap Chelating HP Säule:

Für jedes Konstrukt wurde eine eigene Säule verwendet. Verwendung der BioRad Anlage.

- 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 waschen
- 4) Restliches gebundenes Cu²⁺ mit Stripping-Puffer von der Säule waschen
- 5) Säule mit ddH₂O waschen, bis Leitfähigkeit wieder den Normalwert für ddH₂O erreicht hat
- 6) Säule mit 0,5 ml CuSO₄-Lösung (0,1 M) beladen
- 7) Säule mit ddH₂O waschen
- 8) 10-15 min Puffer D (um Säule von überschüssigem Cu²⁺ zu befreien)
- 9) 20 min Puffer C (Equilibrieren der Säule)

Cu²⁺-Affinitätschromatographie:

Flussrate: 0,5 ml/min

- Beladen der Cu²⁺-Säule mit Eluat der PD10-Säule

Flussrate: 1 ml/min

- 35-45 min Waschen mit Puffer C

Flussrate: 0,5 ml/min

- 20 min Elution mit 100 % Puffer D

Regeneration der Cu²⁺-Säule:

Flussrate: 1 ml/min

- 10 min Puffer D
- Waschen mit ddH₂O
- Konservieren der Säule in 20 % Ethanol

Weiterbehandlung und Lagerung der Elutionsfraktionen:

- MUS81-EME1-haltige Elutionsfraktionen über eine equilibrierte NAP5-Säule in Lagerungspuffer für Proteinfractionen umpuffern
- Fraktionen mit gleichem Volumen Glycerin-Mix versetzen und bei -20 °C lagern

3.2.2.3 SDS-PAGE und Western-Blot

Zur Analyse der Aufreinigungen wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Lämmli (1970) verwendet. Die Prozentigkeit der jeweiligen Trenngele ist dem Ergebnisteil zu entnehmen. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind im Materialteil aufgeführt. 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 Ladedepuffer, 15 µl zu analysierende Probe; hitzedenaturiert) geladen.

Die Gele wurden geblottet oder nach dem Fixieren 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. Die Stromstärke (in mA) errechnete sich aus der Fläche der Membran (in cm²), multipliziert mit dem Faktor 0,8. Es wurde für 2 Stunden geblottet.

3.2.2.4 Proteinquantifizierung und -lagerung

Für die Quantifizierung der Proteinfractionen mittels SDS-PAGE und anschließender Kolloidal-Coomassie-Färbung wurden als Standard BSA-Verdünnungen definierter Proteinmengen verwendet. Die Auswertung mit Hilfe der ImageJ-Software erfolgte über die Integrale der Graustufeneinheiten der Protein-Banden.

Die endgültigen Proteinproben wurden gepoolt, in 0,2 ml Neptune™ Flat Cap PCR Tubes aliquotiert und weiterhin bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Endonuklease-Assay

3.2.3.1 Prinzip

In dieser Arbeit wurde die Endonukleaseaktivität der AtMUS81-EME1-Komplexe mit verschiedenen radioaktiv markierten DNA-Substraten getestet und eine Bestimmung der Schnittmuster vorgenommen. Gemessen wird der enzymatische Umsatz der putativen DNA-Substrate als entstandene Schnittfragmente der verzweigten oder teilweise überkreuzten Duplex-Strukturen. Dabei wird ausgenutzt, dass sich das Substrat und das (die) Produkt(e) der Endonukleasereaktion in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden. Bei einer Auftrennung auf einem nativen Gel oder einem denaturierenden Sequenziergel mit anschließender Autoradiographie werden alle DNA-Spezies sichtbar, welche eine radioaktive Markierung tragen. Somit kann die Schneideaktivität der Proteinkomplexe nachgewiesen und quantifiziert werden.

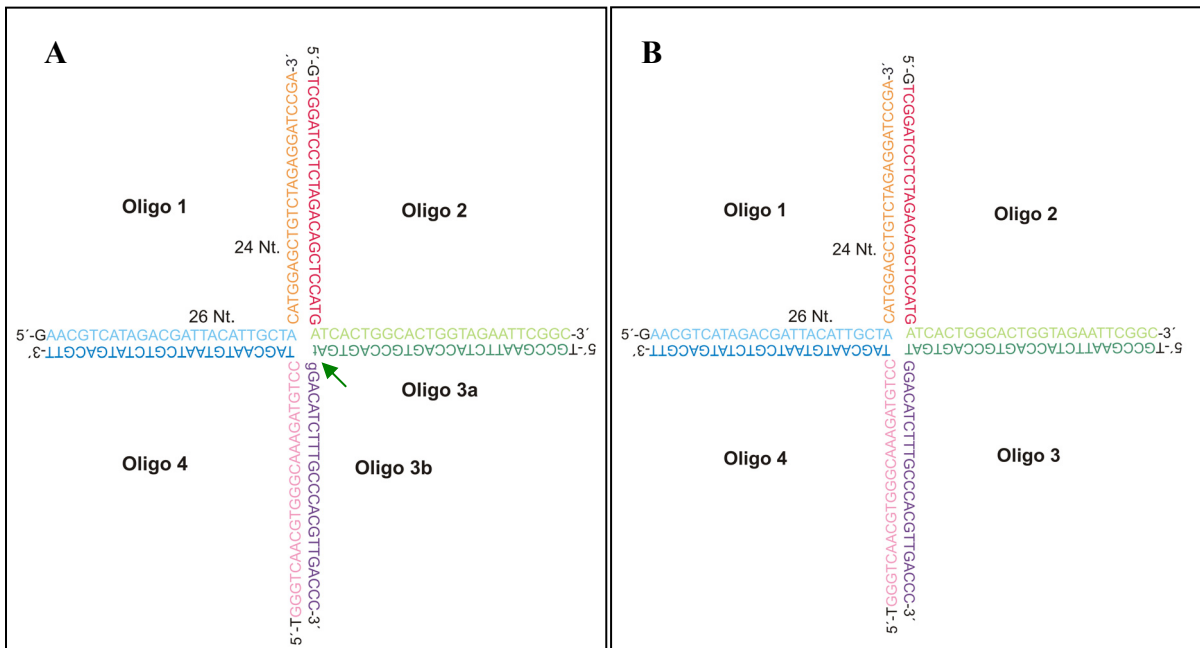
3.2.3.2 Herstellung der DNA-Substrate für den Endonuklease-Assay

Mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) wurden die gewünschten Oligonukleotide zunächst 5'-terminal phosphoryliert, wobei das γ -Phosphat des [γ -³²P] ATP übertragen wird. Der Reaktionsansatz von 50 μ l wurde dazu für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für weitere 30 min bei 67 °C hitzeinaktiviert. Zur Abtrennung von überschüssigem ATP wurde der Ansatz über eine G25-Spin-Column nach Herstellerangaben gereinigt – zu Beginn der Arbeit wurden keine G25-Spin-Columns verwendet, sondern das ATP erst während der Substrataufreinigung abgetrennt. Zur Quantifizierung der spezifischen Aktivität des markierten Oligonukleotids wurde 1 μ l Eluat der G25-Spin-Column mit 4 ml Lumasafe Plus Cocktail gemischt und die Zerfälle pro Minute (DPM) im LSC gemessen.

Die Hybridisierung der verschiedenen Oligonukleotide, welche die gewünschte Struktur ausbilden, wurde erreicht, indem die teilweise komplementären Oligonukleotide in geeignetem Verhältnis (Tabelle 4) zusammengegeben wurden, der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt wurde und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde (Annealing) (Abbildung 8). Anschließende Aufreinigungsschritte der Substrate zur Abtrennung von nicht hybridisierten Oligonukleotiden sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4: Herstellung der DNA-Substrate

Substrat	Oligonukleotide (s. Tabelle 1) (³² P-Markierung = *) & molare Verhältnisse bei Annealing	Aufreinigungsmethode(n)
3'-Überhang	HJ1* + nHJ3b + HJ4 1 : 4 : 4	Gelextraktion aus 10 % TBE-PAGE-Gelen - Gelelution mittels QIAEX II® Gel Extraction Kit (150) nach Herstellerangaben oder - Gelfiltration über NAP-5-Säule mit TBMgCl ₂ -Puffer
Holliday-Junctions (XO und nXO)	XO: HJ1* + HJ2 + HJ3 + HJ4 HJ2* + HJ1 + HJ3 + HJ4 HJ3* + HJ1 + HJ2 + HJ4 HJ4* + HJ1 + HJ2 + HJ3 1 : 5 : 5 : 5 nXO: HJ1* + HJ2 + nHJ3a + nHJ3b + HJ4 1 : 5 : 10 : 10 : 5 HJ1 + HJ2* + nHJ3a + nHJ3b + HJ4 5 : 1 : 10 : 10 : 5 HJ1 + HJ2 + nHJ3a + nHJ3b + HJ4* 5 : 5 : 10 : 10 : 1 HJ1 + HJ2 + nHJ3a* + nHJ3b + HJ4 5 : 5 : 1 : 10 : 5	Gelextraktion aus 10 % TBE-PAGE-Gelen - Gelelution in 0,5 x TBMgCl ₂ mit Hilfe des Biotrap Elektroelutionssystems (mit kleiner Elutionskammer, siehe Anleitung des Herstellers) oder - Gelelution in 0,5 x TBMgCl ₂ mit D-Tube-Dialyzer bei 100 Volt für ca. 4 Stunden unter ständiger Kühlung; Nach Elution Umpolen bei 200 Volt für ca. 2 min, Eluat nach Auf- und Abpipettieren in frisches Eppi überführen



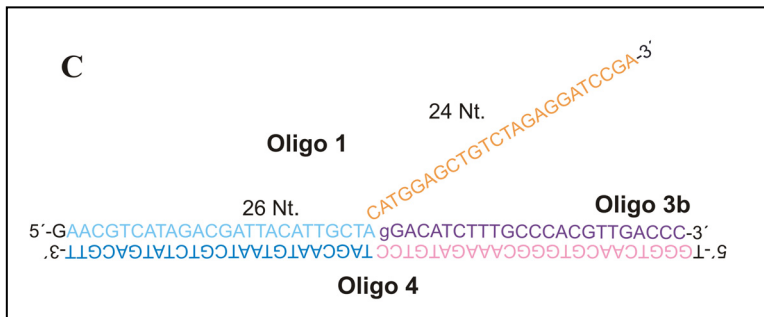


Abbildung 7: Struktur und Sequenz der DNA-Substrate. A, genickte HJ (nXO); der grüne Pfeil markiert den Nick in der HJ; B, intakte HJ (XO); C, 3'-Überhang. Die komplementären Sequenzen der Oligonukleotide sind in den jeweiligen Farben aus Tabelle 1 dargestellt. Die unmittelbar an den Nick angrenzenden Oligonukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Die DNA-Substrate (Abbildung 7) für die endgültigen Assays wurden alle mittels Gelextraktion und anschließender Geelution mit D-Tube-Dialyzer gewonnen.

Als Größenstandard wurden die entsprechenden Oligonukleotide mit den Größen 10, 15, 20 und 25 Nukleotiden radioaktiv markiert und über eine G25-Spin-Column aufgereinigt.

3.2.3.3 Quantifizierung der DNA-Substrate

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 ($\text{Bq} = 1/\text{sec}$)) in der aufgereinigten DNA-Substratprobe.

Die spezifische Aktivität des markierten Oligonukleotids am Markierungsdatum wird nach der Abreinigung des überschüssigen ATPs über eine G25-Spin-Column (nach Herstellerangaben) bestimmt. Dazu wird die Aktivität eines Aliquot des Eluats ($1 \mu\text{l}$) im LSC gemessen (in DPM) und die **spezifische Aktivität** unter Annahme einer 100 %igen Elutionseffizienz der G25-Säule über folgende Formel berechnet:

$$(1) \quad A_{\text{spez}}(t_0) = A(t_0) / N(t_0)$$

Die spezifische Aktivität gibt die Aktivität pro Stoffmenge an.

Um die Substratmenge zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu bestimmen braucht man die spezifische Aktivität zu diesem Zeitpunkt, die sich über die Markierungsrate berechnet.

Markierungsrate von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$, 3000 Ci/ mmol

Die Zerfallskonstante λ stellt die Zerfallswahrscheinlichkeit dar. Die Anzahl der gemessenen Zerfälle (A) ist gleich dem Produkt der vorhandenen radioaktiven Moleküle (N^*) und λ .

$$(2) \quad A = \lambda \cdot N^*$$

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

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

Wenn zum Kalibrierungszeitpunkt also 3000 Ci/mmol ATP gemessen werden sollen, bedeutet dies nach (2):

$$(4) \quad 3000 \text{ Ci} = (\ln 2) / 1235520 \text{ sec} \cdot N^*$$

(Die Einheit Becquerel (Bq) bezeichnet 1 Zerfall pro Sekunde, 1 Curie (Ci) hingegen sind $3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Zerfälle/ Sekunde}$.)

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

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

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

$$(5) \quad N^* / N_0 = 1,97855 \cdot 10^{20} / (6,022 \cdot 10^{20}) = 0,328$$

Das bedeutet, dass nur 32,8 % des eingesetzten [γ - ^{32}P] ATP radioaktiv markiert und 67,2 % nicht radioaktiv markiert sind. Es wird angenommen, dass dieses kalte ATP (bzw. Substrat) nicht zerfallen und auch nicht durch den radioaktiven Zerfall eines Nachbarmoleküls geschädigt wird, wobei letzteres dadurch zerstört wird.

Ausgehend vom Zerfallsgesetz $N(t) = N_0 \cdot e^{(-\lambda \cdot t)}$ berechnet sich die **spezifische Aktivität zu einem beliebigen Zeitpunkt** daher als:

$$(6) \quad A_{\text{spez}}(t) = \frac{A(t)}{N(t)} = \frac{A(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t)}}{(N(t_0) - N^*(t_0)) + (N^*(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t)})}$$

Am Beispiel des [γ - ^{32}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:

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

Entspricht der Tag der Markierung und Aufreinigung des Oligonukleotids (t_0) nicht gleichzeitig dem Tag der Herstellung und Messung des fertigen, aufgereinigten DNA-Substrats (t_1), gilt:

$$(7) \quad c(t_1) = (A(t_1)/V) / A_{\text{spez}}(t_1)$$

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

und $A_{\text{spez}}(t_1)$ muss nach (6) (über $A(t_0)$, $N(t_0)$ und $N^*(t_0)$ mit Hilfe der Formeln (2) bis (5)) neu berechnet werden.

So kann die Substratkonzentration für jeden beliebigen Zeitpunkt berechnet werden.

3.2.3.4 Durchführung und Auswertung des Endonuklease-Assays

Der Reaktionsansatz enthielt in der Regel 3 µl Enzym bzw. in Enzym-Glycerinpuffer verdünntes Enzym und 17 µl Mastermix, bestehend aus dem Standard-Assaypuffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂ Endkonzentration) und radioaktivem Substrat definierter Konzentration. Das Protein wurde in PCR-Reaktionsplatten auf einem Kühlblock vorgelegt und der Assay durch Zugabe des Mastermixes gestartet. Für die Zeitkinetikanalysen wurde ein Mehrfachansatz in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt und Proben zu definierten Zeitpunkten entnommen. Die Inkubation erfolgte für die gewünschte Zeit bei 37 °C auf einem Heizblock.

Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von 10 µl TBE-Urea-Puffer und anschließender Hitzedenaturierung für 5 min bei 95 °C oder durch die Zugabe von 10 µl Stopp-Lösung abgestoppt.

Für die Aufbereitung der Proben für die Sequenziergele wurden verschiedene Methoden getestet, um eine optimale Auftrennung und Bandenschärfe der Gele zu erzielen. Getestet wurden Lyophilisierung und Ethanol-Präzipitation. Die so aufkonzentrierten Proben wurden anschließend in Formamid oder TBE-Urea-Puffer aufgenommen und auf das Gel geladen. Da beide Methoden der Aufkonzentrierung nicht reproduzierbar, die Quantifizierung aufgrund von Überexposition der Gele nicht möglich war und die Proben mit Formamid bei der Elektrophorese größtenteils nicht ins Gel eingewandert sind, sondern in den Geltaschen zurückgehalten wurden, wurde auf die weitere Aufbereitung der Assayproben verzichtet und wie oben beschrieben fortgeführt.

Die Auftrennung der Proben erfolgte entweder mittels nativer TBE-PAGE-Gele (10 %) bei 4 °C oder denaturierender TBE-PAGE-Gele (20 %) mit 7 M Urea bei 53 °C. Die TBE-Urea-Sequenziergele (7 M Urea, 20 %, (36 %T 4 %C)) wurden vor dem Beladen bei konstanter Leistung von 60 Watt und maximaler Spannung von 2500 Volt auf mindestens 40 °C erwärmt und die Proben bei gleicher Einstellung aufgetrennt.

Die Auswertung der TBE-PAGE-Gele erfolgte autoradiographisch durch Detektion im Instant Imager über die Imager-Software. Nachdem die Sequenziergele auf einer der silanisierten Glasplatten und abgedeckt mit Cellophan-Folie für etwa 2 Stunden bei 80 °C unter Vakuum (300 mbar) trockneten, wurden die Imager-Platten aufgelegt und anschließend im Bio-Imaging Analyzer BAS 1500 dokumentiert und ausgewertet (Abbildung 8).

Für die Quantifizierung zur Bestimmung des Anteils an prozessiertem Substrat (= Produkt), wurden die entstandenen Produktfragmente ins Verhältnis zum nicht-prozessierten Substrat gesetzt.

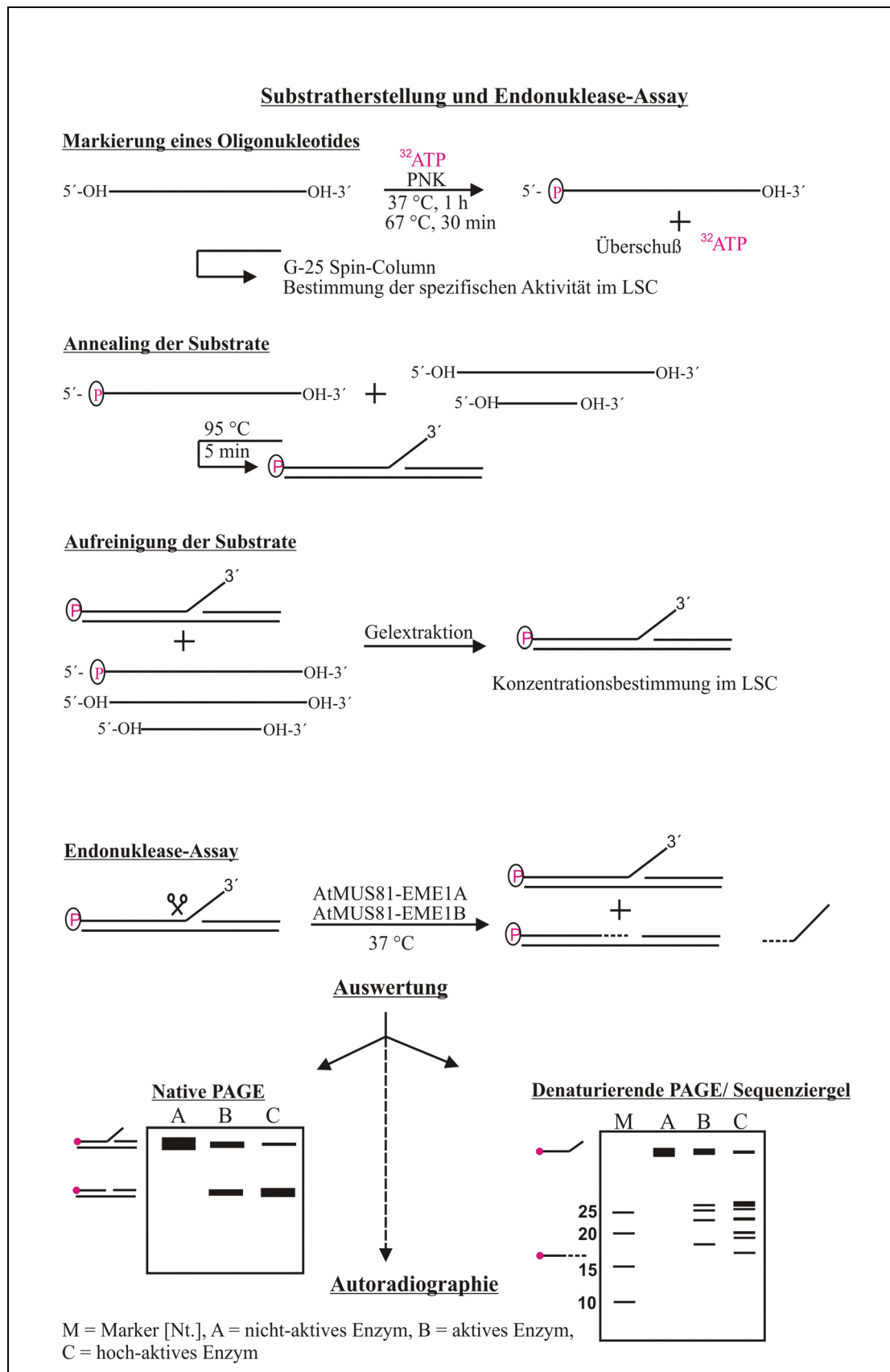


Abbildung 8: Überblick und schematische Darstellung der Schritte zur Substratherstellung und für den Endonuklease-Assay. Die einzelnen Schritte sind dem Text zu entnehmen.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung der verwendeten AtMUS81-EME1-Konstrukte

Aufbauend auf den aus meiner Diplomarbeit (Geuting, 2005) stammenden Konstrukten pETDuet-1-MUS81-EME1A und pETDuet-1-MUS81-EME1B bzw. den jeweiligen Konstrukten mit eingefügtem Aminosäureaustausch pETDuet-1-MUS81(D470-471A)-EME1A und pETDuet-1-MUS81(D470-471A)-EME1B wurden die Konstrukte in dieser Arbeit durch den Austausch eines Affinitäts-Tags verändert. Die endgültig in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Konstrukte.

Name	Beschreibung
pETDuet-1-MUS81-EME1A-StrepII	Für das Vorläuferkonstrukt wurde der <i>AtMUS81</i> -ORF nach einer PCR mit den Schnittstellen BglII und SalI in die MCS-1 (Schnittstellen BamHI und SalI) von pETDuet-1 ligiert. Das MUS81-Protein erhielt dadurch einen N-terminalen Hexa-Histidin-Tag. Der <i>AtEME1A</i> -ORF wurde aus dem Vektor pETDuet-1-MUS(d)-EME1A (Jasmin Dürr, 2004) mit KpnI und BglII herausgeschnitten und in die MCS-2 von pETDuet-1-MUS81 ligiert. Das <i>AtEME1A</i> -Protein erhielt dadurch einen C-terminalen S-Tag. In dieser Arbeit wurde der S-Tag aus pETDuet-1-MUS81-EME1A mit KpnI und XmaJI herausgeschnitten und der StrepII-Tag-Adapter eingefügt.
pETDuet-1-MUS81-EME1B-StrepII	Für das Vorläuferkonstrukt wurde der <i>AtMUS81</i> -ORF nach einer PCR mit den Schnittstellen BglII und SalI in die MCS-1 (Schnittstellen BamHI und SalI) von pETDuet-1 ligiert. Das <i>AtMUS81</i> -Protein erhielt dadurch einen N-terminalen Hexa-Histidin-Tag. Der <i>AtEME1B</i> -ORF wurde als PCR-Produkt mit KpnI und BglII in die MCS-2 von pETDuet-1-MUS81 ligiert. Das <i>AtEME1B</i> -Protein erhielt dadurch einen C-terminalen S-Tag. In dieser Arbeit wurde der S-Tag aus pETDuet-1-MUS81-EME1B mit KpnI und XmaJI herausgeschnitten und der StrepII-Tag-Adapter eingefügt.
pETDuet-1-MUS81(D470-471A)-EME1A-StrepII	Durch Mutagenese-PCR eingeführte Punktmutationen in den <i>AtMUS81</i> -ORF bei den Positionen 1379 bp und 1382 bp(A->C) führten zum zweimaligen Austausch von Aspartat (D) zu Alanin (A). Der <i>AtMUS81(D470-471A)</i> -ORF wurde mit BglII und SalI in die MCS-1 (Schnittstellen BamHI und SalI) von pETDuet-1 ligiert. Das <i>AtMUS81(D470-471A)</i> -Protein erhielt dadurch einen N-terminalen His-Tag. Die Klonierung des <i>AtEME1A</i> -ORF und des StrepII-Tag wurde wie bei pETDuet-1-MUS81-EME1A-StrepII vorgenommen.
pETDuet-1-MUS81(D470-471A)-EME1B-StrepII	Durch Mutagenese-PCR eingeführte Punktmutationen in den <i>AtMUS81</i> -ORF bei den Positionen 1379 bp und 1382 bp (A->C) führten zum zweimaligen Austausch von Aspartat (D) zu Alanin (A). Der <i>AtMUS81(D470-471A)</i> -ORF wurde mit BglII und SalI in die

	MCS-1 (Schnittstellen BamHI und SalI) von pETDuet-1 ligiert. Das AtMUS81(D470-471A)-Protein erhielt dadurch einen N-terminalen His-Tag. Die Klonierung des AtEME1B-ORF und des StrepII-Tag wurde wie bei pETDuet-1-MUS81-EME1B-StrepII vorgenommen.
--	--

Der ORF von AtEME1B wies einen Basenaustausch in der Basenpaar-Position 419 (Austausch Adenin durch Guanin) auf, was den Austausch der Aminosäure Asparagin zu Serin zur Folge hatte. Dieser Austausch wurde in einigen untersuchten cDNAs von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia nachgewiesen, konnte allerdings in keinem weiteren der bereits sequenzierten Ökotypen (MIPS Datenbank) bestätigt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelte. Da es sich hierbei jedoch um die nur sehr gering konservierte Region von EME1 handelt, ist keine Beeinträchtigung der Funktion dieses Proteins zu erwarten.

Die Eigenschaften der entsprechenden Proteine und der in dieser Arbeit aufgereinigten und charakterisierten Proteinkomplexe sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Eigenschaften aller Proteine und Proteinkomplexe. Die fettgedruckten Konstrukte wurden in dieser Arbeit aufgereinigt und charakterisiert.

Konstrukt	Tag	Anzahl Aminosäuren	Molekulargewicht	Isoelektrischer Punkt (pI)
AtMUS81	His-Tag, N-terminal	672	75,5 kDa	8,10
AtMUS81(D470-471A)	His-Tag, N-terminal	672	75,5 kDa	8,26
AtEME1A	StrepII-Tag, C-terminal	561	62,9 kDa	7,80
AtEME1B	StrepII-Tag, C-terminal	566	63,8 kDa	8,56
AtMUS81-EME1A	His-Tag, N-terminal; StrepII-Tag, C-terminal	1233	138,4 kDa	8,02
AtMUS81-EME1B	His-Tag, N-terminal; StrepII-Tag, C-terminal	1238	139,4 kDa	8,32
AtMUS81(D470-471A)-EME1A	His-Tag, N-terminal; StrepII-Tag, C-terminal	1233	138,3 kDa	8,14
AtMUS81(D470-471A)-EME1B	His-Tag, N-terminal; StrepII-Tag, C-terminal	1238	139,3 kDa	8,42

Die pH-Werte der jeweiligen Puffer für die Aufreinigung der einzelnen Komplexe wurden unter Berücksichtigung der entsprechenden pI-Werte gewählt. Somit konnte der pH-Wert für alle Aufreinigungspuffer auf 7,0 festgelegt werden.

4.2 Optimierung der Expression

Bei der heterologen Proteinexpression können rekombinante Proteine sowohl in löslicher Form gebildet werden oder in unlöslicher Form in Inclusion-Bodies akkumulieren. Da unlösliches Protein in den meisten Fällen in einer falsch oder unvollständig gefalteten und somit inaktiven Form vorliegt, ist es von Bedeutung die Bedingungen zur Expression von löslichem Protein zu optimieren.

Für die Aufreinigung des Anteils an nativem Protein werden lösliche und unlösliche Fraktion nach dem Zellaufschluss durch Ultrazentrifugation getrennt und der Überstand mit löslichem Protein für die Chromatographie verwendet. Die Löslichkeit rekombinanter Proteine ist von verschiedenen Parametern abhängig, wie zum Beispiel der Synthesegeschwindigkeit, welche durch die Expressionstemperatur reguliert werden kann.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Expression der Proteinkomplexe ist, beide Interaktionspartner in einem etwa gleichen Mengenverhältnis zu erhalten, um einen Überschuss an Komplexmonomeren zu vermeiden. Dies wird durch eine gleichstarke Induktion der Expression beider Promotoren der Klonierungsstellen im pETDuet-1 Ko-Expressionsvektor kontrolliert.

Im Rahmen meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Geuting, 2005) wurde bereits der Einfluss der Temperatur, verschiedener Expressionsstämme und von osmotisch wirksamen Substanzen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Expressionstemperatur von 37 °C der Großteil an rekombinantem Protein unlöslich vorlag, jedoch konnte durch die Wahl einer niedrigeren Temperatur das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein verbessert werden. Bei tiefen Temperaturen nahm die Gesamtmenge an synthetisiertem Protein zwar ab, aber es wurde mehr lösliches Protein gebildet. Somit wurden eine optimale Expressionstemperatur von 21 °C und eine Dauer von 6 Stunden für alle weiteren Proteinkomplexe gewählt. Bei der Wahl des geeigneten Expressionsstammes konnten keine Unterschiede zwischen BL21-CodonPlus® (DE3) RIPL und BL21 (DE3) festgestellt werden, somit wurden alle Konstrukte in BL21(DE3) exprimiert. Auch der Zusatz der osmotisch wirksamen Substanzen Sorbitol und Betain im Medium hatte keinen Einfluss auf die Expressionsrate bzw. die Löslichkeit der Proteine (Geuting, 2005, Abschnitt 3.2).

Die Expression aller in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte mit dem AtEME1-Protein mit C-terminalem StrepII-Tag wurde, entsprechend den Ergebnissen der Diplomarbeit, in BL21(DE3) bei 21 °C mit 1 mM IPTG für 6 Stunden durchgeführt, um ausreichende Mengen an löslichem Protein zu erreichen.

Das Ergebnis einer in dieser Arbeit getestete Variation der Expressionsbedingungen durch die Zugabe von Glukose ist in Abbildung 9 dargestellt. Aus Abbildungen 9A und 9B geht deutlich hervor, dass Glukose zwar zu einer größeren Menge an exprimiertem AtEME1B führte, jedoch auch verstärkt kleinere Strep-Tag-positive Proteinfragmente auftraten. Außerdem war eine erhöhte Konzentration an Zielprotein in der unlöslichen Fraktion in den Ansätzen mit Glukose zu verzeichnen (Abbildung 9C).

Um nur Komplexe mit vollständigem Protein aufzureinigen, wurde daher im Folgenden auf den Zusatz von Glukose verzichtet.

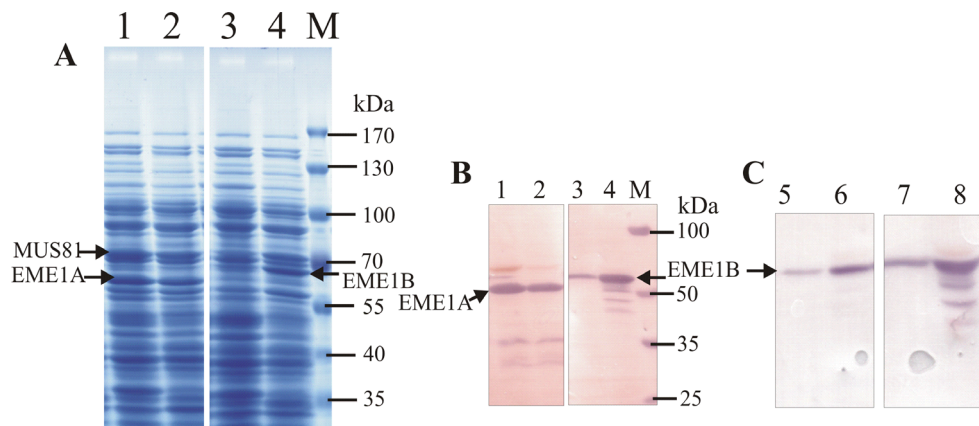


Abbildung 9: Einfluss von Glukose auf die Expression und die Löslichkeit von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B. **A**, Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel und **B**, Western-Blot entwickelt mit Strep-Tactin-AP-Konjugat, **C**, Western-Blot entwickelt mit Strep-Tactin-AP-Konjugat. **A, B**, Es wurden der Gesamtzellextrakt nach 2 Stunden Expression in BL21(DE3) aufgetragen: 1, AtMUS81-EME1A ohne Glukose; 2, AtMUS81-EME1A mit Glukose; 3, AtMUS81-EME1B ohne Glukose; 4, AtMUS81-EME1B mit Glukose; M, Prestained PageRuler Protein-Größenmarker; **C**, Es wurden die löslichen und unlöslichen Fraktionen nach 2 Stunden Expression in BL21(DE3) aufgetragen: 5, AtMUS81-EME1B unlöslich ohne Glukose; 6, AtMUS81-EME1B löslich ohne Glukose; 7, AtMUS81-EME1B unlöslich mit Glukose; 8, AtMUS81-EME1B löslich mit Glukose. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.3 Optimierung der Aufreinigung

Zur chromatographischen Aufreinigung der verschiedenen AtMUS81-EME1-Komplexe standen ursprünglich zwei Affinitäts-Tags des pETDuet-1-Vektors zur Verfügung, ein N-terminal fusionierter Hexa-Histidin-Tag an AtMUS81 und der S-Tag am C-Terminus des Interaktionspartners AtEME1. Der Hexa-Histidin-Tag ermöglicht eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) durch eine reversible Interaktion zwischen einem an einer Matrix immobilisierten Metallion und dem Histidin-Tag. Der S-Tag

ermöglicht eine Affinitätschromatographie zwischen dem S-Tag und dem S-Protein. Durch eine Kopplung der IMAC und des S-Tag-Systems sollte eine Aufreinigung der Proteine AtMUS81 und AtEME1A bzw. AtEME1B als Komplex mit möglichst wenig Überschuss eines Interaktionspartners ermöglicht werden und zusätzlich der Reinheitsgrad der Zielproteine verbessert werden. Die Voraussetzung für die anschließenden Aktivitätstests war, dass die Endonukleasekomplexe so sauber wie möglich waren, d.h. vor allem alle endogenen Bakterienproteine mit Endonukleaseaktivität entfernt wurden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Gleichzeitig musste aber die biologische Aktivität der Proteine bewahrt werden.

Da der Anspruch einer vergleichbaren Charakterisierung der beiden homologen Komplexe bestand, mussten die Proteinpräparationen unter identischen Bedingungen durchgeführt werden.

Alle Optimierungsschritte der Aufreinigung wurden mit AtMUS81-EME1A durchgeführt.

Bereits in meiner Diplomarbeit (Geuting, 2005) konnte gezeigt werden, dass die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Kupfer (Cu^{2+}) als Ligand, in Bezug auf die Reinheit des AtMUS81-EME1A-Komplexes, erfolgreicher ausfiel als mit Nickel (Ni^{2+}) (Geuting, 2005, Abschnitt 3.6.2). Außerdem ergaben die Ergebnisse, dass eine Aufreinigung von Proteinen über das S-Tag-System nicht unter nativen Bedingungen möglich war und die Methode einen Verlust von Zielprotein zur Folge hatte (Geuting, 2005, Abschnitt 3.3.1).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit als alternatives Affinitäts-Tag System der StrepII-Tag gewählt, welcher anstelle des S-Tags in alle bereits vorhandenen Vektoren kloniert wurde (siehe Abschnitt 3.2.1.4). Sowohl der Hexa-Histidin-Tag als auch der StrepII-Tag wurden zur Affinitätschromatographie und zur Detektion der Proteine im Western Blot verwendet.

4.4 Aufreinigung von AtMUS81-EME1A über Cu^{2+} -IMAC

Abgesehen von der Wahl des komplexierten Metallions bei der IMAC können Variationen in weiteren Faktoren, wie z. B. der Imidazolkonzentration in Binde- und Elutionspuffer, einen entscheidenden Einfluss auf die Reinheit der Proteine ausüben. Variationen dieser Parameter führten, wie im Folgenden dargestellt, zu einer verbesserten Reinheit der Proteine.

4.4.1 Erhöhung der Imidazolkonzentration im Bindepuffer

Da Imidazol bei der IMAC der kompetitiven Elution dient, kann eine Erhöhung der Konzentration bereits im Bindepuffer dazu führen, dass die Bindung von Bakterienproteinen, die nur eine geringe Affinität zum Säulenmaterial aufweisen, reduziert oder sogar ganz verhindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Imidazolkonzentration im Bindepuffer von anfänglich 10 mM (Abbildung 10A) auf 40 mM (Abbildung 10B) zu einer reduzierten Bindung von kontaminierenden Bakterienproteinen und somit zu einer Verbesserung der Reinheit geführt hat. Bei einem Vergleich der beiden Elutionen wird ersichtlich, dass bei der niedrigeren Imidazolkonzentration mehr kontaminierende Proteine an die Säule gebunden haben und folglich mit dem Zielprotein coeluiert wurden.

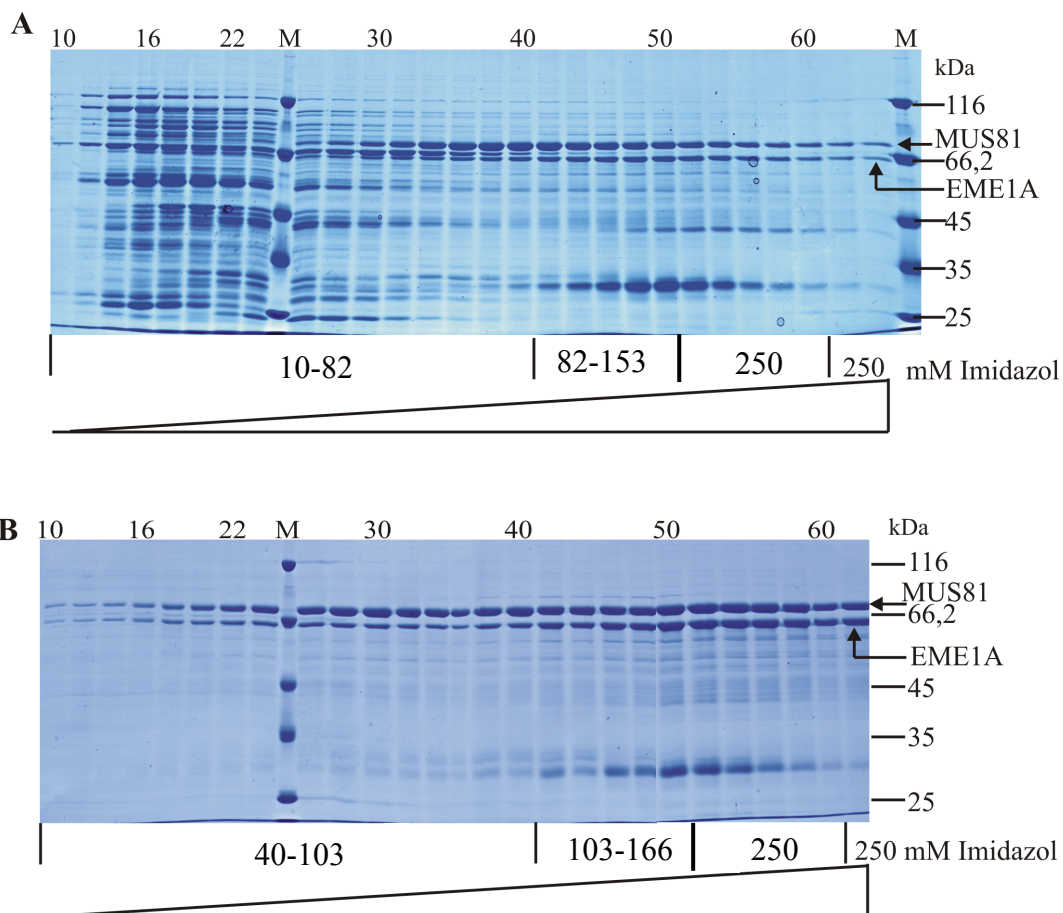


Abbildung 10: Einfluss der Imidazolkonzentration im Bindepuffer auf die Elution von AtMUS81-EME1A bei der Cu^{2+} -IMAC. **A, B,** Kolloidal-Coomassie gefärbte 8 % SDS-PAGE-Gele; **A,** Cu^{2+} -IMAC von AtMUS81-EME1A, Bindepuffer 10 mM Imidazol, Elutionspuffer 250 mM Imidazol, Elutionsgradient: 0-30 min 0-30 % Elutionspuffer, 30-40 min 30-60 % Elutionspuffer, 60-70 min 100 % Elutionspuffer, Flussrate 0,5 ml/min, Fraktionen 0,5 ml, Elutionsfraktionen (jede zweite Fraktion) 10-64; Die Berechnung der Imidazolkonzentrationen erfolgte unter Berücksichtigung des Totvolumens (Schlauchvolumen) der Flüssigchromatographieanlage von etwa 4 ml; **B,** Cu^{2+} -IMAC AtMUS81-EME1A; Bindepuffer 40 mM Imidazol, Elutionspuffer 250 mM Imidazol, Elutionsgradient und Flussrate wie in A, Fraktionen 0,5 ml, Elutionsfraktionen (jede zweite Fraktion) 10-62; Die Berechnung der Imidazolkonzentrationen erfolgte unter Berücksichtigung des Totvolumens (Schlauchvolumen) der Flüssigchromatographieanlage von etwa 4 ml. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Dennoch zeigte eine genauere Analyse der scheinbar relativ sauberen Elutionsfraktionen durch eine Gelelektrophorese mit einer längeren Auftrennungsstrecke (Hoefler-Gel), dass das Bandensignal von AtMUS81 einer Doppelbande entsprach. Ein kontaminierendes Protein von etwa 72 kDa lag also genau im Größenbereich von AtMUS81 (75,5 kDa), überdeckte die Zielproteinbande sogar teilweise und wurde mit dem Zielproteinkomplex coeluiert (Abbildung 11).

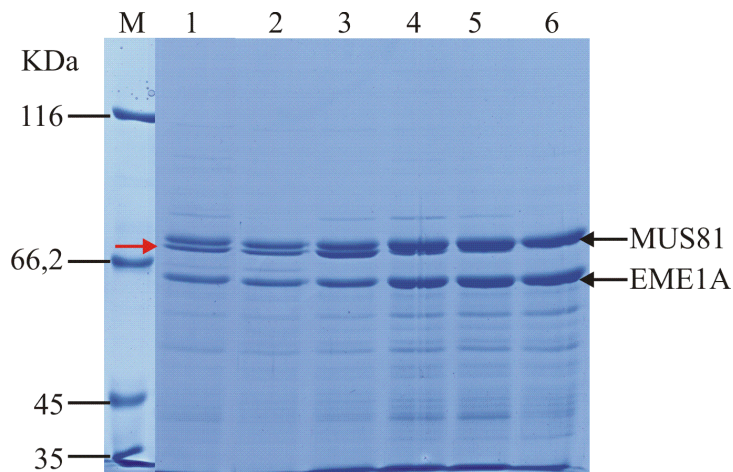


Abbildung 11: Analyse der Elutionsfraktionen von AtMUS81-EME1A der Cu^{2+} -IMAC. Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE Hoefler-Gel; M, Unprestained Protein Molecular Weight Marker; 1, Fraktion 46 aus Abb. 2A; 2-6, Fraktionen 22, 38, 44, 48, 62 aus Abb. 2B. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet; roter Pfeil: kontaminierendes Protein bei 72 kDa.

4.4.2 Änderung des Elutionsgradienten

Durch eine Änderung der Elution konnte das kontaminierende Protein bei etwa 72 kDa teilweise abgereinigt und das Zielprotein auf wenige Fraktionen konzentriert werden. Die Imidazolkonzentration wurde so gewählt, dass bei einem anfänglichen Elutionsschritt mit 20 % Elutionspuffer (was einer Konzentration von 112 mM Imidazol entsprach) ein Teil dieses Proteins eluiert wurde. Bei einem anschließenden zweiten Elutionsschritt mit 100 % Elutionspuffer (was einer Konzentration von 400 mM Imidazol entsprach) wurde nun der Großteil des Zielproteins endgültig von der Säule eluiert. Durch diese 2-Stufen-Elution konnte das kontaminierende Protein zwar größtenteils abgereinigt werden, allerdings mit einem gleichzeitigen Verlust an Zielprotein, und das 72 kDa Protein wurde auch weiterhin in den folgenden Hauptelutionsfraktionen des Zielproteins coeluiert. Die Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 400 mM im Elutionspuffer sollte eine vollständige Elution der Proteine in konzentrierter Form von der Säule gewährleisten (Abbildung 12).

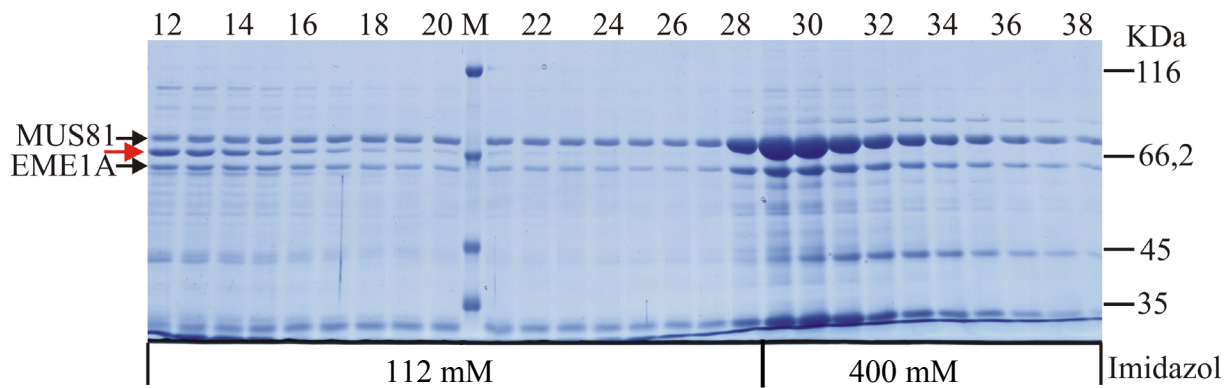


Abbildung 12: Einfluss des Elutionsgradienten und der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer auf die Reinheit von AtMUS81-EME1A während der Cu^{2+} -IMAC. Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel; Cu^{2+} -IMAC von AtMUS81-EME1A. Eine Abreinigung des kontaminierenden Proteins bei 72 kDa ist in den Fraktionen 12-28 im Elutionsschritt mit 40-112 mM Imidazol zu sehen. Die Elution des Zielproteins bei 112-400 mM Imidazol ist mit einer Coelution des kontaminierenden Proteins begleitet (Fraktionen 29-38). Bindepuffer 40 mM Imidazol, Elutionspuffer 400 mM Imidazol, Elutionsstufe 1: 0-20 min 20 % Elutionspuffer, Elutionsstufe 2: 20-40 min 100 % Elutionspuffer, Flussrate 0,5 ml/min, Fraktionen 0,5 ml, Elutionsfraktionen 12-38; Die Berechnung der Imidazolkonzentrationen erfolgte unter Berücksichtigung des Totvolumens (Schlauchvolumen) der Flüssigchromatographieanlage von etwa 4 ml; M, Unprestained Protein Molecular Weight Marker. Die Imidazolkonzentrationen des Elutionsgradienten sind unterhalb des Gels abgebildet. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet; roter Pfeil: kontaminierendes Protein bei 72 kDa.

Eine weitere Optimierung der Cu^{2+} -IMAC in dieser Arbeit bestand aus dem Ersetzen von NaCl durch KCl in den Puffern (200 mM), da ein hemmender Salzeffekt auf die Aktivität der Proteinkomplexe festgestellt werden konnte, der bei NaCl stärker ausgeprägt war, als bei KCl (siehe Abschnitt 4.9.6) und Kaliumionen eher den natürlich vorkommenden Salzionen in einer Pflanzenzelle entsprechen.

Da auch nach diesem Optimierungsschritt der Cu^{2+} -IMAC noch keine ausreichende Reinheit der Proteine erzielt werden konnte und noch viele verunreinigende Proteine (vor allem das 72 kDa Protein) in den Elutionsfraktionen vorhanden waren, wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt, die Strep-Tactin-Chromatographie, angeschlossen.

4.5 Aufreinigung von AtMUS81-EME1A über Cu^{2+} -IMAC mit anschließender Strep-Tactin-Chromatographie

Die Kombination von Cu^{2+} -IMAC und Strep-Tactin-Chromatographie, also die Nutzung beider Affinitäts-Tags der Proteinkomplexe, sollte zu einer weiteren Verbesserung der Reinheit führen. Dafür wurden die Hauptelutionsfraktionen der Cu^{2+} -IMAC, nach dem Umpuffern über eine PD10-Säule in Bindepuffer für Strep-Tactin (Puffer A), versuchsweise in Parallelansätzen entweder über eine Strep-Tactin-Sepharose-, Strep-Tactin-Superflow- oder Strep-Tactin-Macroprep-Säule weiter aufgereinigt. Lediglich die beiden erstgenannten Säulen zeigten Erfolg bezüglich der Ausbeute an Zielprotein im Eluat. Nur bei den Fraktionen der

Strep-Tactin-Superflow-Säule konnte jedoch Aktivität am 3'-Überhang-Substrat nachgewiesen werden.

Bei der Doppelaufreinigung Cu²⁺-IMAC und Strep-Tactin-Superflow an der Flüssigchromatographieanlage wurde ohne Gradient sofort mit 400 mM Imidazol eluiert und die Fraktionen nach dem Umpuffern über die Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. In Abbildung 13 (A, B, C) ist ein deutlicher Aufreinigungserfolg zu sehen. Im Durchfluss (Abbildungen 13A und 13B, Spuren 3 bis 5; Abbildung 5C, Spuren 2 und 3) der Strep-Tactin-Säule befand sich nun das kontaminierende Protein direkt unterhalb der AtMUS81-Bande bei etwa 72 kDa, welches zuvor noch an die Cu²⁺-Säule gebunden hat. Bei einem Kontrollansatz, bei dem eine Cu²⁺-IMAC mit der Expression von Bakterienproteinen mit dem leeren pETDuet-1-Vektor durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass das kontaminierende Protein bei 72 kDa mit hoher Affinität an die Cu²⁺-Säule binden konnte. Hierbei handelte es sich folglich um eine ungewollte Bindung von Bakterienproteinen an die Cu²⁺-Säule mit vergleichbarer Affinität der getaggen Zielproteine. Mit fortschreitender Beladung der Strep-Tactin-Säule wurde außerdem ein Teil AtMUS81-Protein abgereinigt, was sich in einem zunehmenden Signal in den Durchflussfraktionen widerspiegelte (Abbildungen 13A und 13B, Spuren 3 bis 5). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um frei vorliegendes AtMUS81-Protein, welches nicht mit AtEME1A komplexiert vorlag. Der AtMUS81-EME1A-Komplex war auf eine Hauptelutionsfraktion konzentriert (Abbildungen 13A und 13B, Spur 9; Abbildung 13C, Spur 6), welche stöchiometrische Konzentrationen beider Interaktionspartner aufwies. Da nun jeweils über den Affinitäts-Tag der beiden Interaktionspartner aufgereinigt wurde, sollten in den Endfraktionen keine Proteinmonomere mehr vorhanden sein.

Eine weitere Optimierung der Strep-Tactin-Chromatographie bestand aus dem Ersetzen der 1 ml Strep-Tactin-Cartridge (vorgepackt mit Superflow-Säulenmaterial) durch gleichwertiges Säulenmaterial für Schwerkraftsäulen. Ein Vorteil des Säulenmaterials für die Schwerkraftchromatographie ist die Variabilität in der Anwendung (u. a. eingesetztes Volumen) im Vergleich zur vorgepackten Säule.

Das Ergebnis der identischen Versuchsdurchführung ist in Abbildung 14 zu sehen. Ein Großteil der Gesamtproteinmenge von AtMUS81-EME1A war im Durchfluss wiederzufinden (Abbildung 14, Spuren 3 bis 6), was auf eine offensichtlich geringere Bindungskapazität der Säule zurückzuführen ist. Der AtMUS81-EME1A-Komplex war auf mehrere Elutionsfraktionen verteilt und lag stärker verdünnt vor als nach der Chromatographie mit der vorgepackten Säule (Abbildung 14, Spuren 11 bis 20). Es konnte allerdings in allen Fraktionen der Schwerkraftchromatographie enzymatische Aktivität am 3'-Überhang

detektiert werden (siehe Abschnitt 4.9.3). In den Durchflussfraktionen konnten die Proteine AtMUS81 und AtEME1A immunologisch nachgewiesen und Aktivität detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um den AtMUS81-EME1A-Komplex handelte und nicht um die einzelnen, frei vorliegenden Monomere. Es konnte bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Dürr, 2004) gezeigt werden, dass die AtMUS81-EME1-Komplexe nur nach der Coexpression enzymatische Aktivität zeigten. Wurden beide Monomere einzeln exprimiert bzw. die einzeln aufgereinigten Interaktionspartner nach der Aufreinigung vereint, konnte keine enzymatische Aktivität detektiert werden. Da der Anspruch in dieser Arbeit darauf gelegt wurde, so viel aktive Proteinkomplexe wie möglich in wenigen konzentrierten Fraktionen aufzureinigen, wurde im weiteren Verlauf die Strep-Tactin-Schwerkraftchromatographie verwendet.

Um die Proteinausbeute der Doppelaufreinigung auf der Ebene der Strep-Tactin-Chromatographie zu optimieren, wurde die Menge an Säulenvolumen, und damit die Bindekapazität der Säule, auf 4 ml erhöht.

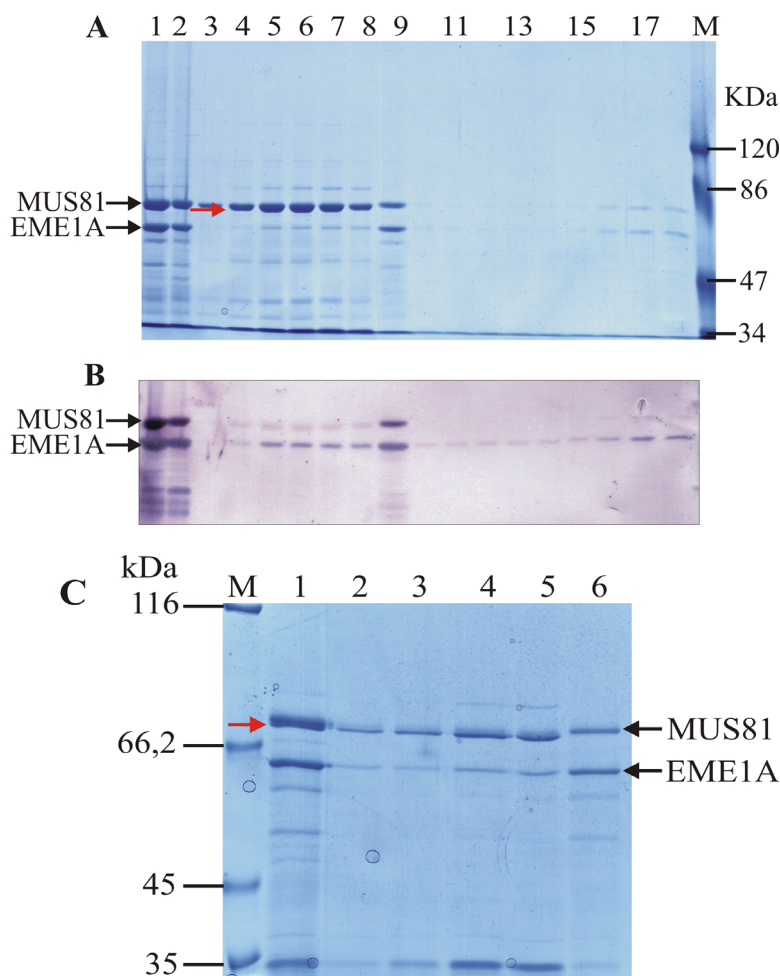


Abbildung 13: Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1A mittels Cu^{2+} -IMAC und Strep-Tactin Superflow an der Flüssigchromatographie-Anlage. **A**, Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel und **B**, Western-Blot entwickelt mit Strep-Tactin-AP-Konjugat und Anti-His-Tag monoklonaler Antikörper (1°) mit anschließendem Anti-Maus-AP-Konjugat (2°); **C**, Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE Hoefer-Gel. **A**, **B**, Puffer C 40 mM Imidazol, Elutionspuffer 400 mM Imidazol, Elution: 20 min 100 % Elutionspuffer, Flussrate 0,5 ml/min, Fraktionen 0,5 ml, Hauptelutionsfraktionen in Puffer A umgepuffert über PD-10-Säule, Eluat auf Strep-Tactin-Superflow-Säule geladen mit 0,1 ml/min, Waschen mit 10 ml Puffer A (0,5 ml/min), Elution: 50 min Puffer B, Flussrate 0,1 ml/min, Fraktionen 0,5 ml; M, Prestained Protein Molecular Weight Marker; 1, 2, Cu^{2+} -IMAC Elutionsfraktionen (Pool); 3-5, Strep-Tactin-Säule Durchflussfraktionen; 6-8, Strep-Tactin-Säule Waschfraktionen; 9-18, Strep-Tactin Elutionsfraktionen.

C, M, Unprestained Protein Molecular Weight Marker; 1, Cu^{2+} -IMAC Elutionsfraktionen (Pool); 2, 3, Strep-Tactin-Säule Durchflussfraktionen; 4, 5, Strep-Tactin-Säule Waschfraktionen; 6, Strep-Tactin Elutionsfraktion 1. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet; roter Pfeil: kontaminierendes Protein bei 72 kDa.

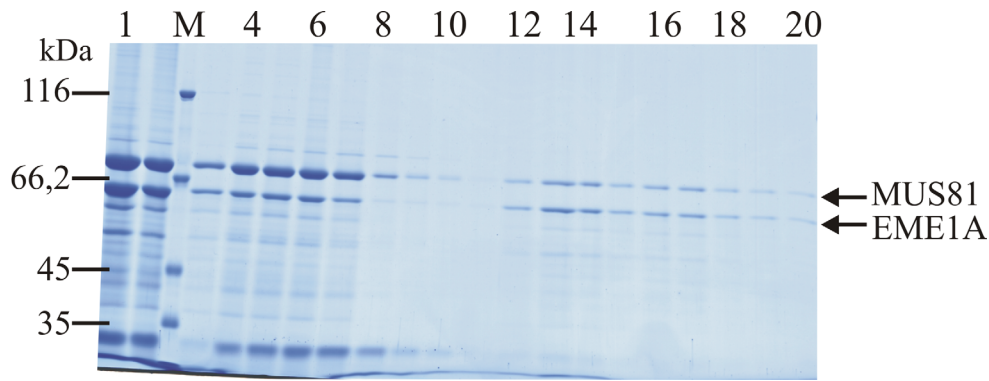


Abbildung 14: Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1A mittels Cu^{2+} -IMAC und Strep-Tactin-Superflow Schwerkraftsäule. Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel; Puffer C 40 mM Imidazol, Elutionspuffer 400 mM Imidazol, Elution: 20 min 100 % Elutionspuffer, Flussrate 0,5 ml/min, Fraktionen 0,5 ml, Hauptelutionsfraktionen in Puffer A umgepuffert über PD-10-Säule, Eluat auf Strep-Tactin-Superflow Schwerkraftsäule geladen, Waschen mit 10 ml Puffer A, Elution: 10 ml Puffer B, Fraktionen 0,5 ml; M, Unprestained Protein Molecular Weight Marker; 1, Cu^{2+} -IMAC Elutionsfraktionen (Pool); 2, Cu^{2+} -IMAC Elutionsfraktionen (Pool) umgepuffert in Puffer A; 3-6, Strep-Tactin-Säule Durchflussfraktionen; 7-10, Strep-Tactin-Säule Waschfraktionen; 11-20, Strep-Tactin Elutionsfraktionen. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Da die Elutionsfraktionen der Cu^{2+} -IMAC im Gegensatz zu den Elutionsfraktionen der Strep-Tactin-Chromatographie auf wenige Fraktionen konzentriert waren, wurde die Reihenfolge der Doppelaufreinigung umgekehrt (Abbildung 15).

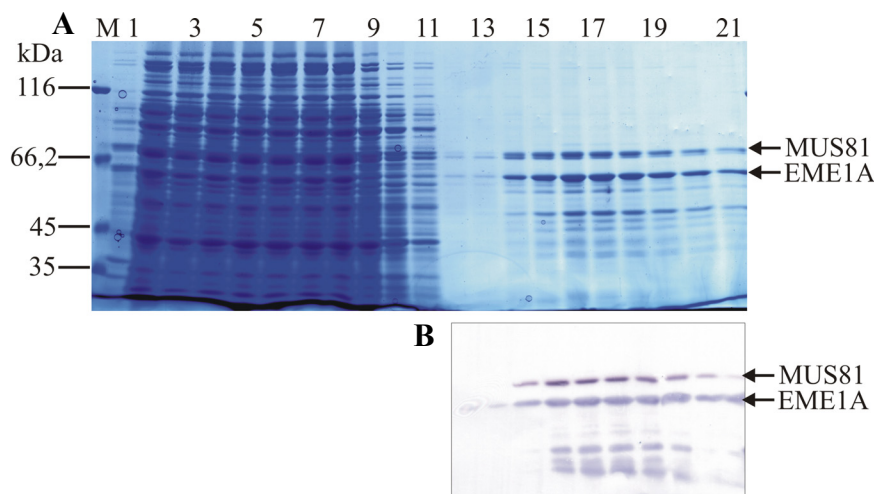


Abbildung 15: Strep-Tactin Chromatographie von AtMUS81-EME1A. A,

Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel und **B,** Western-Blot entwickelt mit Strep-Tactin-AP-Konjugat und Anti-His-Tag monoklonaler Antikörper (1°) mit anschließendem Anti-Maus AP Konjugat (2°). Gezeigt ist der Verlauf einer Strep-Tactin Chromatographie mit Schwerkraftsäule. Lösliche Proteinfraction (in Puffer A) auf

Strep-Tactin-Superflow Schwerkraftsäule geladen, Waschen mit 10 ml Puffer A, Elution: 10 ml Puffer B, Fraktionen 0,5 ml; M, Unprestained Protein Molecular Weight Marker; 1, unlösliche Proteinfraction; 2, lösliche Proteinfraction; 3-7, Durchflussfraktionen; 8-11, Waschfraktionen; 12-21, Elutionsfraktionen. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Dadurch konnte die Methode der Doppelaufreinigung, bezüglich der Proteinkonzentration und Proteinmenge in den Endfraktionen, für die Endonukleasekomplexe weiter verbessert werden. Im Durchfluss der Cu^{2+} -IMAC wurde frei vorliegendes AtEME1A-Protein abgereinigt, welches im vorangegangenen Schritt noch an die Strep-Tactin-Säule gebunden hatte. Die Gesamtmenge der AtMUS81-EME1A-Proteinkomplexe konnte somit auf wenige

Fraktionen konzentriert werden. Die genauere Analyse ausgewählter Fraktionen bestätigte den Reinerfolg der Methode (Abbildung 16) und das Vorhandensein eines stöchiometrischen, dimeren Proteinkomplexes.

Ein anschließendes Umpuffern der Cu^{2+} -IMAC-Elutionsfraktionen in Lagerungspuffer für Proteinfractionen war notwendig, um den Überschuss an Salzen und Imidazol zu entfernen, was sonst eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der Komplexe zur Folge hatte.

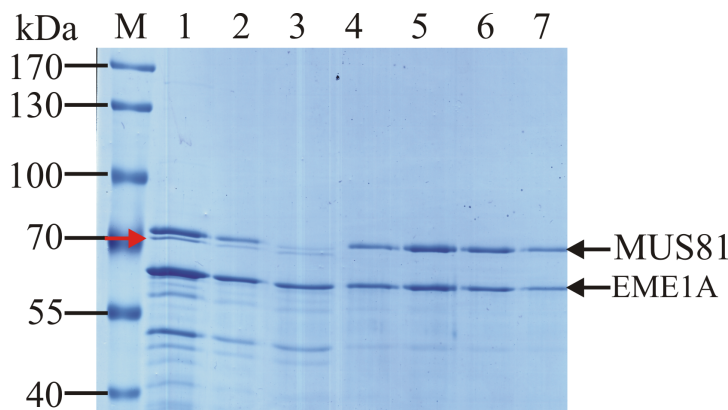


Abbildung 16: Analyse der Elutionsfraktionen von AtMUS81-EME1A-Doppelaufreinigung (Strep-Tactin, Cu^{2+} -IMAC). Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE Hofer-Gel; M, PageRuler Prestained Protein Ladder; 1, Strep-Tactin Elutionsfraktionen (Pool); 2, Strep-Tactin Elutionsfraktionen (Pool) umgepuffert in Puffer D; 3, Durchflussfraktion Cu^{2+} -IMAC; 4-7, Elutionsfraktionen 9-12 der Cu^{2+} -IMAC. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet; roter Pfeil: kontaminierendes Protein bei 72 kDa.

4.6 Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1B

Die gewonnenen Erkenntnisse der Optimierung der Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1A konnten auf die Konstrukte AtMUS81-EME1B und AtMUS81(D470-471A)-EME1A bzw. AtMUS81(D470-471A)-EME1B übertragen werden. Alle vier Proteinkomplexe konnten nun aufgrund der identischen Aufreinigungsmethode bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität direkt verglichen werden. Im Vergleich mit den Mutantenkonstrukten als Negativkontrolle konnte eine Kontamination ausgeschlossen werden.

Der Verlauf der Aufreinigung von AtMUS81-EME1B ist in Abbildung 17 zu sehen. Trotz des geringen Größenunterschiedes der Komplexpartner AtEME1A und AtEME1B von nur 1 kDa besitzt AtEME1B eine geringere elektrophoretische Mobilität im Gel als AtEME1A und weist somit ein scheinbar größeres Molekulargewicht auf.

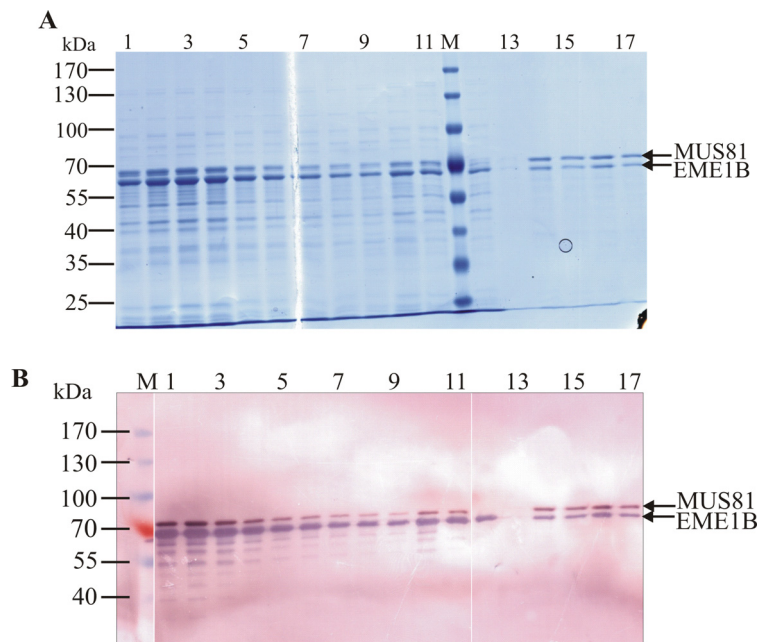


Abbildung 17: Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1B (Strep-Tactin, Cu²⁺-IMAC). A, Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel und B, Western-Blot entwickelt mit Strep-Tactin-AP-Konjugat und Anti-His-Tag monoklonaler Antikörper (1°) mit anschließendem Anti-Maus AP Konjugat (2°). Gezeigt ist der Verlauf der Doppelaufreinigung von AtMUS81-EME1B entsprechend dem für AtMUS81-EME1A optimierten Protokoll (siehe 3.2.2.2). M, PageRuler Prestained Protein Ladder; 1-9, Elutionsfraktionen 1-9 von Strep-Tactin-Säule; 10, Strep-Tactin Elutionsfraktionen (Pool); 11, Strep-Tactin Elutionsfraktionen (Pool) umgepuffert in Puffer C; 12, Durchflussfraktion der Cu²⁺-IMAC; 13-17; Elutionsfraktionen 8-12 der Cu²⁺-IMAC. Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.7 Quantifizierung der aufgereinigten Proteinproben

Die Konzentration der AtMUS81-EME1-Präparationen wurde mittels Kolloidal-Coomassie gefärbter SDS-PAGE-Gele bestimmt. Dazu wurde als Standard BSA (0,02 µg bis 0,18 µg) auf dem gleichen Gel geladen. Die Quantifizierung erfolgte über die Integrale der Graustufeneinheiten der Proteinbanden.

Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives Gel der AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Quantifizierung. Hier wird erneut die Laufanomalie von AtEME1B deutlich, welches langsamer migriert, als es seiner Größe von ca. 64 kDa nach zu erwarten wäre.

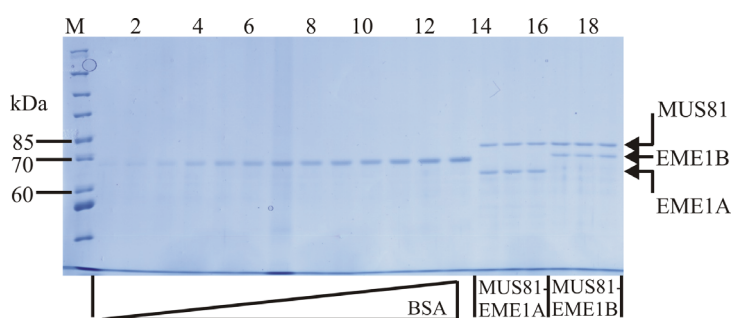


Abbildung 18: Proteinquantifizierung von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B. Kolloidal-Coomassie gefärbtes 8 % SDS-PAGE-Gel. M, PageRuler Unstained Protein Ladder; 1-13, 0,02/ 0,03/ 0,04/ 0,05/ 0,06/ 0,07/ 0,08/ 0,09/ 0,1/ 0,12/ 0,14/ 0,16/ 0,18 µg BSA (BioRad Eichstandard 2); 14-16, AtMUS81-EME1A-Frakturen (Doppelaufreinigung); 17-19, AtMUS81-EME1B-Frakturen (Doppelaufreinigung). (Auswertung mit

ImageJ Software) Die jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Entsprechend wurde die Quantifizierung für AtMUS81(D470-471A)-EME1A und AtMUS81(D470-471A)-EME1B vorgenommen. Als Bezug zur Bestimmung der Konzentration der Proteinkomplexe diente jeweils das AtMUS81-Protein.

Es konnten Proteinkonzentrationen von 5,2 ng/μl für AtMUS81-EME1A bzw. 10 ng/μl für AtMUS81(D470-471A)-EME1A und 6,7 ng/μl für AtMUS81-EME1B bzw. 8,6 ng/μl für AtMUS81(D470-471A)-EME1B, bezüglich der jeweiligen AtMUS81-Proteinbande, bestimmt werden.

4.8 Nachweis der Endonukleaseaktivität

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide homologe Proteinkomplexe, AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B, endonukleolytische Aktivität besitzen. Im Vordergrund stand hier vor allem die Gegenüberstellung beider Homologe bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität. Wie erwähnt wurden die Mutantenkonstrukte AtMUS81(D470-471A)-EME1A bzw. AtMUS81(D470-471A)-EME1B zum direkten Vergleich hinzugezogen, um zu kontrollieren, dass das Vorhandensein restlicher Fremdaktivitäten kontaminierender *E. coli*-Proteine in den aufgereinigten Proteinpräparationen ausgeschlossen werden konnte. Durch eine gezielt eingeführte Punktmutation im aktiven Zentrum des Komplexpartners MUS81, was zum Austausch der Aminosäure Aspartat (D) zu Alanin (A) führte, wurde die enzymatische Aktivität des Proteins zerstört. Diese identisch aufgereinigten, inaktiven Proteinformen dienten als Negativkontrolle der biochemischen Charakterisierung der Endonukleasekomplexe und stellten deshalb eine wichtige Qualitätskontrolle der Aufreinigung dar.

Für die Analysen der Endonukleaseaktivität standen hauptsächlich zwei verschiedene Protein-Pools von doppelt-aufgereinigten AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Präparationen zur Verfügung, außerdem Fraktionen von AtMUS81-EME1A-Präparationen der jeweiligen optimierten Aufreinigungsschritte. Eine Zusammenfassung der verwendeten Proteinfractionen ist der folgenden Tabelle (Tabelle 7) zu entnehmen.

Tabelle 7: Verwendete Proteinfractionen und -Pools für die Endonuklease-Assays. Die verschiedenen Pools ergaben sich aus verschiedenen Aufreinigungen.

Fraktion/ Pool	Protein	Aufreinigung
Cu-Fraktion	AtMUS81-EME1A	Cu ²⁺ -IMAC
Cu-Strep-Fraktion	AtMUS81-EME1A	Cu ²⁺ -IMAC, Strep-Tactin
Strep-Fraktion	AtMUS81-EME1A	Strep-Tactin
Strep-Cu-Fraktion	AtMUS81-EME1A	Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC
Pool 1 (1A)	AtMUS81-EME1A	Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC
Pool 1 (1B)	AtMUS81-EME1B	Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC
Pool 2 (1A)	AtMUS81-EME1A	Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC
Pool 2 (1B)	AtMUS81-EME1B	Strep-Tactin, Cu ²⁺ -IMAC

4.9 Assays mit dem 3'-Überhang-Substrat

4.9.1 Aktivitätsnachweis in Abhängigkeit des Aufreinigungsgrades

Gemäß der Optimierung der Aufreinigung (siehe Abschnitt 4.3) wurde der Verlauf der Aktivität mit dem AtMUS81-EME1A-Komplex analysiert. Als Substrat wurde der 3'-Überhang gewählt, welcher von AtMUS81-EME1A sehr gut umgesetzt wurde.

4.9.2 Aktivitätsnachweis nach der Cu²⁺-IMAC

Die Elutionsfraktionen der Cu²⁺-IMAC (Cu-Fraktion) zeigten keine oder eine nur sehr schwache Aktivität am 3'-Überhang. Nach einer Dialyse der entsprechenden Fraktionen in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 konnte jedoch eine starke Aktivitätszunahme beobachtet werden. Dieser Effekt kann auf die in den Elutionsfraktionen vorhandenen Salze und gelösten Stoffe im Elutionspuffer (200 mM NaCl, 400 mM Imidazol) zurückzuführen sein, welche einen hemmenden Einfluss auf die Endonukleaseaktivität ausüben können. Folglich war es von großer Bedeutung einen Überschuss an einwertigen Kationen in den Proteinfractionen durch Dialyse oder Umpuffern zu entfernen, um eine Hemmung der vorhandenen Aktivität zu verhindern (siehe Abschnitt 4.9.6).

4.9.3 Aktivitätsnachweis nach Doppelaffinitätschromatographie: Cu²⁺-IMAC und Strep-Tactin

Während von fast allen Elutionsfraktionen der Cu²⁺-IMAC mit anschließender Strep-Tactin-Schwerkraftsäule (Cu-Strep-Fraktion) das 3'-Überhang-Substrat sehr gut umgesetzt wurde (Abbildung 19, Spuren 9 bis 18), konnte bei der Hauptelutionsfraktion der Präparation an der Flüssigchromatographieanlage ein vergleichsweise mäßiger Umsatz gemessen werden (ohne Abbildung). Es konnte kein hemmender Effekt des Strep-Tactin Elutionspuffers beobachtet werden, die Aktivität nach dem Umpuffern einzelner Proben in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 veränderte sich nicht. Allerdings war eine erhöhte Enzymaktivität in den Strep-Tactin Durchfluss- und Waschfraktionen (Abbildung 19, Spuren 1 bis 8) festzustellen, welche bei der Präparation mit Schwerkraftsäule (1 ml Säulenvolumen) folglich einen hohen Anteil an aktivem AtMUS81-EME1A-Komplex enthielten (siehe auch Abbildung 14). Mittels Optimierung der Methode der Strep-Tactin-Chromatographie konnte die Aufreinigung hochaktiver Proteinkomplexe erzielt werden.

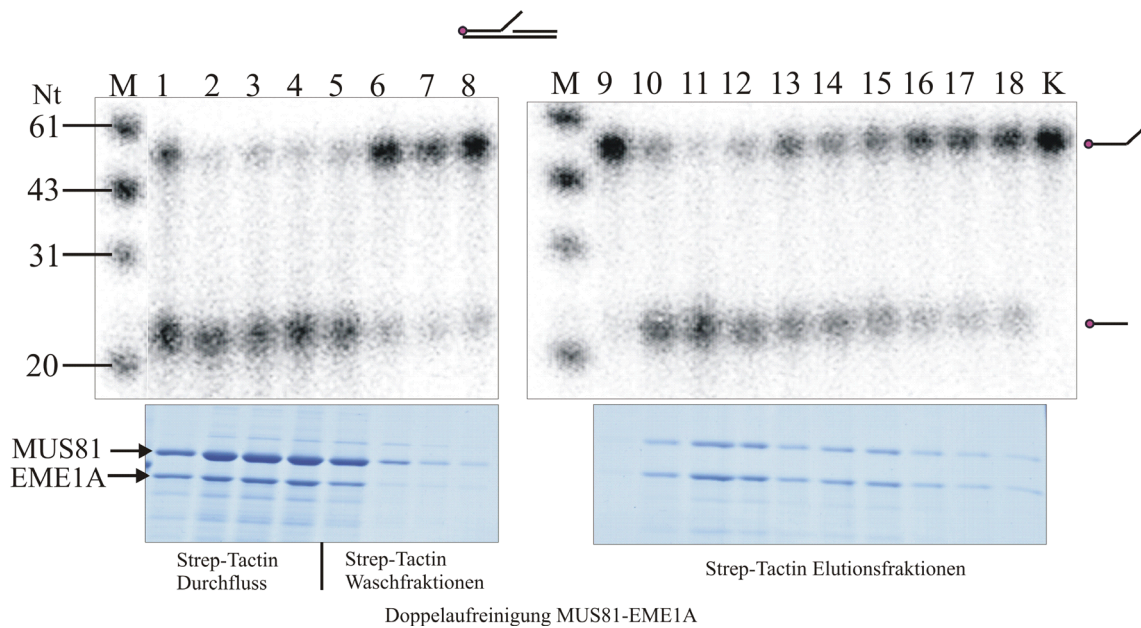


Abbildung 19: Aktivitätsnachweis von AtMUS81-EME1A nach der Doppelaффinitätschromatographie mit Cu^{2+} -IMAC und Strep-Tactin. Autoradiogramm eines denaturierenden 20 % TBE-Urea-PAGE-Gels. Es wurden je 5 μl der jeweiligen Proteinfraktionen mit 70 fmol 3'-Überhang-Substrat in einem Ansatz von 20 μl für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit 20 μl TBE-Urea-Puffer abgestoppt und 10 μl der Probe nach dem Hitzedenaturieren aufs Gel geladen. Die Kolloidal-Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gele der jeweiligen getesteten Proteinfraktionen sind unterhalb der Assay-Gele abgebildet. M, Größenmarker für denaturierende PAGE; 1-4 Strep-Tactin Durchflussfraktionen; 5-8, Strep-Tactin Waschfraktionen; 9-18, Strep-Tactin Elutionsfraktionen 1-10; K, Substratkontrolle.

4.9.4 Aktivitätsnachweis nach der Strep-Tactin-Chromatographie

Überraschenderweise zeigten einfach-aufgereinigte Elutionsfraktionen nach der Strep-Tactin-Schwerkraftsäule (Strep-Fraktion) keine Aktivität. Da ein hemmender Einfluss des Elutionspuffers der Strep-Tactin-Chromatographie ausgeschlossen werden konnte, war dieser Effekt vielmehr auf die Präparationsmethode zurückzuführen. Auffällig war im entsprechenden Elutionsprofil der Präparation (Abbildung 15) ein Überschuss an AtEME1A-Protein, wobei es sich vermutlich sowohl um mit MUS81-komplexiertes als auch um frei vorliegendes Protein handelt, welches mit dem Komplex mit aufgereinigt wird. Vermutlich übt dieses frei vorliegende AtEME1A-Protein in den Fraktionen einen hemmenden Einfluss auf den AtMUS81-EME1A-Komplex aus.

4.9.5 Aktivitätsnachweis nach Doppelaффinitätschromatographie: Strep-Tactin und Cu²⁺-IMAC

Durch die Umkehrung der Reihenfolge der Aufreinigungsschritte in der Doppelaффinitätschromatographie konnte nicht nur ein optimaler Reinheitserfolg, sondern auch eine Aufkonzentrierung der endgültigen Elutionsfraktionen mit maximaler Aktivität (Strep-Cu-Fraktion) (Abbildung 20, Spuren 3 bis 6) erreicht werden. Auch hier zeigten die Fraktionen direkt nach der Strep-Tactin-Chromatographie (Abbildung 20, Spur 2) keine Aktivität, was einen Hinweis auf eine eventuelle Hemmung des Komplexes durch überschüssiges, frei vorliegendes AtEME1A-Protein bestätigt. Die optimierte Durchführung der Doppelaффinitätschromatographie konnte, auch bezüglich der Enzymaktivität, auf den homologen Komplex AtMUS81-EME1B übertragen werden.

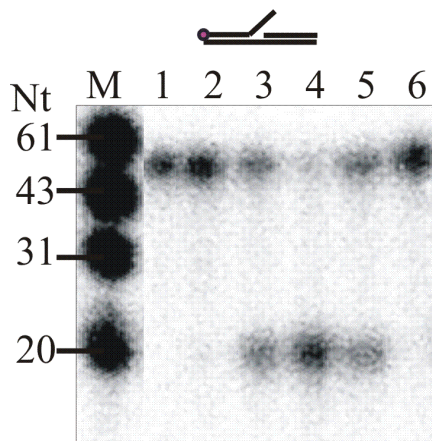


Abbildung 20: Aktivitätsnachweis von AtMUS81-EME1A nach der Doppelaффinitätschromatographie mit Strep-Tactin und Cu²⁺-IMAC. Autoradiogramm eines denaturierenden 20 % TBE-Urea-PAGE-Gels. Es wurden je 5 µl der jeweiligen Proteinfractionen mit 70 fmol 3'-Überhang-Substrat in einem Ansatz von 20 µl für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit 20 µl TBE-Urea-Puffer abgestoppt und 10 µl der Probe nach dem Hitzedenaturieren aufs Gel geladen. M, Größenmarker für denaturierende PAGE; 1, Substratkontrolle; 2, Strep-Tactin Elutionsfraktionen-Pool; 3-6, Cu²⁺-IMAC Elutionsfraktionen 9-12.

4.9.6 Einfluss verschiedener Salze und ihrer Konzentrationen auf die AtMUS81-EME1A-Aktivität

Aufgrund des Hinweises auf eine eventuelle Hemmung des Substratumsatzes aufgereinigter AtMUS81-EME1A-Fractionen in Hochsalzpuffer wurde der Einfluss des Ionenmilieus auf die Enzymaktivität (Cu-Fraktion) untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Salze NaCl und KCl und verschiedene Imidazolkonzentrationen getestet.

Bei allen drei Substanzen konnte eine zunehmende Hemmung der Enzymaktivität mit zunehmender Konzentration beobachtet werden (Abbildung 21). Ab einer Konzentration von 100 mM (Abbildung 21, Spuren 4, 11 und 18) sank der Substratumsatz deutlich, bis hin zur vollständigen Aktivitätshemmung des Enzyms. Dieser Effekt war bei NaCl stärker ausgeprägt als bei KCl und Imidazol. Daher wurde in den folgenden Assays auf den Zusatz einwertiger

Kationen ganz verzichtet und die Proteinfractionen nach der Chromatographie in Niedrigsalzpuffer (Lagerungspuffer für Proteinfractionen) umgepuffert.

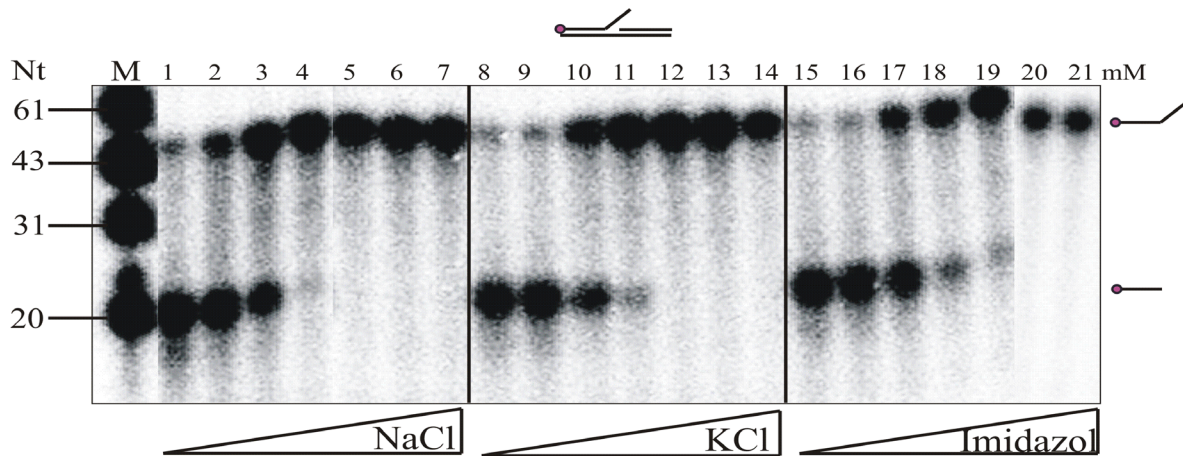


Abbildung 21: Einfluss verschiedener Salze auf die Aktivität von AtMUS81-EME1A. Autoradiogramm eines denaturierenden 20 % TBE-Urea-PAGE-Gels. Es wurden je 5 μ l der jeweiligen Proteinfractionen mit 70 fmol 3'-Überhang-Substrat in einem Ansatz von 20 μ l für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit 20 μ l TBE-Urea-Puffer abgestoppt und 10 μ l Probe nach dem Hitzedenaturieren aufs Gel geladen. M, Größenmarker für denaturierende PAGE; 1-7, 1/10/50/100/200/250/300 mM NaCl; 8-14, 1/10/50/100/200/250/300 mM KCl; 15-21, 1/10/50/100/200/250/300 mM Imidazol.

4.9.7 Einfluss verschiedener Metallionen auf die AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Aktivität

DNA-prozessierende Enzyme benötigen in der Regel divalente Kationen als Cofaktor. Dabei können für unterschiedliche Enzyme unterschiedliche Kationen geeignet sein. Hierzu wurden neben Mg^{2+} ($MgCl_2$, $MgSO_4$) auch Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} und Ni^{2+} hinsichtlich der Möglichkeit, die Endonukleaseaktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B zu fördern, untersucht (Abbildung 22).

Mg^{2+} und Ca^{2+} stellten gleichwertige Cofaktoren für beide Homologe dar (Pool 1). Auch Mn^{2+} konnte die Enzymaktivität unterstützen, zu einem vergleichsweise höheren Anteil und führte zur Bildung weiterer, niedermolekularer Produktbanden (siehe Abschnitt 4.10.4). Weder Zn^{2+} noch Ni^{2+} konnten als Cofaktoren für die Endonukleaseaktivität von AtMUS81-EME1A bzw. AtMUS81-EME1B dienen.

AtMUS81(D470-471A)-EME1A und AtMUS81(D470-471A)-EME1B zeigten wie erwartet keine enzymatische Aktivität, was eine wichtige Qualitätskontrolle aller aufgereinigten Endonukleasekomplexe war.

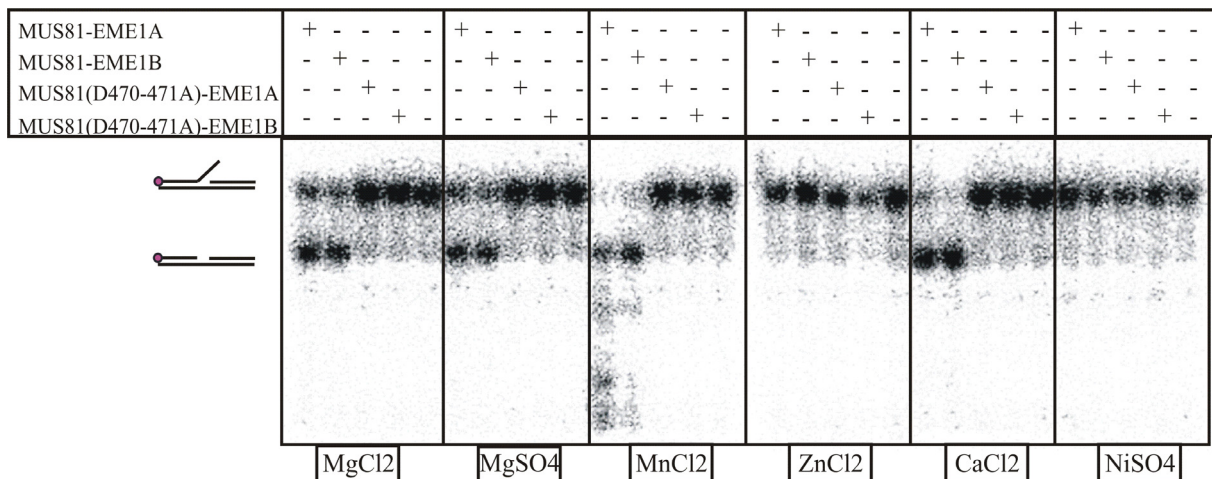


Abbildung 22: Einfluss verschiedener Metallcofaktoren auf die Aktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B. Autoradiogramm eines nativen 10 % TBE-PAGE-Gels. Es wurden je 0,01 µg von AtMUS81-EME1A Pool 1 und AtMUS81-EME1B Pool 1 und AtMUS81(D470-471A)-EME1A bzw. AtMUS81(D470-471A)-EME1B mit 50 fmol 3'-Überhang-Substrat in einem Ansatz von 20 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit 6 µl Stopp-Lösung abgestoppt und 10 µl der Probe aufs Gel geladen. Auf die Zugabe von DTT in den Assay-Puffer wurde verzichtet, um eine Reduktion der Metallionen zu vermeiden.

4.9.8 Umsatz und Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte beim 3'-Überhang-Substrat

Die Analyse zur Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte beim 3'-Überhang-Substrat erfolgte gemäß des Aktivitätsabgleiches beider homologer Komplexe (Pool 2) mit der genickten HJ (nXO) in Abschnitt 4.10.2 und den optimierten Assaybedingungen aus Abschnitt 4.10.1. Dennoch wurde bei diesem Substrat ein höherer Umsatz für AtMUS81-EME1B als für AtMUS81-EME1A nachgewiesen. Die Auswertungen mehrfach wiederholter Experimente mittels Sequenziergel und nativer PAGE bestätigten dieses Ergebnis.

Die Auswertung mit Hilfe von Sequenziergelen ermöglichte eine genaue Auftrennung aller Schnittprodukte, die sich in der Größe eines einzelnen Nukleotids unterscheiden. Da es sich hierbei um eine denaturierende PAGE handelt, wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Die anschließende Quantifizierung der Schnittprodukte ermöglichte dann eine Aussage über die Position der endonukleolytischen Schnitte für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B für das 3'-Überhang-Substrat und im Folgenden für die HJ-Substrate.

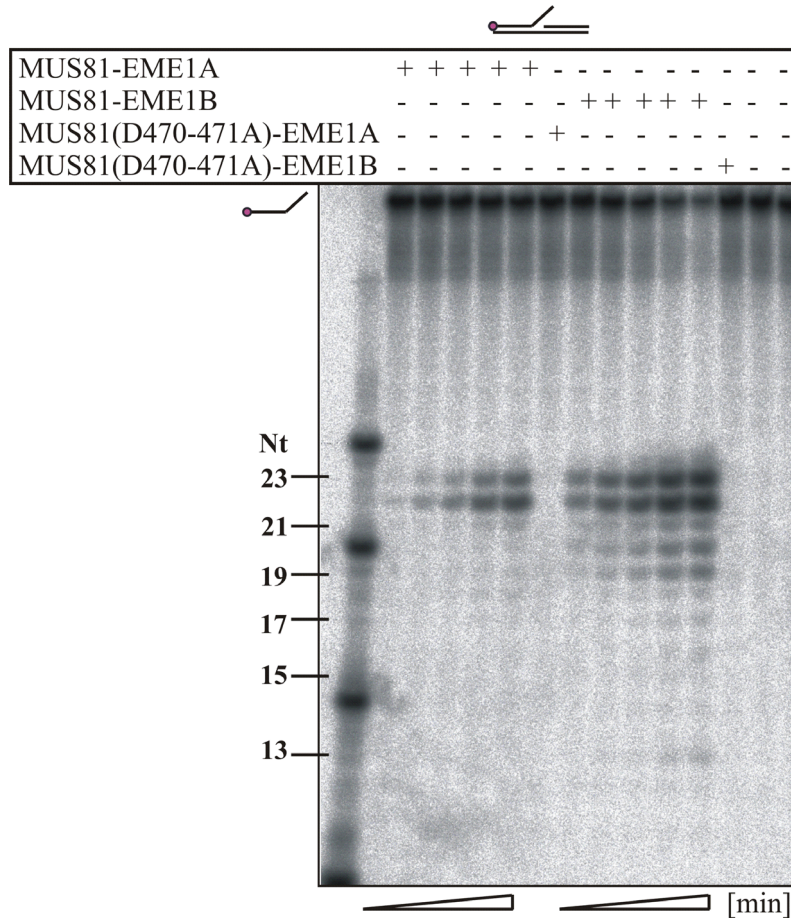


Abbildung 23: Umsatz des 3'-Überhang-Substrates von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B im Verlauf der Zeit (Sequenzigel). Jeweils 50 fmol Substrat des 3'-Überhangs wurden mit MUS81-EME1A (2 ng) bzw. MUS81-EME1B (1,3 ng) bei 37 °C inkubiert und jeweils 20 µl Aliquots zu den Zeitpunkten 150 sec, 5, 10, 30 und 60 min entnommen und 8 µl der Probe auf das Gel geladen. Die Größen der Fragmente sind in Nukleotiden (Nt) angegeben.

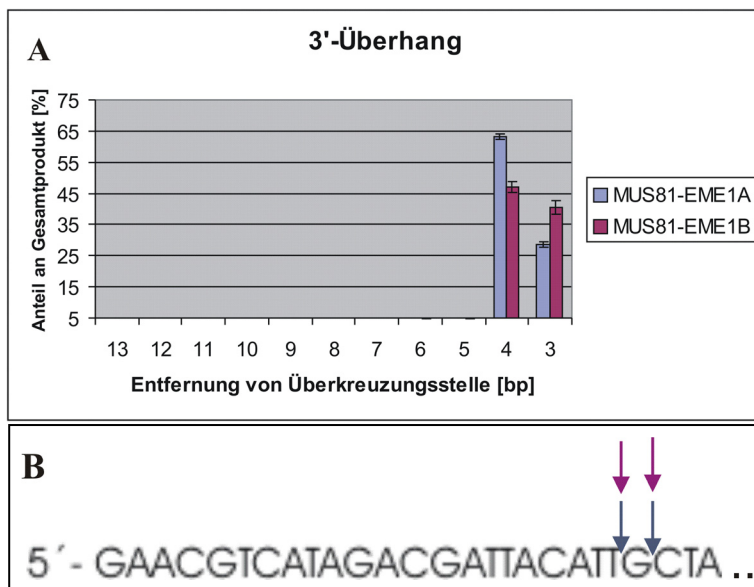


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der Schnittprodukte vom Gesamtprodukt beim 3'-Überhang. **A**, Quantifizierung der prozentualen Anteile der Produkt-Fragmente bezogen auf das Gesamtprodukt (in %) von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B beim 3'-Überhang nach 60 min Inkubationszeit, abzüglich der Kontrolle. Die Entfernung der Schnittstellen vom Verzweigungs- punkt der Überhang-Struktur ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachbestimmungen unabhängiger Assays; **B**, Schnittstellen von AtMUS81-EME1A (blau) und AtMUS81-EME1B (lila) im entsprechenden Oligonukleotid des

Duplex-Armes des 3'-Überhangs. Großer Pfeil, 15-65 % Anteil vom Gesamtprodukt; kleiner Pfeil, 5-15 % Anteil vom Gesamtprodukt. Der besseren Übersicht halber wurden die Werte, welche <5 % Anteil vom Gesamtprodukt ausmachen, in die Darstellungen nicht mit einbezogen.

Es wurden jeweils Substratkontrollen einer Anfangs- und Endbestimmung sowie jeweils eine Endbestimmung der Zeitverläufe mit AtMUS81(D470-471A)-EME1A und AtMUS81(D470-471A)-EME1B mitgetestet. Im Idealfall sollten sich die Endwerte beider Kontrollansätze entsprechen. Dies war der Fall und daher wurden die Werte bei der jeweiligen Quantifizierung als Nullwerte abgezogen.

Die Menge der Produktfragmente (in fmol) nahm bei beiden Endonukleasekomplexen, AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B, mit zunehmender Inkubationszeit von 2,5 min bis 60 min zu. Für die Prozessierung des 3'-Überhang-Substrates konnten zwei Positionen der endonukleolytischen Schnitte für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B detektiert werden (Abbildung 23). Die Hauptprodukte mit einer Größe von 22 und 23 Nukleotiden korrespondieren mit Schnittstellen, welche 3 und 4 Basenpaare in 5'-Richtung vom Verzweigungspunkt des einzelsträngigen Überhangs bzw. vom freien 5'-Ende des genickten Duplex entfernt liegen (Abbildung 24). Bei AtMUS81-EME1A war eine leichte Präferenz für die Position festzustellen, welche 4 Nukleotide von der Verzweigungsstelle des Überhangs entfernt lag. Es konnten weitere Schnittstellen im Abstand von jeweils einem Nukleotid im Bereich von 5 bis 7 Basenpaaren von der Verzweigungsstelle des Überhangs entfernt detektiert werden, welche allerdings einen vernachlässigbar geringen Anteil ausmachten.

4.10 Assays mit den HJ- und nHJ-Substraten

Die Holliday Junction (HJ), eine vierfach-überkreuzte DNA-Struktur, gilt als wichtigstes Intermediat der Rekombination. Da der MUS81-Endonuklease eine Rolle bei der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten zugesprochen wird, ist die Untersuchung der intakten HJ von besonderem Interesse. Zudem existieren viele widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Schneideaktivität dieser DNA-Struktur bei verschiedenen rekombinanten oder endogenen Proteinpräparationen. Es gibt Hinweise auf eine eventuelle Oligomerisierung des MUS81-EME1-Dimers als Voraussetzung der HJ-Schneideaktivität (Gaskell *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden sowohl die genickte HJ (nXO), welche eine HJ mit einem Einzelstrangbruch darstellt, als auch die intakte HJ (XO) getestet. Beide Strukturen repräsentieren eine statische HJ ohne Sequenzhomologien. Die Produkte der vollständigen HJ-Prozessierung sind genickte Duplexe mit Flaps (Überhängen) und Gaps (Lücken) verschiedener Länge, abhängig von der Position der endonukleolytischen Schnitte.

4.10.1 Optimierung der Assaybedingungen für die HJ- und nHJ-Strukturen

In dieser Arbeit konnte erstmals Aktivität bei der genickten und intakten HJ mit *Arabidopsis thaliana* MUS81-EME1A und MUS81-EME1B nachgewiesen werden. Bezüglich der Unterschiede des Umsatzes beider Substrate mussten zu Beginn die optimalen Assaybedingungen ermittelt werden. Die genickte HJ (nXO-1) wurde von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B besser umgesetzt als die intakte HJ (XO-1). Aus Untersuchungen von anderen Organismen ist bekannt, dass die vollständige Prozessierung der XO-1 in lineare Duplexe zwei konsekutive Schnitte erfordert, von denen der erste der langsame und damit geschwindigkeitsbestimmende Schnitt ist, und somit benötigt die Prozessierung von XO-1 mehr Zeit als die von nXO-1. Demzufolge wurden die optimalen Assayzeiten für beide Substrate in einer Zeitkinetik analysiert. Für die nXO-1 wurde eine maximale Inkubationszeit von 60 min, für die XO-1 eine maximale Inkubationszeit von 240 min ermittelt, um im linearen Messbereich zu liegen. Für die Ansätze mit der XO-1 wurde die 5-fache Proteinmenge verglichen mit den Ansätzen für die nXO-1 eingesetzt. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass eine Substratkonzentration von 50 fmol pro 20 µl Ansatzvolumen für eine optimale Vergleichbarkeit der HJ-Substrate geeignet war.

4.10.2 Aktivitätsabgleich mit der nXO-1

Um die Enzymaktivität bzw. die Substratspezifität der beiden homologen Komplexe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bezüglich der HJ miteinander vergleichen zu können, wurde ein Aktivitätsabgleich durchgeführt. Als Bezug zur Prozessierung der XO-1 diente die nXO-1 als direkter Vergleich. Das bedeutet, es wurde die Aktivität beider homologer Proteinkomplexe in Bezug auf die nXO-1 normiert und somit die Proteinmenge von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bestimmt, die einen vergleichbaren Umsatz der nXO-1 aufwiesen. Die so ermittelten Stöchiometrien der Proteinkonzentrationen wurden für alle weiteren Assays mit HJ-Substraten eingesetzt.

Zur Bestimmung wurden unterschiedliche Proteinmengen von AtMUS81-EME1A (Pool 2) und AtMUS81-EME1B (Pool 2) mit der nXO-1 inkubiert, die eingesetzte Proteinmenge in Bezug auf die umgesetzte Substratmenge gesetzt und anhand der Geradengleichung die Proteinkonzentrationen mit vergleichbarer Aktivität berechnet (Abbildung 25). Folglich wurde die 1,56-fache Proteinmenge von AtMUS81-EME1A für die gleiche Aktivität von AtMUS81-EME1B benötigt.

Um die Enzymaktivität im linearen Aktivitätsbereich und einen reproduzierbar quantifizierbaren Umsatz beider Substrate messen zu können, wurden folgende Proteinkonzentrationen für die anschließenden Assays ermittelt:

Für HJ-Assays:

- AtMUS81-EME1A: 10 ng/20µl Assay-Volumen
- AtMUS81-EME1B: 6,4 ng/20µl Assay-Volumen

Für nHJ-Assays:

- AtMUS81-EME1A: 2 ng/20µl Assay-Volumen
- AtMUS81-EME1B: 1,3 ng/20µl Assay-Volumen

Für die entsprechenden Mutantenkomplexe wurden Konzentrationen von je 10 ng/20µl Assay-Volumen eingesetzt.

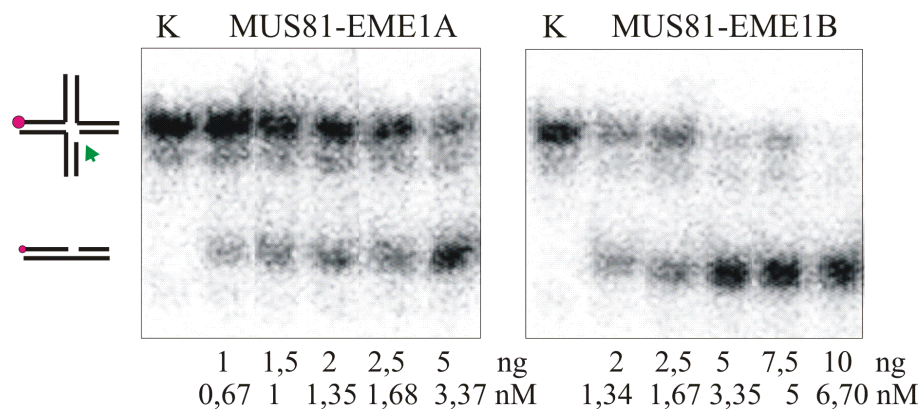


Abbildung 25: Aktivitätsabgleich von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B mit der nXO-1. Autoradiogramm eines nativen 10 % TBE-PAGE-Gels. Es wurden die jeweils angegebenen Mengen von AtMUS81-EME1A (Pool 2) und AtMUS81-EME1B (Pool 2) mit 50 fmol nXO-1 Substrat in einem Ansatz von 20 µl für 5 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit 6 µl Stopp-Lösung abgestoppt und 10µl der Probe auf das Gel geladen. K, Substratkontrolle; Der grüne Pfeil markiert den Nick in der HJ.

4.10.3 Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die Enzymaktivität bei HJ-Strukturen

4.10.3.1 Substratumsatz

Um die für einen optimalen Substratumsatz benötigte Konzentration an Metallcofaktoren zu bestimmen, wurden MgCl₂-Konzentrationen zwischen 0,5 mM und 20 mM mit beiden HJ-Strukturen getestet. Da die Substratextraktion in TB-MgCl₂-Puffer durchgeführt wurde, musste eine durch das Volumen des Substrates bedingte zusätzliche MgCl₂-Menge berücksichtigt werden. Da die Ausbeuten der verschiedenen Substratpräparationen in etwa vergleichbar waren und folglich annähernd die gleichen Substratvolumina zu den

Reaktionsansätzen gegeben wurden, wurde von einer substratabhängigen MgCl_2 -Konzentration von etwa 0,5 mM in den Anätzen ausgegangen. Die hier getesteten MgCl_2 -Konzentrationen entsprachen also zusätzlichen MgCl_2 -Mengen im jeweiligen Reaktionspuffer.

Es konnte für beide Homologe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B gezeigt werden, dass mit einer Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM der maximale Umsatz der XO-1 erreicht wurde. Sowohl bei niedrigeren als auch höheren Mg^{2+} -Konzentrationen war eine Abnahme des Substratumsatzes zu verfolgen. Für die nXO-1 hingegen war eine Zunahme des Substratumsatzes mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration zu beobachten, wobei diese zwischen 0,5 mM und 5 mM nur sehr schwach erfolgte und bei 10 mM sprunghaft anstieg (Abbildungen 26 und 27).

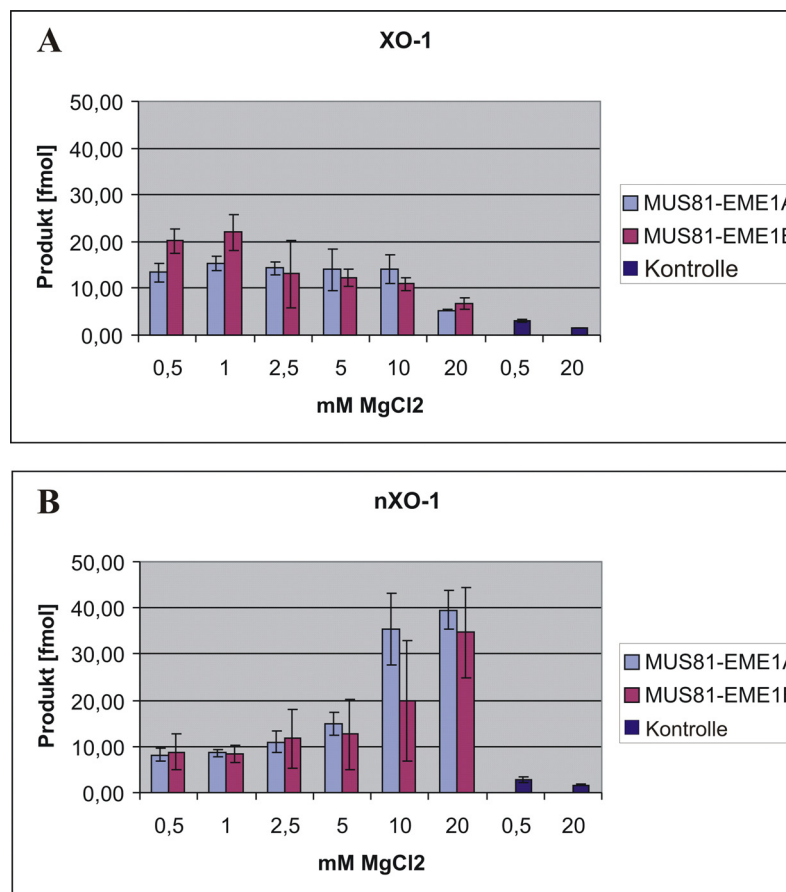


Abbildung 26: Einfluss der Cofaktorkonzentration auf den Substratumsatz von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO-1 und nXO-1. Quantifizierung des Substratumsatzes von MUS81-EME1A und MUS81-EME1B bei (A) XO-1 und (B) nXO-1 bei verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen (0,5/ 1/ 2,5/ 5/ 19/ 20 mM) von 2 unabhängigen Wiederholungen (siehe Abbildung 27).

4.10.3.2 Produkte der endonukleolytischen Aktivität

Auch bezüglich der Produkte der endonukleolytischen Aktivität konnten Unterschiede bei den verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen detektiert werden. Vorwiegend bei AtMUS81-EME1A war ein deutlicher Unterschied in der Position der endonukleolytischen Schnitte bei der XO-1 zu beobachten. Mit zunehmender $MgCl_2$ -Konzentration (ab 5 mM) erschienen weitere, niedermolekulare DNA-Strukturen, welche bei niedrigeren Konzentrationen nicht vorhanden waren. Bei der nXO-1 war dieser Effekt nicht zu erkennen (Abbildung 27).

Da eine Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM in etwa den physiologischen Konzentrationen in der Zelle entspricht und gleichzeitig ein maximaler Umsatz für die XO-1 detektiert werden konnte, wurde diese Konzentration für die folgenden Assays festgelegt.

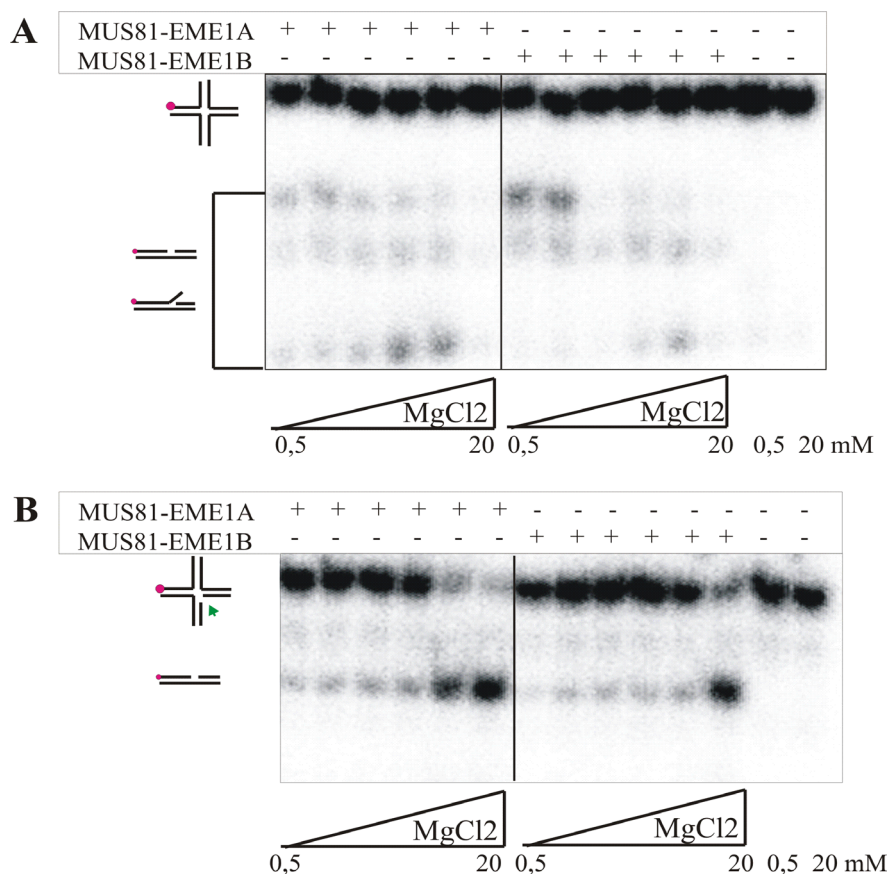


Abbildung 27: Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die Aktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO-1 und nXO-1. A, B, Autoradiogramm nativer 10 % TBE-PAGE-Gele. Es wurden die in 4.10.2 ermittelten Proteinkonzentrationen für AtMUS81-EME1A (Pool 2) und AtMUS81-EME1B (Pool 2) mit je 50 fmol XO-1 Substrat für 180 min (A) oder nXO-1 Substrat für 10 min (B) in einem Ansatz von 20 μ l bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit 6 μ l Stopp-Lösung abgestoppt und 10 μ l der Probe auf das Gel geladen. Die Reaktionspuffer enthielten $MgCl_2$ -Konzentrationen von jeweils 0,5/1/2,5/ 5/10/20 mM; Der grüne Pfeil markiert den Nick in der HJ.

4.10.4 Einfluss von MnCl_2 auf die Enzymaktivität

Bezüglich der Ergebnisse des Einflusses verschiedener Metallcofaktoren auf die Enzymaktivität am 3'-Überhang, wurde der Einfluss von Mn^{2+} auf den Umsatz von HJ-Strukturen untersucht. Die Ergebnisse von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B zeigten eine vergleichbare, deutliche Erhöhung der Umsatzrate sowohl für die intakte als auch die genickte HJ mit zunehmender Zeit. Im Vergleich zu einer identisch durchgeführten Zeitkinetik mit Mg^{2+} als Cofaktor konnte mit Mn^{2+} bereits nach 90 min ein kompletter Substratumsatz der XO-1 erreicht werden, wohingegen mit Mg^{2+} ein maximaler Umsatz von 60 % (30 fmol) für AtMUS81-EME1A bzw. 50 % (25 fmol) für AtMUS81-EME1B detektiert wurde. Dieser Effekt war bei der nXO-1 etwas schwächer ausgeprägt, hier bedingten beide Cofaktoren einen etwa vergleichbaren Umsatz. Dennoch konnte mit Mn^{2+} die Bildung weiterer, niedermolekularer Produktbanden für die XO-1 und nXO-1 beobachtet werden (ohne Abbildung).

4.10.5 Umsatz von HJ und nHJ als Funktion der Zeit

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sowohl AtMUS81-EME1A als auch der homologe Komplex AtMUS81-EME1B die HJ effektiv schneiden konnten, stellte sich die Frage, ob Unterschiede bei ihrer Prozessierung existierten, welche sich z. B. in der Position der endonukleolytischen Schnitte (Schnittmuster) widerspiegelten.

Dazu wurden die HJ-Substrate jeweils an einem der vier Duplex-Arme radioaktiv markiert ((n)XO-1, (n)XO-2, (n)XO-3, (n)XO-4) und die Endonukleaseaktivität im Verlauf der Zeit analysiert. Der Nick in der nHJ befand sich während der Analysen immer an der gleichen Stelle zwischen dem dritten und vierten Duplex-Arm. Es wurden die in 4.10.1 und 4.10.2 ermittelten optimierten Assaybedingungen, bezüglich der Gesamtinkubationsdauer und Proteinmengen für die XO und nXO, eingehalten. Es wurden jeweils fünf Messzeitpunkte festgelegt, bei denen Proben des Inkubationsansatzes entnommen wurden, um den Verlauf der Endonukleasereaktion verfolgen zu können. Bei den Ansätzen mit der XO wurden nach 30, 60, 120, 180 und 240 min und bei der nXO nach 150 sec, 5, 10, 30 und 60 min eine Probe entnommen. Mit Hilfe dieser Analyse sollte zudem untersucht werden, ob bei der Enzymreaktion Produkte entstehen, welche im weiteren Zeitverlauf weiter zu neuen Produkten umgesetzt werden.

Die anschließende Quantifizierung der Schnittprodukte für alle getesteten HJ-Strukturen ermöglichte dann die Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte, also die

Erstellung eines kompletten Schnittmusters für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B für die intakte und die genickte HJ.

Bei der nativen PAGE können die Produkte der HJ-Prozessierung (genickte Duplexe) für jedes der vier XO-Substrate detektiert werden, da immer ein Anteil der entstandenen Produkte eine radioaktive Markierung trägt, unabhängig davon welcher der markierten Duplex-Arme geschnitten wurde. Im Gegensatz dazu werden mittels denaturierender Sequenziergele jeweils nur die Produktfragmente detektiert, welche durch die Prozessierung am jeweils markierten Duplex-Arm entstanden sind. Somit können mittels nativer PAGE auch solche Produkte nachgewiesen werden, welche in der denaturierenden PAGE, aufgrund der fehlenden radioaktiven Markierung am jeweiligen prozessierten Duplex-Arm, nicht detektiert werden können. Deshalb ist ein direkter Vergleich des Gesamtsubstratumsatzes, welcher mittels nativer und denaturierender PAGE ermittelt wurde, in diesem Fall nicht möglich.

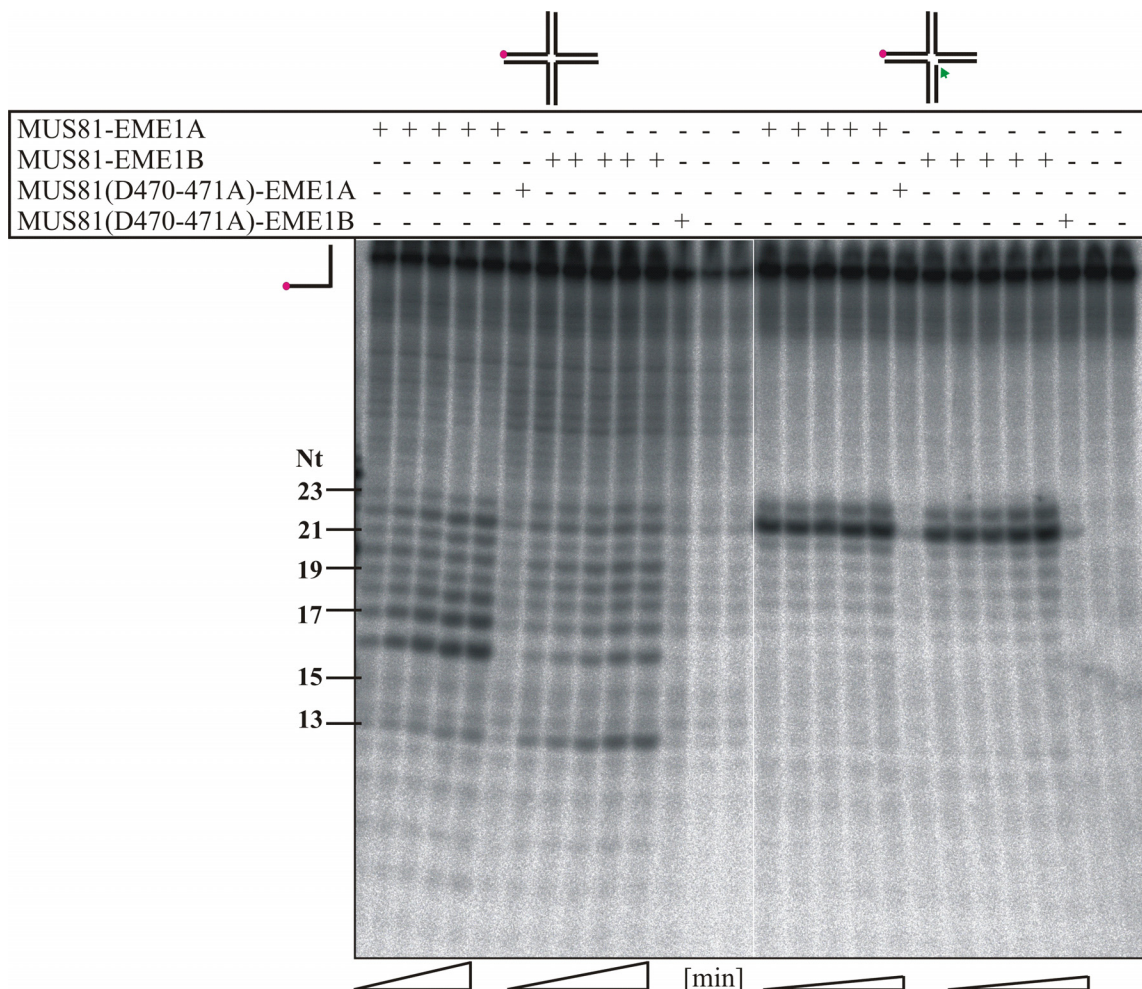


Abbildung 28: Umsatz der XO-1 und nXO-1 von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B im Verlauf der Zeit (Sequenziergel). Jeweils 50 fmol Substrat (XO-1 oder nXO-1) wurden mit AtMUS81-EME1A (10 bzw. 2 ng) bzw. AtMUS81-EME1B (6,4 bzw. 1,3 ng) bei 37 °C inkubiert und jeweils 20 µl Aliquots zu den Zeitpunkten 30, 60, 120, 180 und 240 min (XO-1) bzw. 150 sec, 5, 10, 30 und 60 min (nXO-1) entnommen und 8 µl der Probe auf das Gel geladen. Die Größen der Fragmente sind in Nukleotiden (Nt) angegeben. Der grüne Pfeil markiert den Nick in der HJ.

4.10.5.1 Umsatz und Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte der nHJ (nXO)

Gemäß des Aktivitätsabgleiches mit der nXO konnte mittels nativer PAGE bei allen vier nXO-Substraten ein etwa vergleichbarer Gesamtumsatz zwischen 20-30 fmol nach 1 Stunde Inkubation für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B festgestellt werden. Bereits nach 150 sec wurden jeweils mindestens 5 fmol von insgesamt 50 fmol eingesetztem Substrat umgesetzt. Dieses Ergebnis wurde mittels Quantifizierung der Sequenziergele (Abbildung 28) am Beispiel der nXO-1 bestätigt. In Abbildung 29 ist der Verlauf der Endonukleaseaktivität beispielhaft für AtMUS81-EME1A und der nXO-1 anhand der entstandenen Produktfragmente dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Hauptprodukt mit einer Größe von 22 Nukleotiden entstanden ist, dessen Menge (in fmol) mit zunehmender Inkubationszeit von 2,5 bis 60 min zunahm. Ein weiteres Schnittprodukt lag bei einer Größe von 23 Nukleotiden, welches allerdings einen nur geringen Anteil vom Gesamtprodukt ausmachte. Dieses Ergebnis konnte auch vergleichbar für AtMUS81-EME1B gezeigt werden. Eine prozentuale Auswertung zur Bestimmung des Schnittmusters von nXO ist in Abbildung 30 gezeigt. Das Hauptprodukt mit der Größe von 22 Nukleotiden korrespondiert mit einer Schnittstelle, welche 4 Basenpaare in 5'-Richtung vom Überkreuzungspunkt der HJ bzw. vom freien 5'-Ende des Nicks entfernt im ersten Duplex-Arm liegt.

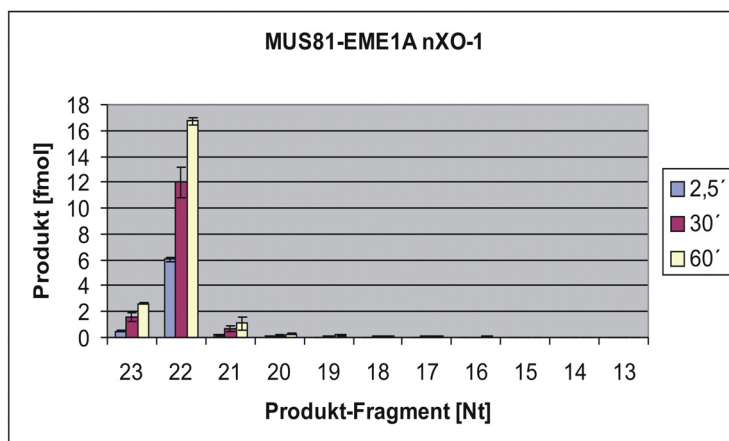


Abbildung 29: Prozessierung der nXO-1.

Quantifizierung der AtMUS81-EME1A Endonukleaseaktivität im Verlauf der Zeit gemäß Abbildung 18. Es wurden die Mengen (in fmol) der jeweils entstandenen Produktfragmente (in Nukleotiden) zu den Zeitpunkten 150 sec, 30 und 60 min aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen unabhängiger Assays, abzüglich der Kontrolle.

Eine Wiederholung dieser Analyse für die restlichen nXO-Substrate (nXO-2/-3/-4) und beide Homologe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B zeigte keine weiteren Schnittstellen. Dies bedeutet, dass keine Prozessierung der nXO in einem der anderen Duplex-Arme 2, 3 oder 4 stattgefunden hat, sondern ausschließlich im ersten Duplex-Arm geschnitten wurde. Wie bereits in Abschnitt 4.10.5 erwähnt wurde, können mittels nativer PAGE, im Gegensatz zu den Sequenziergele, auch die Produkte detektiert werden, welche nicht durch die

Schneideaktivität im jeweils markierten Duplex-Arm entstanden sind. Im Falle der nXO stellte die native PAGE somit eine Kontrolle der jeweiligen Endonukleasereaktion dar, anhand welcher die Enzymaktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei allen Ansätzen mit der nXO bestätigt werden konnte. Hierbei konnte eine vergleichbare Aktivität beider homologer Endonukleasekomplexe bei allen vier nXO-Substraten detektiert werden, unabhängig von der Position der radioaktiven Markierung.

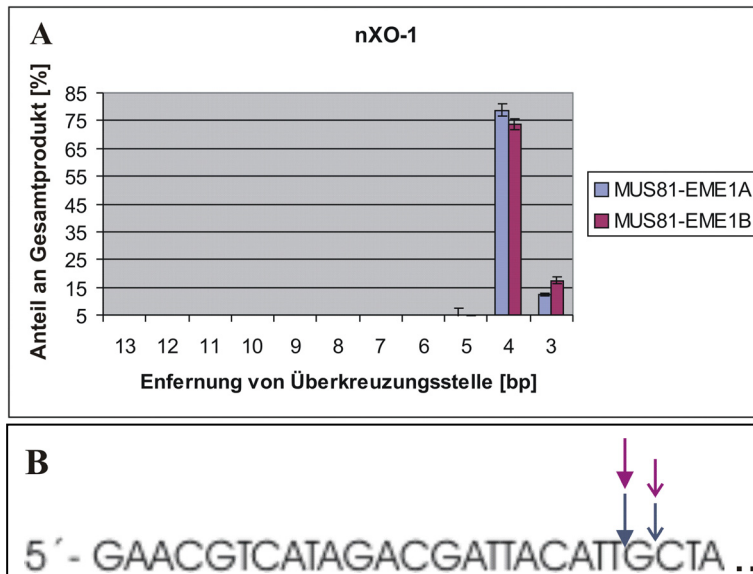


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Schnittprodukte vom Gesamtprodukt bei der nXO-1. A, Quantifizierung der prozentualen Anteile der Produktfragmente bezogen auf das Gesamtprodukt (in %) von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der nXO-1 nach 60 min Inkubationszeit, abzüglich der Kontrolle. Die Entfernung der Schnittstellen vom Überkreuzungspunkt der HJ-Struktur ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert von Doppelbestimmungen unabhängiger Assays; B, Schnittstellen von AtMUS81-EME1A (blau) und AtMUS81-EME1B (lila) im entsprechenden Oligonukleotid des ersten Duplex-Armes der nXO. Großer

Pfeil, 15-85 % Anteil vom Gesamtprodukt; kleiner Pfeil, 5-15 % Anteil vom Gesamtprodukt.

4.10.5.2 Umsatz und Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte der HJ (XO)

Für die intakte HJ (XO) konnte eine Prozessierung in allen vier Duplex-Armen sowohl für AtMUS81-EME1A als auch für AtMUS81-EME1B beobachtet werden.

In Abbildung 31 ist der Verlauf der Endonukleaseaktivität beispielhaft für AtMUS81-EME1A und der XO-1 anhand der entstandenen Produktfragmente des Sequenziergels (Abbildung 28) dargestellt. Man kann erkennen, dass eine Vielzahl von Schnittprodukten unterschiedlicher Größen entstanden ist. Die Menge dieser Produktfragmente (in fmol) nimmt mit zunehmender Inkubationszeit von 30 bis 240 min in unterschiedlichem Maße, aber deutlich zu. Es konnte auch hier keine Abnahme eines Produktes zugunsten der Entstehung eines anderen Produktes beobachtet werden. Ein ähnliches Verhalten konnte beim Umsatz der restlichen XO-Substrate sowohl für AtMUS81-EME1A als auch AtMUS81-EME1B beobachtet werden.

Da der Schwerpunkt dieser Analysen auf den Vergleich des Schnittmusters beider homologer Endonukleasekomplexe gelegt wurde, wurde die Auswertung des Gesamtumsatzes im Weiteren vernachlässigt.

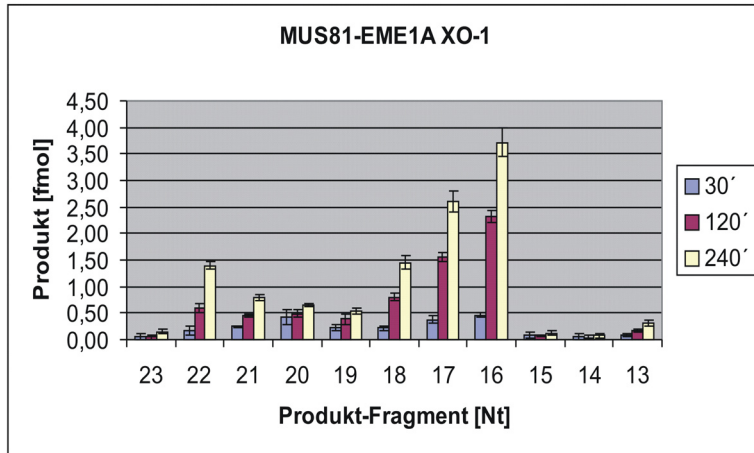


Abbildung 31: Prozessierung der XO-1. Quantifizierung der AtMUS81-EME1A Endonukleaseaktivität im Verlauf der Zeit gemäß Abbildung 28. Es wurden die Mengen (in fmol) der jeweils entstandenen Produktfragmente (in Nucleotiden) zu den Zeitpunkten 30, 120 und 240 min aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen unabhängiger Assays, abzüglich der Kontrolle.

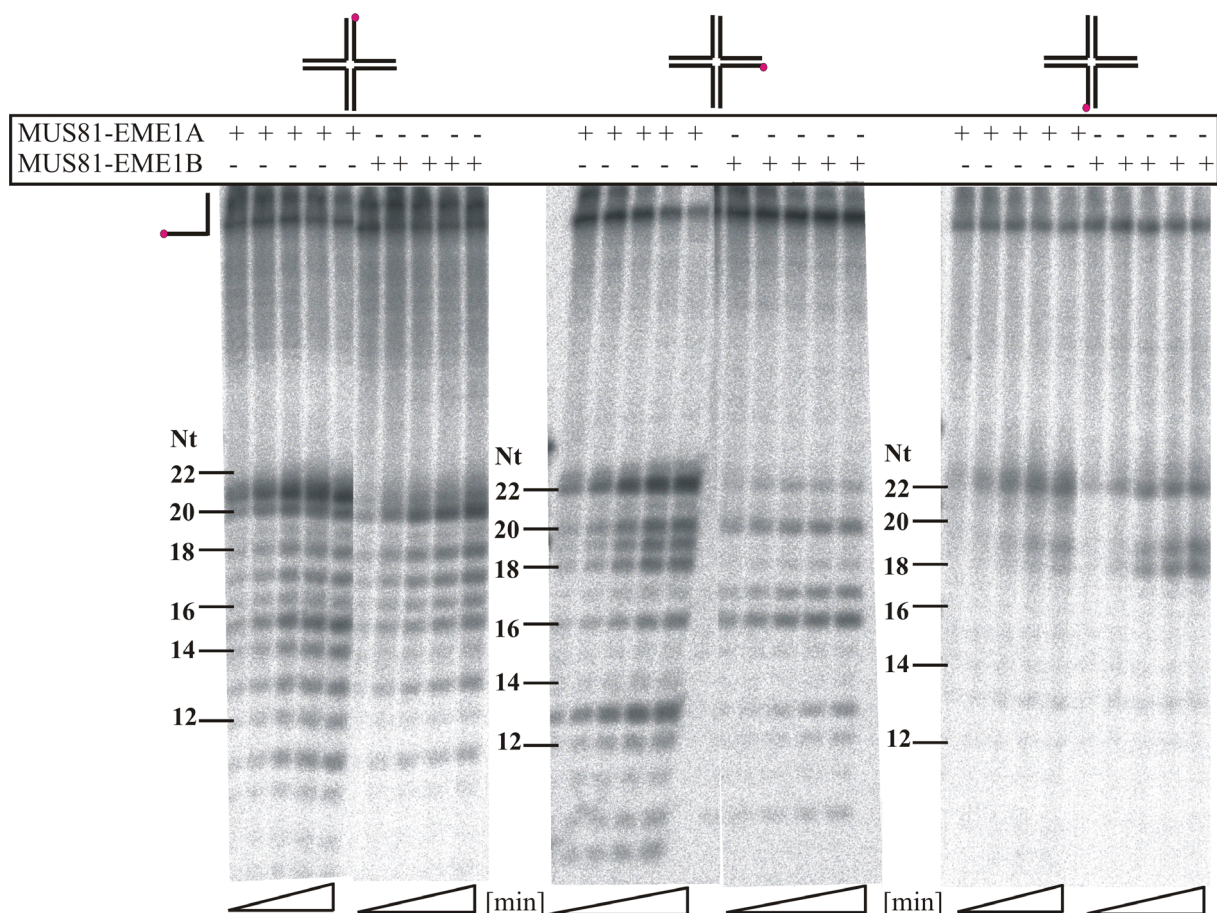


Abbildung 32: Umsatz der XO-2/-3/-4 von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B im Verlauf der Zeit (Sequenziergel). Jeweils 50 fmol Substrat der XO-Substrate wurden mit AtMUS81-EME1A (10 ng) bzw. AtMUS81-EME1B (6,4 ng) bei 37 °C inkubiert und jeweils 20 µl Aliquots zu den Zeitpunkten 30, 60, 120, 180 und 240 min entnommen und 8 µl der Probe auf das Gel geladen. Die Größen der Fragmente sind in Nucleotiden (Nt) angegeben.

Betrachtet man die vergleichende Analyse der anteilig entstandenen Produktfragmente von allen vier XO-Substraten (XO-1/-2/-3/-4) mit beiden Homologen AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B der entsprechenden Sequenziergele (Abbildung 32), so erkennt man ein für jeden Duplex-Arm charakteristisches Schnittmuster (Abbildung 33).

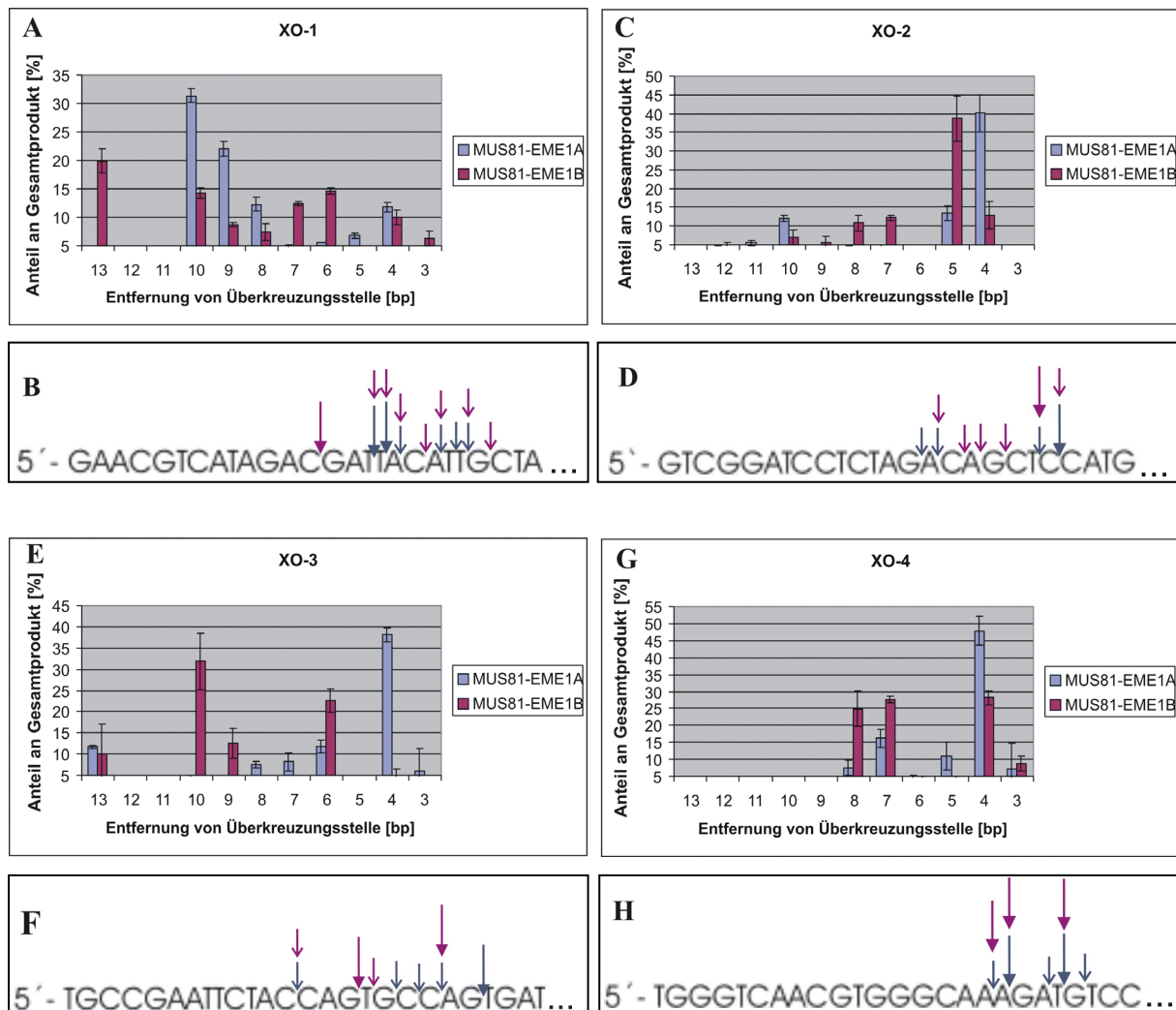


Abbildung 33: Prozentualer Anteil der Schnittprodukte bei der XO. A, C, E, G, Quantifizierung der prozentualen Anteile der Produktfragmente bezogen auf das Gesamtprodukt (in %) von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO-1/-2/-3/-4 nach 240 min Inkubationszeit, abzüglich der Kontrolle. Die Entfernung der Schnittstellen vom Überkreuzungspunkt der HJ-Struktur ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachbestimmungen unabhängiger Assays; B, D, F, H, Schnittstellen von AtMUS81-EME1A (blau) und AtMUS81-EME1B (lila) im entsprechenden Oligonukleotid der vier Duplex-Arme der XO. Großer Pfeil, 15-55 % Anteil vom Gesamtprodukt; kleiner Pfeil, 5-15 % Anteil vom Gesamtprodukt.

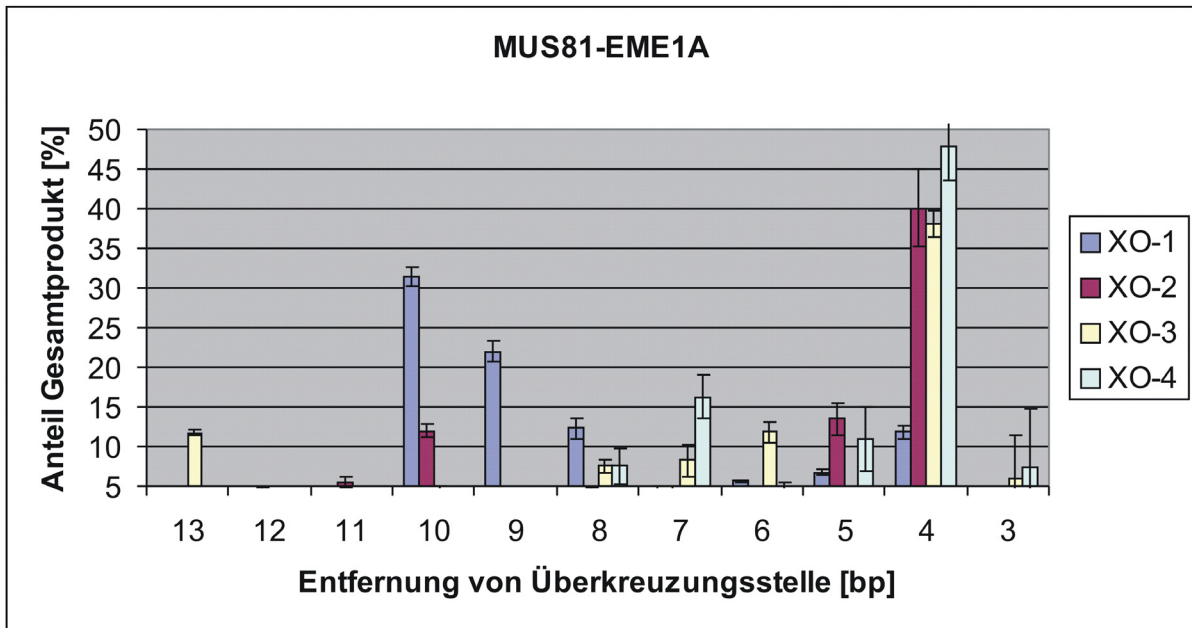


Abbildung 34: Schnittstellen von AMUS81-EME1A bei der XO. Überblick aller Schnittstellen von MUS81-EME1A in allen vier Duplex-Armen der XO-Struktur aus Abbildung 33.

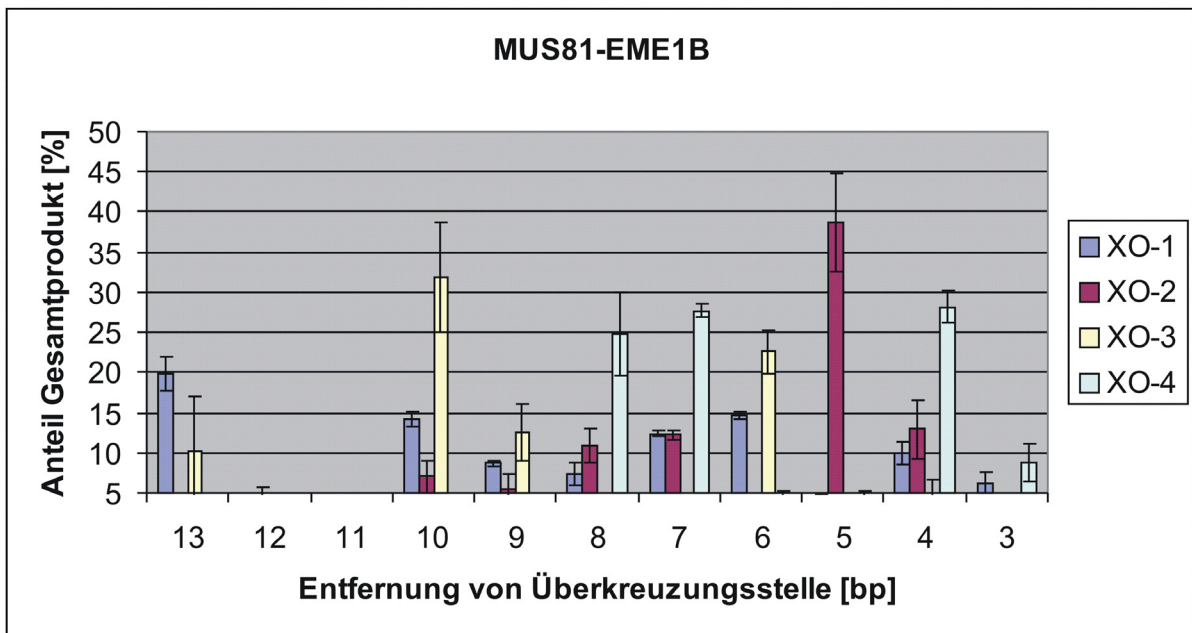


Abbildung 35: Schnittstellen von AtMUS81-EME1B bei der XO. Überblick aller Schnittstellen von MUS81-EME1B in allen vier Duplex-Armen der XO-Struktur aus Abbildung 33.

Die Gewichtung der Hauptschnittstellen von AtMUS81-EME1A lag bei drei von vier Duplex-Armen (XO-2/-3/-4) 4 Basenpaare in 5'-Richtung von der Überkreuzungsstelle der HJ entfernt. Die Hauptschnittstelle der XO-1 lag hingegen 10 bzw. eine weitere Schnittstelle 9 Basenpaare vom Überkreuzungspunkt der HJ entfernt. Weiterhin konnten mehrere Schnittstellen im Abstand von jeweils einem Nukleotid in den Bereichen um 3 bis 13 Basenpaare von der Überkreuzungsstelle entfernt beobachtet werden, welche allerdings zu einem geringeren Anteil entstanden. Auffällig ist eine Lücke bei 11 und 12 Basenpaaren, wo keine nennenswerten Schnittstellen in keinem der vier HJ-Arme auftraten. Es konnte keine Schneideaktivität in 3'-Richtung der jeweiligen Duplex-Arme detektiert werden (Abbildung 34).

Bei AtMUS81-EME1B war die Gewichtung der Hauptschnittstellen weniger definiert als bei AtMUS81-EME1A. Es konnten mehrere Schnittstellen in den vier Duplex-Armen beobachtet werden, welche anteilmäßig in etwa vergleichbar waren und im Abstand von 1 Nukleotid in den Bereichen zwischen 3 und 13 Basenpaaren auftraten. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Homologen war die Hauptschnittstelle bei der XO-2, welche bei AtMUS81-EME1B um 1 Nukleotid weiter versetzt, also 5 Nukleotide in 5'-Richtung von der Überkreuzungsstelle der HJ entfernt lag. Zudem konnte eine weitere nennenswerte Hauptschnittstelle im dritten Duplex-Arm bei 10 Nukleotiden festgestellt werden, vergleichbar mit der Hauptschnittstelle von AtMUS81-EME1A im ersten Duplex-Arm. Übereinstimmend waren auch bei AtMUS81-EME1B die fehlenden Schnittstellen im Bereich von 11 und 12 Nukleotiden von der Überkreuzungsstelle entfernt. Es konnten auch keine Schnittfragmente detektiert werden, welche aus einer Schneideaktivität in 3'-Richtung der vier Duplex-Arme hervorgingen (Abbildung 35).

5. Diskussion

Die MUS81-Endonuklease spielt eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden, beispielsweise bei der Reparatur und dem Neustart stehengebliebener und kollabierter Replikationsgabeln, sowie bei homologen Rekombinationsprozessen, um die Intaktheit und Stabilität des Genoms zu gewährleisten. Der MUS81-Endonukleasekomplex konnte bei den Säugern *Homo sapiens* und *Mus musculus*, sowie den Hefen *Schizosaccharomyces pombe* (MUS81-EME1) und *Saccharomyces cerevisiae* (MUS81-MMS4) identifiziert und bereits biochemisch charakterisiert werden. Für die Funktionsaufklärung wurden ergänzend zur Biochemie der Proteine auch entsprechende Mutantanalysen, sowie cytologische Untersuchungen durchgeführt, welche verdeutlichen, wie unterschiedlich sich homologe Gene in verschiedenen Organismen im Laufe der Evolution funktional entwickeln können. Dies wird vor allem am Beispiel der Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* deutlich, bei welchen die MUS81-Endonuklease mit unterschiedlicher Gewichtung bei meiotischen Rekombinationsprozessen beteiligt ist.

Bislang wurde kein pflanzliches MUS81-EME1-Homolog biochemisch analysiert, allerdings wurden einige genetische Daten von *Arabidopsis thaliana* (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008), sowie die Identifizierung eines *MUS81*-Homologs in Reis (Mimida *et al.*, 2007), veröffentlicht. Deshalb ist es von großem Interesse, Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften und die Funktionsweise des MUS81-Endonukleasekomplexes von der Modellpflanze *A. thaliana* zu gewinnen. Von zentraler Bedeutung ist die Identifizierung von zwei EME1-Homologen, AtEME1A und AtEME1B. In dieser Arbeit sollten mögliche funktionelle Unterschiede beider homologer Endonukleasekomplexe durch eine vergleichende Analyse auf biochemischer Ebene untersucht werden, was eine bessere Zuordnung ihrer biologischen Funktion ermöglichen soll.

5.1 Klonierung der AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Konstrukte

Eine Besonderheit im *Arabidopsis*-Genom ist, dass das *EME1*-Gen dupliziert vorkommt. Beide EME1-Homologe aus *A. thaliana*, AtEME1A und AtEME1B, weisen 62,7 % Sequenzhomologie zueinander und etwa 20 % Homologie zum menschlichen EME1 und 30 %, bzw. 17,2 % zu SpEME1 auf. AtEME1A und AtEME1B gehen vermutlich aus einer Genduplikation während der Entwicklung der Brassicaceen hervor.

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 erläutert, besitzt die katalytische Untereinheit aller Homologe der XPF/MUS81-Familie ein hochkonserviertes Aminosäuresequenzmotiv im katalytischen Zentrum, nämlich ERKX₃D, in der ERCC4-Endonukleasedomäne. In allen bereits charakterisierten MUS81-Komplexen des Menschen, der Maus und der Hefen, sowie in *Arabidopsis* sind zwei Aspartat-Reste (D) im konservierten Motiv zu finden, so dass man das Motiv mit ERKXXDD präzisieren kann. Die sauren Aspartat-Reste vermitteln die koordinative Bindung der Metallionen, welche als Cofaktoren für die enzymatische Aktivität der Proteine notwendig sind. Es konnte für SpMUS81 erstmals gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch der beiden Aspartat-Reste (D) durch Alanin-Reste (A) zum Funktionsverlust der Endonuklease führt (Boddy *et al.*, 2001). Die mutierte Proteinform von AtMUS81, AtMUS81(D470-471A), diente, wie in Abschnitt 4.8 erwähnt, als wichtige Qualitätskontrolle der Proteinaufreinigung.

Die Voraussetzung für einen funktionellen MUS81-Endonukleasekomplex ist die Dimerisierung von MUS81 mit dem Interaktionspartner EME1 bzw. MMS4. Übereinstimmend mit Ciccia *et al.* (2003) konnte keine Aktivität mit Proteinfractionen nachgewiesen werden, welche erst nach separater Präparation vereinigt wurden. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass Chaperone oder andere Hilfsfaktoren an der Bildung der funktionellen Endonukleasekomplexe beteiligt sein müssten.

Die Klonierung der AtMUS81-EME1-Konstrukte erfolgte daher in den Expressionsvektor pETDuet-1, welcher die Ko-Expression beider Proteine AtMUS81 und AtEME1 erlaubt. Dies hatte den Vorteil, dass sich beide Interaktionspartner direkt nach ihrer Expression in *E. coli* zu einem funktionellen, heteromeren Proteinkomplex zusammenlagern konnten. In einer vorangegangenen Diplomarbeit (Dürr, 2004) konnte gezeigt werden, dass nur mit ko-exprimierten Proteinen oder mit Proteinen, die nach getrennter Expression bei der Lyse vereinigt wurden, Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte.

Die Ausstattung beider Interaktionspartner AtMUS81 und AtEME1A bzw. AtEME1B mit je einem Fusions-Tag sollte eine konsekutive Aufreinigung der Proteinkomplexe ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden ein Hexa-Histidin (His)-Tag und der StrepII-Tag verwendet. Im ursprünglichen pETDuet-1-Vektor war ein S-Tag vorhanden, welcher sich allerdings im Rahmen meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Geuting, 2005) für die native Proteinaufreinigung als ungeeignet herausstellte. In dieser Arbeit wurde der S-Tag aus allen Vorläuferkonstrukten durch den StrepII-Tag ersetzt.

5.2 Optimierung der Expression

Bei der heterologen Überexpression in *E. coli* kann es vorkommen, dass die rekombinanten Proteine nicht vollständig oder nicht korrekt gefaltet werden und in unlöslicher Form als sogenannte Inclusion-Bodies präzipitieren. In dieser Form sind die Proteine katalytisch inaktiv und können nicht für Aktivitäts-Assays verwendet werden. Durch eine Veränderung der Expressionsbedingungen kann die Menge an löslich exprimiertem Protein jedoch optimiert werden. Die Löslichkeit der rekombinanten Proteine ist stark von ihrer Synthesegeschwindigkeit abhängig, welche durch die Temperatur während der Expression reguliert werden kann.

In meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Geuting, 2005) konnte gezeigt werden, dass eine Erniedrigung der Expressionstemperatur das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein verbesserte. Bei einer Expressionstemperatur von 37 °C lag der Großteil an rekombinantem Protein unlöslich vor während der Anteil an rekombinantem Protein in der löslichen Fraktion bei 21 °C größer war. Um genügend rekombinantes Protein zu erhalten, wurde eine optimale Expressionsdauer von 6 Stunden ermittelt. In dieser Zeit wurde eine ausreichende Menge an Zielprotein für die folgenden Proteinaufreinigungen und Aktivitäts-Assays gebildet.

5.3 Optimierung der Aufreinigung mit MUS81-EME1A

Nach der Optimierung der Expressionsbedingungen konnte die Aufreinigung optimiert werden. Hierzu wurden, wie bereits erwähnt, ein His-Tag und der StrepII-Tag verwendet, welche beide eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie erlauben.

Bei jedem Optimierungsschritt der Aufreinigung wurde sowohl die Reinheit der Proteinfractionen (durch SDS-PAGE) analysiert als auch die enzymatische Aktivität (durch Aktivitätsassays) überprüft. Da es beide Parameter zu optimieren galt, wurden Reinheit und Aktivität der Präparationen daher immer parallel analysiert.

Die in dieser Arbeit ausgearbeitete Reinigungsstrategie für die Endonukleasekomplexe musste gewährleisten, dass die aufgereinigten Fraktionen frei von *E. coli*-eigenen verunreinigenden und eventuell endonukleolytisch aktiven Proteinen waren, um eine zweifelsfreie Interpretation der Ergebnisse der Aktivitäts-Assays zu ermöglichen. Besonders wichtig war es außerdem die biologische Aktivität der Proteinkomplexe während der Aufreinigung zu erhalten. Speziell bei der Aufreinigung von Proteinkomplexen sollten die Bedingungen so schonend wie möglich zum Erhalt des Komplexes gewählt werden, um die Interaktion der Proteinpartner zu stabilisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden möglichst kleine Affinitäts-Tags gewählt, welche nicht mit der Faltung oder Funktion des fusionierten Proteins interferieren sollten und nicht mehr entfernt werden müssen. Da beide verwendeten Tags mit einer Größe von 6 (His-Tag) bzw. 8 (StrepII-Tag) Aminosäuren relativ klein waren, war keine Beeinflussung der Faltung oder Funktion der Proteine zu erwarten. Der His-Tag war N-terminal am AtMUS81- bzw. AtMUS81(D470-471A)-Protein und der StrepII-Tag C-terminal am AtEME1A- bzw. AtEME1B-Protein lokalisiert. Die Kombination beider Tags zur Aufreinigung (Doppelaffinitätschromatographie) sollte einen möglichst hohen Reinheitsgrad der Proteinkomplexe erzielen und die Stöchiometrie beider Interaktionspartner in den Endfraktionen gewährleisten.

Das Prinzip der Strep-Tactin-Chromatographie leitet sich von der Bindung von Biotin an Streptavidin ab und basiert auf der selektiven Interaktion des StrepII-Tags mit dem Streptavidinderivat Strep-Tactin. Die schonende Elution der getaggtten Proteine unter physiologischen Bedingungen (Schmidt und Skerra, 2007) erfolgt kompetitiv mit dem Biotinanalogen Desthiobiotin.

Das gebräuchlichste Metallion der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) stellt Nickel (Ni^{2+}) dar, jedoch konnte bereits in meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Geuting, 2005) gezeigt werden, dass Kupfer (Cu^{2+}) eine erfolgreiche Alternative zu Ni^{2+} darstellt. Bei der Cu^{2+} -IMAC konnten mehr verunreinigende Bakterienproteine abgereinigt werden als bei der Ni^{2+} -IMAC. Aufgrund von Selektivitätsunterschieden der verschiedenen Metallionen, welche direkten Einfluss auf das jeweilige Elutionsverhalten des Proteins haben, kann die Reinheit des Zielproteins verbessert werden (Yip *et al.*, 1989). Die schonendste und deshalb bevorzugte Methode der Elution der Zielproteine stellt die kompetitive Elution mit Imidazol (Histidin-Analogon) dar, welche deshalb auch in dieser Arbeit angewendet wurde.

Ein Problem der Nutzung von Poly-Histidin-Tags ist die Bindung nicht-getaggtter Proteine an das Affinitätsmaterial. Je nach Expressionssystem besitzen zelluläre Proteine mehrere benachbarte Histidin-Reste, welche eine Affinität zu den Metallionen aufweisen, wie die getaggtten Zielproteine und folglich coeluiert werden. Diese ungewollte Bindung von Bakterienproteinen kann oft durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration im Binde- bzw. Waschpuffer für die IMAC reduziert werden. Auch die unspezifische Interaktion zellulärer Bakterienproteine mit dem Säulenmaterial kann eine Ursache für die Aufreinigung zusätzlicher Proteine sein. Dies kann z. B. durch zusätzliche Waschschrte mit milden Detergenzien oder durch Hochsalzbedingungen vermieden werden.

Es besteht zudem die Möglichkeit, dass kontaminierende Proteine durch die Interaktion mit dem Zielprotein mit aufgereinigt werden. Da es sich bei der MUS81-Endonuklease um ein DNA-bindendes Protein handelt, kann dies an DNA des Wirtsorganismus gebunden vorliegen und dadurch weitere, zelleigene DNA-bindende Proteine mit aufreinigen. Alternativ kann auch die Interaktion zellulärer Proteine mit dem Zielprotein zu einer Kontamination der aufgereinigten Proteinfractionen führen.

Eine Analyse der Aufreinigungen wurde einerseits über kolloidal Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele bzw. immunologisch über Western-Blots und andererseits über Aktivitäts-Assays vorgenommen, um die Reinheit und Qualität der Fraktionen zu bewerten. Die unter identischen Bedingungen aufgereinigten AtMUS81(D470-471A)-EME1A- bzw. AtMUS81(D470-471A)-EME1B-Präparationen durften keine Aktivität zeigen, wohingegen die AtMUS81-EME1A bzw. AtMUS81-EME1B-Komplexe Aktivität zeigen sollten. Bei der Aufreinigung der jeweiligen aktiven und inaktiven Proteinformen sollten die gleichen kontaminierenden Bakterienproteine mitaufgereinigt werden.

Eine Identifizierung von zelleigenen Bakterienproteinen, welche an das Affinitätsmaterial der Cu²⁺-IMAC binden, konnte mit einem Kontrollansatz durchgeführt werden. Dazu wurde eine Expression mit dem pETDuet-1-Vektor ohne Zielgene durchgeführt und dieser Rohextrakt anschließend aufgereinigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein zelluläres Protein mit einer Größe von etwa 72 kDa mit hoher Affinität an die Cu²⁺-Säule gebunden hatte. Diese ungewollte Bindung von Bakterienproteinen konnte nicht durch eine erhöhte Imidazolkonzentration im Binde- bzw. Waschpuffer unterdrückt werden. Vermutlich handelte es sich hierbei um ein Protein mit mehreren Histidin-Resten, welches vergleichbar affin an die Cu²⁺-Säule gebunden hatte wie das getaggte Zielprotein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration im Bindepuffer der Cu²⁺-IMAC (siehe Abbildung 10) und durch eine Änderung des Elutionsgradienten (siehe Abbildung 12) eine enorme Verbesserung der Reinheit erzielt werden konnte. Die Erhöhung der Imidazolkonzentration im Bindepuffer führte zu einer deutlich reduzierten Bindung ungewollter Bakterienproteine. Durch die Änderung des Elutionsgradienten, verbunden mit einer Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer, konnte der AtMUS81-EME1A-Komplex auf wenige Fraktionen mit hoher Proteinausbeute konzentriert werden. Die beobachtete starke Aktivitätszunahme der entsprechenden Elutionsfraktionen nach der Dialyse in einen Niedrigsalzpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0) ist auf einen hemmenden Einfluss der vorhandenen Salze und gelösten Stoffe im Elutionspuffer (200 mM NaCl, 400 mM Imidazol) zurückzuführen. In Abschnitt 5.6 wird der

Effekt verschiedener Salze und ihrer Konzentrationen auf die Aktivität des MUS81-EME1A-Komplexes diskutiert.

Die Cu^{2+} -IMAC konnte zwar optimiert werden, der erzielte Reinheitsgrad war aber nicht ausreichend für die weitere Verwendung des AtMUS81-EME1A-Komplexes für Aktivitäts-Assays. Aus diesem Grund wurde als zweiter Aufreinigungsschritt die Strep-Tactin-Chromatographie angeschlossen. Zu Beginn wurden drei verschiedene Säulen mit unterschiedlichem Säulenmaterial getestet, welche unterschiedliche Bindungseigenschaften aufgrund der Porengröße des jeweiligen Materials aufwiesen. Laut Herstellerangaben (IBA-Company) wird die Verwendung der Sepharose- oder Superflow-Materialien empfohlen, wenn keine optimalen Aufreinigungsergebnisse mit der Macroprep-Matrix erhalten wurden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich tatsächlich auch nur die Sepharose- und Superflow-Säulen für die Aufreinigung des AtMUS81-EME1A-Komplexes bezüglich der Ausbeute an Zielprotein im Eluat nach der Doppelaufreinigung (Cu^{2+} -IMAC mit anschließender Strep-Tactin-Chromatographie) eigneten. Die enzymatische Aktivität der entsprechenden Proteinfractionen betreffend konnten allerdings nur die Elutionsfraktionen der Superflow-Säule das 3'-Überhang-Substrat umsetzen. Dies bestätigt auch laut Hersteller, die besondere Eignung des Superflow-Säulenmaterials für große Proteinkomplexe.

In Abbildung 13 ist deutlich zu erkennen, dass durch den zweiten Aufreinigungsschritt, die Strep-Tactin-Chromatographie, eine weitere Verbesserung der Reinheit der AtMUS81-EME1A-Fractionen erreicht werden konnte. Das zuvor noch an die Cu^{2+} -Säule gebundene Protein von etwa 72 kDa, welches genau im Größenbereich von AtMUS81 lag, wurde bei der Strep-Tactin-Chromatographie erfolgreich entfernt.

Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Durchführung der Schwerkraftchromatographie vermutlich schonender für den Erhalt eines funktionellen AtMUS81-EME1-Proteinkomplexes war als die Aufreinigung an der Flüssigchromatographieanlage, was sich entsprechend positiv auf die Aktivität auswirkte. Die Methode der Strep-Tactin-Chromatographie konnte bezogen auf die Ausbeute an Zielprotein und die Aktivität der entsprechenden Fractionen durch das Ersetzen der vorgepackten Säule für die Flüssigchromatographieanlage durch gleichwertiges Säulenmaterial für Schwerkraftsäulen und durch eine Erhöhung der eingesetzten Menge des Affinitätsmaterials verbessert werden.

Da über den Affinitäts-Tag des jeweiligen Interaktionspartner aufgereinigt wurde, konnte bei der Doppelaффinitätschromatographie auch ein Überschuss an frei vorliegenden Monomeren entfernt und gleichzeitig die Interaktion beider Komplexpartner nachgewiesen werden, was

eine Voraussetzung für die Funktionalität der Endonuklease ist. Folglich wurde bei der Cu²⁺-IMAC nicht komplexiertes AtEME1-Protein und bei der Strep-Tactin-Chromatographie frei vorliegendes AtMUS81-Protein abgereinigt. Beide Komplexpartner lagen in den Endfraktionen also in stöchiometrischem Verhältnis vor.

Für die endgültige Doppelaufreinigung wurde die Reihenfolge beider Chromatographien so gewählt, dass durch die Kombination von Strep-Tactin-Chromatographie und anschließender Cu²⁺-IMAC eine Aufkonzentrierung der Endproteinfraktionen mit hoher Proteinausbeute und Reinheit sowie eine maximale Aktivität erreicht werden konnte. Die fehlende Aktivität der AtMUS81-EME1A-Elutionsfraktionen direkt nach der Strep-Tactin-Chromatographie legte die Vermutung nahe, dass im Überschuss vorliegendes AtEME1A-Protein die enzymatische Aktivität des Proteinkomplexes hemmte. Eine eventuelle Hemmung durch die Substanzen im Elutionspuffer (z. B. Desthiobiotin) konnte ausgeschlossen werden, da bei den Fraktionen nach der Doppelaufreinigung Cu²⁺-IMAC mit anschließender Strep-Tactin-Chromatographie Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte.

Diese optimierte Methode der Doppelaффinitätschromatographie konnte sowohl auf AtMUS81-EME1B- als auch auf die AtMUS81(D470-471A)-EME1A- und AtMUS81(D470-471A)-EME1B-Komplexe erfolgreich übertragen werden. Dies erlaubte eine direkte Vergleichbarkeit der enzymatischen Aktivitäten der homologen Endonukleasekomplexe. Die fehlende Enzymaktivität konnte für die mutierten Proteinformen bestätigt werden.

5.4 Nachweis der Endonukleaseaktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B

In dieser Arbeit konnte erstmals für Pflanzen gezeigt werden, dass beide homologe Proteinkomplexe der MUS81-Endonuklease von *A. thaliana*, MUS81-EME1A und MUS81-EME1B, endonukleolytische Aktivität besitzen. Die Funktionalität beider Homologe ist nicht selbstverständlich. Beim Menschen konnte lediglich die *in vitro* Interaktion des EME1-Homologes mit MUS81 und dessen Enzymaktivität festgestellt werden (Chen *et al.*, 2001).

Die Aktivität des AtMUS81-EME1A-Komplexes im Verlauf der Optimierung der Aufreinigung wurde bereits im vorangehenden Abschnitt analysiert.

5.5 Reaktionsbedingungen

In dieser Arbeit wurden alle Enzym-Assays bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Dies stellt nicht unbedingt die physiologische Reaktionstemperatur für pflanzliche Proteine

dar. Die Temperatur wurde jedoch so gewählt, da bei den Endonuklease-Assays eine möglichst gut detektierbare Enzymaktivität erreicht werden konnte und diese in Abhängigkeit von der Temperatur (RGT-Regel) steht. Für alle anfänglichen Optimierungsschritte wurde das 3'-Überhang-Substrat verwendet. Im Laufe der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass nicht alle der gewählten Bedingungen für alle Substrate optimal waren. Eine erneute Optimierung für die HJ-Strukturen ist Abschnitt 5.10 zu entnehmen.

Die Konzentrationen von BSA (100 µg/ml) und DTT (1 mM) wurden in dieser Arbeit nicht verändert, sondern wie für HsMUS81-EME1, ScMUS81-MMS4 und SpMUS81-EME1 verwendet (Constantinou *et al.*, 2002; Doe *et al.*, 2002; Ciccia *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Whitby *et al.*, 2003). Die anfängliche Konzentration von 50 mM Tris-HCl (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Gaillard *et al.*, 2003) im Reaktionspuffer konnte ohne negativen Einfluss auf die Enzymaktivität auf 25 mM (Doe *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2007) reduziert werden, um einen Überschuss an Puffersalzen zu vermeiden. Der pH-Wert wurde auf 7,0 festgelegt, da er im physiologischen Bereich liegt und bereits für die Aufreinigung und Lagerung der Proteinkomplexe unter Berücksichtigung der entsprechenden pI-Werte gewählt wurde. Auf den Einfluss der MgCl₂-Konzentration wird in Abschnitt 5.11 eingegangen. Es wurde anfänglich die Konzentration von 2,5 mM MgCl₂ (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Gaillard *et al.*, 2003; Fricke *et al.*, 2005; Gaskell *et al.*, 2007) eingehalten. Für die Herstellung der DNA-Substrate wurden die Oligonukleotidsequenzen nach Boddy *et al.* (2001) und Gaillard *et al.* (2003) verwendet.

5.6 Einfluss von Salzen

Es wurde der Einfluss des Ionenmilieus mit verschiedenen Salzen (bzw. gelösten Stoffen) und ihren Konzentrationen auf den Substratumsatz beim 3'-Überhang getestet, da bereits bei der Aufreinigung (siehe Abschnitt 4.9.2) ein hemmender Effekt auf die Enzymaktivität von MUS81-EME1A beobachtet werden konnte. Dabei wurde für Imidazol, Natriumchlorid und Kaliumchlorid eine zunehmende Hemmung des Substratumsatzes mit steigender Konzentration festgestellt. Ab einer Konzentration von 100 mM nahm die Enzymaktivität deutlich ab und wurde schließlich vollständig gehemmt. Dies bestätigte die fehlende Aktivität der Elutionsfraktionen der Cu²⁺-IMAC (400 mM Imidazol und 200 mM NaCl) und die starke Aktivitätszunahme der entsprechenden Fraktionen nach dem Umpuffern in Niedrigsalzpuffer (50 mM Tris-HCl). Deswegen war das Umpuffern der Elutionsfraktionen der Cu²⁺-IMAC für alle weiteren Aktivitätsnachweise notwendig. Zudem wurde auf einen Zusatz einwertiger Kationen in den Enzym-Assays verzichtet. Für den ScMUS81-MMS4-Komplex (endogen und

rekombinant) konnte sogar eine verbesserte Aktivität am 3'-Überhang-Substrat bei einer NaCl-Konzentration von bis zu 150 mM festgestellt werden. Dieses Ionenmilieu entspricht in etwa den physiologischen Bedingungen in der Hefe. Eine Konzentration von über 200 mM NaCl führte jedoch zu einer Abnahme der Enzymaktivität (Fricke *et al.*, 2005; Ehmsen *et al.*, 2008).

5.7 Einfluss divalenter Metallionen

Die Enzymaktivität der MUS81-Endonukleasekomplexe von Mensch und Hefen ist abhängig von Metallionen, welche als Cofaktoren dienen (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001; Übersicht in Ciccina *et al.*, 2008). Da die sauren Aspartat-Reste des hochkonservierten katalytischen Zentrums von MUS81 die Bindung dieser Cofaktoren bewerkstelligen, führt ein Aminosäureaustausch zur Inaktivierung der Endonuklease. In dieser Arbeit wurde am Beispiel des 3'-Überhang-Substrates getestet, welche Metallionen für die Katalyse der Endonukleaseaktivität der AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Komplexe geeignet waren. Es konnte gezeigt werden, dass beide Enzymaktivitäten durch Mg^{2+} , Ca^{2+} und Mn^{2+} gefördert wurden, jedoch nicht durch Ni^{2+} und Zn^{2+} . Speziell bei Mn^{2+} als Cofaktor wurde sogar eine höhere Enzymaktivität beim 3'-Überhang und bei den HJ-Strukturen beobachtet als mit Mg^{2+} sowie die Entstehung weiterer Produktbanden. Dieser Effekt der Erhöhung der Enzymaktivität mit Mn^{2+} konnte schon bei Restriktionsendonukleasen beobachtet werden, welche zudem eine veränderte Sequenzspezifität in Anwesenheit von Mn^{2+} , anstatt ihres natürlichen Cofaktors Mg^{2+} , zeigten. Dies ist auf eine Veränderung der Raumstruktur der Metallionen-bindenden aktiven Zentren zurückzuführen, was vermutlich einen Einfluss auf die Substratspezifität der Enzyme hat (Übersicht in Cowan *et al.*, 1998).

Wie erwartet zeigten die AtMUS81(D470-471A)-EME1A- und AtMUS81(D470-471A)-EME1B-Komplexe keine enzymatische Aktivität. Dies bestätigte erneut die Qualität der Aufreinigung und die Tatsache, dass keine kontaminierenden Bakterienproteine in den Präparationen vorhanden waren, welche eventuell durch verschiedene Metallionen aktiviert werden könnten.

Auch für ScMUS81-MMS4 konnten Mg^{2+} und Mn^{2+} als Cofaktoren verwendet werden (Fricke *et al.*, 2005; Ehmsen *et al.*, 2008). Mit Ca^{2+} als Cofaktor konnte ScMUS81-MMS4 die HJ-Struktur zwar binden (Gaskell *et al.*, 2007), jedoch nicht umsetzen (Ehmsen *et al.*, 2008).

5.8 Umsatz des 3'-Überhang-Substrates

3'-Überhänge entstehen beispielsweise bei der homologen Rekombinationsreparatur von DSBs, wenn die Sequenz des neusynthetisierten Stranges länger ist als das andere freie 3'-Ende des DSB. Das Prozessieren dieses 3'-Überhanges, vermutlich durch den MUS81-Endonukleasekomplex, ist notwendig, um ein Fortschreiten des Mechanismus zu gewährleisten. Dies ist beispielhaft für den SDSA-Mechanismus in Abbildung 36A dargestellt. Nicht prozessierte 3'-Überhänge können auch die Ausbildung von dHJs verhindern und eine Anhäufung von unaufgelösten Rekombinationsintermediaten verursachen (Abbildung 36B).

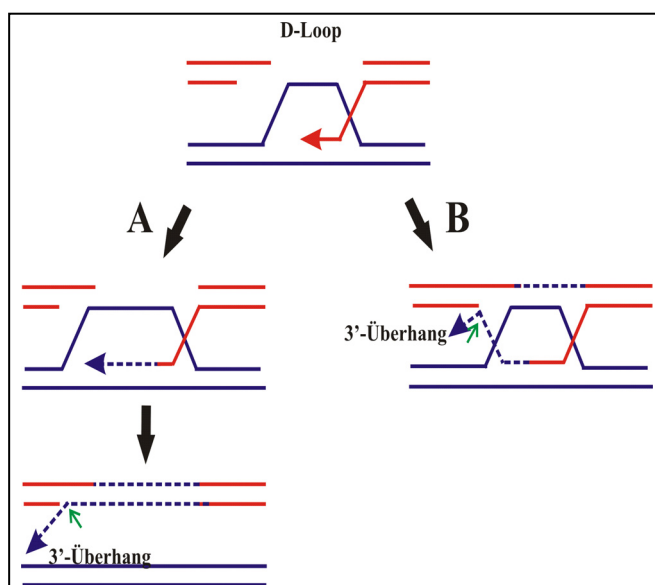


Abbildung 36: Wege der DSB-Reparatur. **A**, Ausschnitt aus dem SDSA-Mechanismus: die Sequenz des neusynthetisierten DNA-Stranges (unterbrochene Linien) ist länger als das andere freie 3'-Ende des DSB, so dass ein komplettes Annealen nicht möglich ist und ein 3'-Überhang entsteht. Dieser muss prozessiert werden, um ein Fortführen des Mechanismus zu ermöglichen; **B**, Ausschnitt aus dem DSB-Reparaturmechanismus: die Sequenz des neusynthetisierten DNA-Stranges ist länger als das andere freie 3'-Ende des DSB, so dass ein komplettes Annealen nicht möglich ist und die Ausbildung der dHJ verhindert wird. Der entstandene 3'-Überhang muss prozessiert werden, um eine fehlerbehaftete Auflösung der Rekombinationsintermediate zu verhindern; grüner Pfeil, Schnittstelle der ScMUS81-MMS4-Endonuklease (de los Santos *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2008; verändert).

Wie es für *MUS81*- bzw. *MMS4*-defiziente *S. cerevisiae*-Zellen beobachtet wurde, resultiert dies in einer Abnahme von dHJs, welche Vorläufer von COs sind. Die daraus resultierenden Rekombinationsintermediate sind sehr labil und werden durch alternative Mechanismen prozessiert, was zu einer fehlerhaften Chromosomensegregation führt und schließlich den letalen Effekt auf die Sporen zur Folge hat (de los Santos, *et al.*, 2003).

Alternativ wird vermutet, dass ScMUS81-MMS4 jene aberrante Chromosomenstrukturen prozessieren kann, welche durch eine unregulierte Überkreuzung mehrerer Chromatiden während der meiotischen Metaphase I entstehen, was zu unregulierten CO-Ereignissen führen kann. Die Auflösung dieser Strukturintermediate soll erneut freie DSB-Enden erzeugen, um eine Ausbildung von dHJs zu ermöglichen. Da diese Schritte notwendig sind, um einen regulierten HR-Prozess überhaupt zu ermöglichen, wird für ScMUS81-MMS4 schon eine frühe Funktion in der meiotischen Rekombination vermutet (Oh *et al.*, 2008). Auch die beobachtete Ko-Lokalisierung von AtMUS81 mit dem Rekombinationsprotein AtRAD51 in

den Nuklei von Pollenmutterzellen während der meiotischen Prophase I, stützen die Vermutung einer frühen Funktion des MUS81-Endonukleasekomplexes in meiotischen Rekombinationsprozessen in *A. thaliana* (Higgins *et al.*, 2008).

Beide Homologe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B konnten das 3'-Überhang-Substrat prozessieren, mit einer deutlich höheren Aktivität von AtMUS81-EME1B im Vergleich zu AtMUS81-EME1A. Dieser signifikante Unterschied kann auf eine Substratpräferenz von AtMUS81-EME1B für den 3'-Überhang zurückzuführen sein. Beide homologe Komplexe zeigten allerdings die gleichen Positionen ihrer endonukleolytischen Schnitte im Substrat (siehe Abschnitt 4.9.8). Zudem konnte eine zeitabhängige Zunahme der Prozessierungsprodukte beobachtet werden, was einen weiteren Umsatz bereits entstandener Produkte ausschließen lässt.

Die gleiche 3'-Überhang-Struktur wie in dieser Arbeit (siehe Abbildung 7C) wurde auch für die Analyse von ScMUS81-MMS4 (rekombinant und endogen) (Whitby *et al.*, 2003) und SpMUS81-EME1 (rekombinant und endogen) (Gaillard *et al.*, 2003; Whitby *et al.*, 2003) verwendet. Sowohl ScMUS81-MMS4 als auch SpMUS81-EME1 konnten das 3'-Überhang-Substrat effizient schneiden.

Für die Charakterisierung von HsMUS81-EME1 (rekombinant und endogen) (Constantinou *et al.*, 2002; Ciccia *et al.*, 2003) und teilweise auch von ScMUS81-MMS4 (rekombinant und endogen) (Bastin-Shanower *et al.*, 2003; Kaliraman *et al.*, 2001; Fricke *et al.*, 2005) war der 3'-Überhang aus anderen Oligonukleotiden aufgebaut. Auch in diesem Fall setzten HsMUS81-EME1 und ScMUS81-MMS4 das 3'-Überhang-Substrat effizient um.

Das Prozessieren dieser 3'-Überhänge ist notwendig, um ein Fortführen der homologen Rekombinationsreparatur zu ermöglichen und eine Beteiligung an diesen Prozessen ist eine Funktion, die der MUS81-Endonuklease generell zugeschrieben wird. Möglicherweise spielt der AtMUS81-EME1B-Komplex eine größere Rolle bei der Prozessierung dieser 3'-Überhang-Strukturen, als AtMUS81-EME1A. Dies unterstützt außerdem die Vermutung einer frühen Funktion der MUS81-Endonukleasekomplexe in Rekombinationsprozessen, was sowohl für meiotische als auch für mitotische Zellen denkbar wäre.

Übereinstimmend für SpMUS81-EME1 und ScMUS81-MMS4 (Gaillard *et al.*, 2003, Whitby *et al.*, 2003; Bastin-Shanower *et al.*, 2003) konnten die Positionen der endonukleolytischen Schnitte beim 3'-Überhang mit Hilfe von Sequenziergelen detektiert werden, welche zwischen 2 und 6 Nukleotiden in 5'-Richtung von der Verzweigungsstelle des Überhangs entfernt im Duplexbereich lagen. Ein freies 5'-Ende in unmittelbarer Nähe von der Verzweigungsstelle des 3'-Überhangs soll die Restriktion begünstigen (Bastin-Shanower

et al., 2003). Die Schneideaktivität war jeweils unabhängig von der DNA-Sequenz und vergleichbar für rekombinante und endogene Endonukleasekomplexe.

Die Positionen der endonukleolytischen Schnitte für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B stimmen, mit 3 und 4 Nukleotiden in 5'-Richtung vom Verzweigungspunkt des 3'-Überhangs entfernt im Duplexbereich, mit den Schnittstellen von SpMUS81-EME1 und ScMUS81-MMS4 überein. Die Präferenz von AtMUS81-EME1A für die Position von 4 Nukleotiden von der Verzweigungsstelle entfernt konnte auch für die HJ-Strukturen beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.10.5).

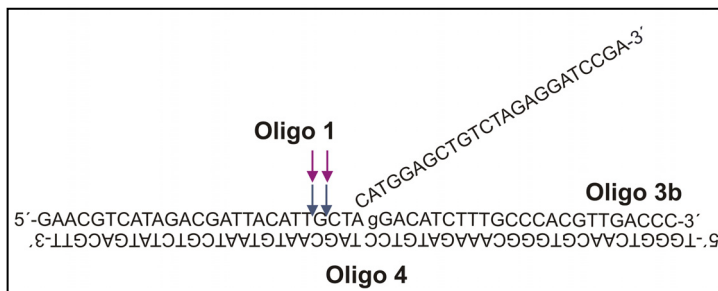


Abbildung 37: Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B beim 3'-Überhang. Es sind die Schnittstellen für AtMUS81-EME1A (blauer Pfeil) und AtMUS81-EME1B (lila Pfeil) in den Positionen 3 und 4 Nukleotide in 5'-Richtung vom Verzweigungspunkt entfernt im Duplexbereich dargestellt.

5.9 Umsatz der HJ-Strukturen

Die HJ stellt eines der wichtigsten Intermediate der homologen Rekombination dar. Dieser Mechanismus ist sowohl in der Meiose von Bedeutung als auch bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen sowie blockierten und kollabierten Replikationsgabeln (siehe Abbildungen 3 und 4). Nachdem einzelsträngige DNA in einen homologen DNA-Strang eingewandert ist und eine D-Loop-Struktur ausgebildet wurde kann diese weiter zu einer HJ umgesetzt werden. Außerdem kann die Regression einer blockierten Replikationsgabel zur Ausbildung einer als „Chicken-foot“-Struktur bezeichneten HJ (siehe Abbildung 2) führen (Übersicht in Ciccina *et al.*, 2008). Da der MUS81-EME1- bzw. MUS81-MMS4-Endonuklease eine Rolle bei der Prozessierung von Intermediaten der homologen Rekombination zugesprochen wird, ist die Untersuchung der HJ-Struktur von besonderem Interesse. Wie bereits in Abschnitt 1.4.2.2 erläutert existieren bei rekombinanten und endogenen Proteinpräparationen Unterschiede in der Fähigkeit die intakte HJ-Struktur zu prozessieren. Der entscheidende Unterschied zwischen rekombinanten und endogenen MUS81-Komplexen die intakte HJ zu prozessieren liegt vermutlich in der Fähigkeit begründet den ersten Schnitt zu bewerkstelligen.

Es wurden verschiedene HJ- und HJ-ähnliche Strukturen analysiert wie z. B. die statische HJ (XO) und partiell mobile HJs mit einem homologen Bereich im Überkreuzungspunkt (X12

bzw. X26 mit einer Homologie von 12 bzw. 26 Basenpaaren). In dieser Arbeit wurde die statische XO-HJ-Struktur, darunter die intakte (XO) und die genickte HJ (nXO) ohne Sequenzhomologien nach Boddy *et al.* (2001) verwendet.

Es konnte in dieser Arbeit erstmals für Pflanzen gezeigt werden, dass beide homologe AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Endonukleasekomplexe die genickte und die intakte HJ prozessieren konnten. Dies war nicht selbstverständlich, da es sich hierbei um rekombinante Proteinpräparationen handelte.

Übereinstimmend für alle charakterisierten MUS81-EME1- bzw. MUS81-MMS4-Endonukleasekomplexe des Menschen und der Hefen konnten signifikante Unterschiede zwischen rekombinanten und endogenen Proteinpräparationen, in der Fähigkeit eine intakte HJ zu prozessieren, festgestellt werden.

Während für rekombinant in *E. coli* exprimierte Endonukleasekomplexe keine oder nur sehr schwache Aktivität mit der intakten HJ nachgewiesen werden konnte (Kaliraman *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002; Ciccina *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Fricke *et al.*, 2004; Taylor und McGowan, 2008), zeigten homologe Komplexe endogenen Ursprungs hingegen teilweise Umsatz bei der intakten HJ (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Constantinou *et al.*, 2002; Ciccina *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 2003).

Dieser Effekt soll laut Doe *et al.* (2002) und Gaillard *et al.* (2003) auf die Anwesenheit aktivierender Proteinfaktoren oder post-translationaler Modifikationen der endogenen Proteinextrakte zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse einer weiteren Studie widerlegen allerdings die Vermutung, dass post-translationalen Modifikationen der endogenen Proteinpräparationen einen Einfluss auf die Fähigkeit der HJ-Prozessierung der entsprechenden Endonukleasekomplexe ausüben. Hier konnte auch mit endogenem ScMUS81-MMS4-Komplex keine Aktivität bei der XO festgestellt werden, im Gegensatz zur nXO. Die entsprechenden Zellen, aus denen der Komplex anschließend isoliert wurde, wurden mit Mutagen behandelt, was zu einer durch genotoxischen Stress bedingten Phosphorylierung des ScMUS81-MMS4-Komplexes führte und somit eine physiologisch relevante Modifikation darstellte (Ehmsen und Heyer, 2008).

Im Gegensatz dazu wird ein anderer Effekt diskutiert, welcher Einfluss auf die Prozessierung der HJ ausüben soll, und zwar die Oligomerisierung der Endonukleasekomplexe. Die Arbeitsgruppe um Whitby *et al.* konnte 2007 erstmals Aktivität bei rekombinanten SpMUS81-EME1- und ScMUS81-MMS4-Endonukleasekomplexen mit der intakten HJ nachweisen. Dies lag darin begründet, dass beide Komplexe als tetramere Komplexe, bestehend aus zwei MUS81- und zwei EME1- bzw. MMS4-Untereinheiten, aufgereinigt

werden konnten, welche sowohl die genickte als auch die intakte HJ effizient schneiden konnten (Gaskell *et al.*, 2007). Der von Gaillard *et al.* (2003) vorgeschlagene „Nick-counternick“-Mechanismus zur Prozessierung der intakten HJ – welcher zwei aufeinanderfolgende Schnitte im Überkreuzungspunkt der HJ erfordert – lässt die Anwesenheit zweier aktiver Zentren vermuten.

Eine Dimerisierung von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B – zu einem Komplex aus insgesamt vier Proteinuntereinheiten – konnte in dieser Arbeit zwar nicht eindeutig nachgewiesen werden, allerdings gibt es Hinweise auf das Vorhandensein oligomerer Endonukleasekomplexe durch Cross-Linking-Experimente (chemische Quervernetzung von Proteinkomplexen).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass nicht allein die Tatsache der rekombinanten oder endogenen Herkunft der Proteinpräparationen eine Rolle spielt, sondern möglicherweise die Aufreinigungsstrategie der Proteinkomplexe einen entscheidenden Einfluss ausübt. Wenn eine Voraussetzung für die erfolgreiche Prozessierung der HJ-Struktur tatsächlich das Vorhandensein tetramerer MUS81-EME1- bzw. MUS81-MMS4-Komplexe ist, könnten diese unter Umständen bereits während der Aufreinigung zerstört werden. Nur ausreichend hoch konzentrierte Proteinpräparationen (Gaskell *et al.*, 2007) könnten den Zusammenhalt der tetrameren Komplexe, auch während der Aufreinigung, gewährleisten. Für die Prozessierung der 3'-Überhang- und nHJ-Struktur hingegen sollte der dimere Endonukleasekomplex mit einem aktiven Zentrum ausreichend sein.

5.10 Aktivitätsabgleich mit der nHJ und Optimierung der Assaysbedingungen für die HJ-Substrate

Für eine vergleichende Analyse der Enzymaktivität beider homologer Endonukleasekomplexe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der HJ mussten vergleichbare Voraussetzungen gewährleistet werden. Unter Umständen kann es sein, dass nur ein bestimmter Anteil des aufgereinigten Proteins in den Fraktionen funktionell ist. Die Menge an aktiven Proteinmolekülen kann zudem in verschiedenen Proteinpräparationen – trotz identischem Aufreinigungsverfahren – unterschiedlich ausfallen. Um Fehlinterpretationen von Ergebnissen zu vermeiden, welche auf Unterschiede in der Enzymaktivität – aufgrund unterschiedlicher Mengen funktioneller Komplexmoleküle – zurückzuführen sind, wurde die Aktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B abgeglichen. Diese Normierung erfolgte mit dem nXO-Substrat, welches als direkter Bezug zur Prozessierung der XO-

Struktur diene. Die so ermittelte Stöchiometrie der Proteinkonzentrationen von 1:1,56 für AtMUS81-EME1B:AtMUS81-EME1A legte die Vermutung nahe, dass entweder unterschiedliche Anteile aktiver Endonukleasekomplexe der beiden Homologe in den verschiedenen Präparationen vorhanden waren oder, dass die homologen Proteinkomplexe, aufgrund inherenter Eigenschaften, unterschiedlich aktiv waren.

Ein vergleichbarer Aktivitätsabgleich mit der nXO wurde von Gaskell *et al.* (2007) für den rekombinanten und endogenen SpMUS81-EME1-Komplex vorgenommen.

Gemäß des postulierten „Nick-counternick“-Mechanismus benötigt die Prozessierung der intakten HJ mehr Zeit als die der genickten HJ.

Es konnte tatsächlich auch für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B beobachtet werden, dass die nHJ viel schneller prozessiert wurde als die HJ. Bereits nach 2,5 min Inkubationszeit konnten etwa 10 % Substratumsatz bei beiden Homologen mit der nXO beobachtet werden. Zudem benötigte die Prozessierung der nHJ weniger Enzym – nur ein Fünftel der Proteinmengen von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B verglichen mit den Ansätzen für die HJ.

Auch für die MUS81-Endonukleasekomplexe der Hefen erwies sich die nHJ als hervorragendes Substrat, unabhängig davon, ob es sich um endogene oder rekombinante Proteinpräparationen handelte (Osman *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 2003; Fricke *et al.*, 2005; Gaskell *et al.*, 2007; Ehmsen und Heyer, 2008; Taylor und McGowan, 2008).

Dies ist auf das Vorhandensein des ersten Schnittes, also den Nick in der HJ-Struktur zurückzuführen, welcher den langsamen und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Prozessierung der HJ darstellt. Der zweite und damit schnellere Schnitt, wie er hier bei der nHJ erfordert ist, erfolgt dann unmittelbar nach dem ersten und löst die (genickte) HJ in zwei Duplexe auf.

5.11 Einfluss divalenter Metallionen auf die Enzymaktivität und die Konformation der HJ

Es konnte in einigen Fällen beobachtet werden, dass auch die Konzentration von divalenten Metallionen einen Einfluss auf den Umsatz der DNA-Substrate hatte.

Für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B wurde mit einer physiologischen Konzentration von 1 mM Mg^{2+} (zuzüglich der Mg^{2+} -Konzentration von ~0,5 mM durch das Substrat) bei der XO ein maximaler Substratumsatz erreicht, während mit steigender Konzentration eine zunehmende Inhibierung der Enzymaktivität zu beobachten war. Dies war

vor allem bei AtMUS81-EME1A mit einer Zunahme niedermolekularer DNA-Strukturen mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration verbunden. Im Gegensatz dazu wurde für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B mit der nXO ein zunehmender Substratumsatz mit steigender Mg^{2+} -Konzentration festgestellt mit einer maximalen Enzymaktivität bei 10 und 20 mM Mg^{2+} .

Eine mögliche Erklärung dieses Effektes könnte der Unterschied in der Konformation der HJ und nHJ bei verschiedenen Konzentrationen divalenter Metallionen sein. Divalente Metallionen begünstigen bei der sonst offen-planaren Konformation der HJ die paarweise Zusammenlagerung (Stapelung) der Duplexarme unter Ausbildung der so genannten „Stacked X“-Struktur (Übersicht in Lilley und White, 2001 und in Heyer *et al.*, 2003). Die „Stacked X“-Konformation der nHJ unterscheidet sich allerdings von jener der HJ, so dass die MUS81-Endonukleasekomplexe die nHJ bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen gut prozessieren können (Gaskell *et al.*, 2007).

Vermutlich bedingte die steigende Mg^{2+} -Konzentration eine Änderung der Konformation der XO-Struktur so, dass diese schlechter geschnitten werden konnte, was sich in einer Veränderung der entstandenen DNA-Produkte widerspiegelte.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der AtMUS81-EME1-Endonukleasekomplexe konnte beispielsweise bei der Prozessierung der HJ-Struktur – sowie beim 3'-Überhang-Substrat – eine optimale Enzymaktivität für SpMUS81-EME1 und ScMUS81-MMS4 bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen (zwischen 1 und 10 mM) erreicht werden (Fricke *et al.*, 2005; Gaskell *et al.*, 2007; Ehmsen und Heyer, 2008). Eine deutliche Hemmung der Aktivität war hingegen bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (zwischen 10 und 20 mM) zu verzeichnen. Möglicherweise können die MUS81-Endonukleasekomplexe nur die offen-planare Konformation der HJ binden. Im Gegensatz dazu befand sich das Optimum der Enzymaktivität für die nXO bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (zwischen 20-40 mM) (Gaskell *et al.*, 2007).

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Mg^{2+} -Konzentration die Oligomerisierung der Proteinkomplexe beeinflusst, so dass bei niedrigeren Konzentrationen die putative tetramere Komplexform begünstigt wird, welche die HJ prozessieren kann (Gaskell *et al.*, 2007).

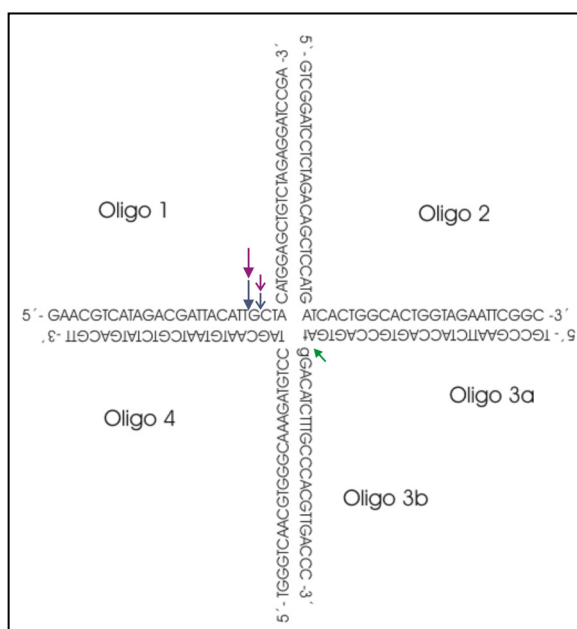
Übereinstimmend mit der bereits in Abschnitt 5.7 diskutierten Erhöhung des Substratumsatzes von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B beim 3'-Überhang in Anwesenheit von Mn^{2+} als Cofaktor konnte dieser Effekt ebenfalls bei der XO- und der nXO-Struktur beobachtet werden.

5.12 Bestimmung der Position der endonukleolytischen Schnitte bei den HJ-Strukturen

Nachdem Aktivität bei beiden Endonukleasekomplexen AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B mit der nHJ und HJ nachgewiesen werden konnte und die Assaybedingungen für beide Substrate optimiert und aufeinander abgestimmt wurden, wurde eine detaillierte vergleichende Analyse der Prozessierung der HJ-Strukturen vorgenommen. Dafür war es vorgesehen die Positionen der endonukleolytischen Schnitte beider Homologe genau zu bestimmen.

Übereinstimmend mit den Experimenten von Boddy *et al.* (2001) und Gaillard *et al.* (2003) mit endogenem SpMUS81-EME1- sowie Chen *et al.* (2001) mit endogenem HsMUS81-EME1-Komplex wurden in dieser Arbeit alle vier Duplex-Arme der XO- und nXO-Struktur mit der gleichen Oligonukleotidsequenz radioaktiv markiert und mit jeder Struktur die Enzymaktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B analysiert.

Für die nXO konnte die Position der endonukleolytischen Schnitte für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B im gegenüberliegenden DNA-Strang (erster Duplex-Arm) des Nicks (dritter Duplex-Arm) detektiert werden. Es konnte auch hier eine Präferenz für die Position von 4 Nucleotiden in 5'-Richtung vom freien 5'-Ende des Nicks bzw. des



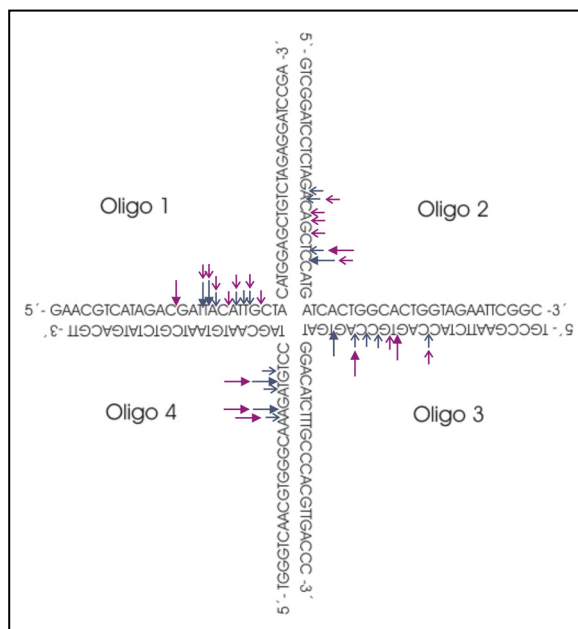
Überkreuzungspunktes der HJ entfernt für beide Homologe festgestellt werden (Abbildung 38). In den Duplex-Armen 2 und 4 wurde keine Restriktion detektiert, ebenso nicht in 3'-Richtung der jeweiligen DNA-Stränge. Ähnliches konnte für den rekombinanten ScMUS81-MMS4- bzw. für den rekombinanten (Osman *et al.*, 2003) und endogenen SpMUS81-EME1-Komplex (Gaillard *et al.*, 2003) mit der nXO beobachtet werden.

Abbildung 38: Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der nXO. Es sind die jeweiligen Positionen der endonukleolytischen Schnitte für AtMUS81-EME1A (blauer Pfeil) und AtMUS81-EME1B (lila Pfeil) (nach Abschnitt 4.10.5) in den Positionen 3 und 4 Nucleotide in 5'-Richtung vom Überkreuzungspunkt der HJ bzw. vom Nick entfernt im ersten Duplex-Arm dargestellt. Der grüne Pfeil markiert den Nick in der nHJ.

Hier waren die Schnittstellen zwischen 4 und 9 Nukleotiden bzw. zwischen 3 und 6 Nukleotiden (Osman *et al.*, 2003) und zwischen 2 und maximal 5 Nukleotiden in 5'-Richtung vom Überkreuzungspunkt der HJ entfernt im gegenüberliegenden Duplex-Arm positioniert. Auch in der letztgenannten Studie wurde keine Restriktion im zweiten und vierten Duplex-Arm beobachtet (Gaillard *et al.*, 2003). Dies bestätigt die Vermutung, dass ein freies 5'-Ende die Restriktion wenige Nukleotide entfernt in 5'-Richtung im gegenüberliegenden Duplexbereich bedingt (Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Bastin-Shanower *et al.*, 2003).

Für die XO konnten in allen vier Duplex-Armen Positionen der endonukleolytischen Schnitte zwischen 3 und 13 Nukleotiden in 5'-Richtung von der Überkreuzungsstelle der HJ entfernt für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B detektiert werden (Abbildung 39). Für AtMUS81-EME1A konnte auch hier – bei drei von vier Duplex-Armen – eine deutliche Präferenz für die Position von 4 Nukleotiden Entfernung vom Überkreuzungspunkt festgestellt werden, wie es schon für das 3'-Überhang-Substrat und die nXO gezeigt werden konnte. Dies war für AtMUS81-EME1B nicht der Fall, hier waren die Gewichtungen der Schnittstellen weniger definiert.

Da alle vier DNA-Stränge unterschiedliche Nukleotidsequenzen aufwiesen, war eine Sequenzabhängigkeit der Schnittpositionen auszuschließen.



Ähnliches konnte für den endogenen SpMUS81-EME1- (Boddy *et al.*, 2001) und den endogenen HsMUS81-EME1-Komplex (Chen *et al.*, 2001) mit identischen Oligonukleotidsequenzen gezeigt werden. Hier wurden die Positionen der endonukleolytischen Schnitte zwischen 2 und 7 Nukleotiden in 5'-Richtung vom Überkreuzungspunkt der HJ entfernt in allen vier Duplex-Armen nachgewiesen.

Abbildung 39: Positionen der endonukleolytischen Schnitte von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei der XO. Es sind die jeweiligen Positionen der endonukleolytischen Schnitte für AtMUS81-EME1A (blauer Pfeil) und AtMUS81-EME1B (lila Pfeil) (nach Abschnitt 4.10.5) in den entsprechenden Duplex-Armen dargestellt.

Übereinstimmend mit diesen Studien konnte auch für AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B keine Restriktion in 3'-Richtung der jeweiligen Duplex-Arme detektiert werden.

Das bedeutet, dass nur koordinierte Schnitte in gegenüberliegenden DNA-Strängen gleicher Polarität in der HJ gesetzt wurden, welche allerdings keine oder nur wenig Symmetrien aufwiesen. Abhängig von der Position (und Symmetrie) der endonukleolytischen Schnitte weisen die Prozessierungsprodukte Flaps (Überhänge) oder Gaps (Lücken) auf, welche *in vivo* vor ihrer Ligation durch Flap-Endonukleasen oder Fill-in-Reaktionen prozessiert werden müssen (Boddy *et al.*, 2001).

Eine Zusammenfassung der Analyse der HJ-Strukturen verdeutlicht, dass beide Homologe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B in der Lage sind die XO-HJ als Substrat zu erkennen und durch zwei aufeinander folgende Schnitte im Bereich des Überkreuzungspunktes aufzulösen. Dies bestätigt die Analyse der nXO, welche ausschließlich im gegenüberliegenden Duplex-Arm des Nicks und mit hoher Effizienz geschnitten wurde. Wurde der erste Schnitt in der HJ gesetzt, erfolgt der zweite immer unmittelbar danach im gegenüberliegenden DNA-Strang gleicher Polarität, um die Resolution der HJ zu gewährleisten. Dies erfolgt vermutlich nach folgendem Modell: nach dem ersten endonukleolytischen Schnitt gewinnt die Struktur (nHJ) an Flexibilität, so dass der zweite Schnitt durch eine optimale Positionierung der Struktur in das katalytische Zentrum von MUS81 erfolgen kann. Da immer beide Komplexpartner MUS81 und EME1 die DNA-Substrate binden, kann es dadurch zu einer leichten Verzerrung der DNA-Struktur kommen, so dass die Positionen der Schnitte um einige Nukleotide in 5'-Richtung entfernt von der gebundenen Überkreuzungsstelle liegen (Chang *et al.*, 2008).

Die AtMUS81-Endonukleasekomplexe weisen damit die für eine biologisch relevante Resolution der HJ benötigten Eigenschaften auf. Die minimalen Abweichungen in den Positionen ihrer endonukleolytischen Schnitte sind auf Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der beiden EME1-Homologe AtEME1A und AtEME1B zurückzuführen. Es wird vermutet, dass Unterschiede in den HhH-Domänen – wie sie auch in den EME1-Homologen vorkommen – die Substratspezifität der Proteinkomplexe bestimmen könnten (Übersicht in Ciccina *et al.*, 2008).

6. Ausblick

In dieser Arbeit konnten einige interessante Ergebnisse über die Funktionsweise der beiden homologen AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Endonukleasekomplexe an verschiedenen rekombinogenen DNA-Strukturen erhalten werden.

Im Hinblick auf eine erfolgreiche Prozessierung von HJ-Strukturen, wäre es von großem Interesse die Stöchiometrie der AtMUS81-EME1-Komplexe bezüglich der Oligomerisierung zu einem tetrameren Proteinkomplex aufzuklären. Dies könnte durch weitere Cross-Linking-Experimente mit anschließender PAGE (nativ und denaturierend) oder durch Gelfiltration analysiert werden.

Weiterhin wäre es sehr interessant die Endonukleaseaktivität beider Homologe anhand mehrerer, putativer DNA-Substrate zu testen. Im Hinblick auf eine Beteiligung der AtMUS81-Endonuklease bei der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten, wäre es sehr aufschlussreich die Aktivität von AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B bei verschiedenen D-Loop-Strukturen zu testen, welche in einem frühen Schritt der Rekombination entstehen. Zudem stellt sich die Frage, ob die durch Sensitivitätsstudien vermutete Beteiligung der AtMUS81-Endonuklease an der Reparatur und dem Neustart blockierter Replikationsgabeln, durch die Untersuchung von Replikationsgabel-, darunter „regressed-fork“-Strukturen bestätigt werden kann.

In diesem Zusammenhang könnte auch die Funktion der RUVA-Domäne in der AtMUS81-Untereinheit hinsichtlich einer „Branch-Migration“-Aktivität, beispielsweise durch eine Mutation der Domäne aufgeklärt werden.

Es wäre sehr interessant zu sehen, ob sich AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B synergistisch verhalten, also ob ihre Enzymaktivitäten bei verschiedenen DNA-Substraten durch die Anwesenheit beider Homologe beeinflusst werden.

Weiterhin könnte experimentell durch Ko-Lyse untersucht werden, ob sich putative tetramere Komplexe bilden, welche aus jeweils beiden Homologen AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B aufgebaut sind.

Außerdem sollten die interessanten Erkenntnisse von Zhang *et al.* (2005), dass HsBLM mit HsMUS81-EME1 interagiert und die endonukleolytische Aktivität bei bestimmten DNA-Substraten stimuliert, mit den MUS81-EME1-Endonukleasekomplexen und den RECQ-Helikasen von *Arabidopsis thaliana* untersucht werden, welche ebenfalls eine Rolle bei der Rekombination spielen. Es konnten 7 verschiedene RECQ-Helikasen in *A. thaliana*

identifiziert und bereits zwei Homologe, AtRECQ2 und AtRECQ3, biochemisch charakterisiert werden (Kobbe *et al.*, 2008).

Zwei dieser RECQ-Helikasen, nämlich AtRECQ4A und AtRECQ4B (Hartung *et al.*, 2000), weisen sogar 70 % Identität auf Proteinebene auf und gehen, wie AtEME1A und AtEME1B, aus einer Genduplikation – vermutlich während der Entwicklung der Brassicaceen – hervor. Trotz ihrer hohen Identität haben beide Homologe unterschiedliche biologische Funktionen, während bei AtEME1A und AtEME1B mit etwa 63 % Identität auf biochemischer Ebene keine vergleichbar drastischen Unterschiede beobachtet wurden. Da es sich bei AtRECQ4A und HsBLM vermutlich um funktionale Homologe handelt (Hartung *et al.*, 2007), wäre es besonders interessant eine mögliche Interaktion zwischen AtRECQ4A und den AtMUS81-EME1-Endonukleasekomplexen zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die MUS81-EME1-Endonukleasekomplexe von *Arabidopsis thaliana* biochemisch charakterisiert. Der MUS81-EME1-Komplex – ein Vertreter der XPF/MUS81-Familie von Nukleasen - ist in verschiedene DNA-Reparaturmechanismen involviert und gewährleistet den Erhalt der Genomstabilität. Defekte in einem dieser Reparaturmechanismen sind mit genomischer Instabilität und der Prädisposition für Krebs assoziiert.

Während in allen Eukaryoten Homologe des MUS81-EME1-Endonukleasekomplexes gefunden wurden, konnten in *Arabidopsis thaliana* sogar zwei EME1-Homologe, nämlich AtEME1A und AtEME1B, identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten *AtMUS81-EME1A* und *AtMUS81-EME1B* erfolgreich in einen Ko-Expressionsvektor kloniert und funktionell in *E. coli* überexprimiert werden. Zudem wurde eine nicht-funktionelle Proteinform von AtMUS81 durch gezielt eingeführte Punktmutationen im ORF (Austausch der beiden Aminosäuren Aspartat durch Alanin im katalytischen Zentrum) konstruiert, welche als Qualitätskontrolle der Aufreinigung diente. Es wurde die Aufreinigung der Proteinkomplexe über Strep-Tactin-Chromatographie und anschließender Cu²⁺-IMAC optimiert. Die Qualität der Aufreinigung – funktionelle Zielproteinkomplexe ohne enzymatische Kontamination – konnte durch AtMUS81(D470-471A)-EME1A und AtMUS81(D470-471A)-EME1B bestätigt werden.

Beide Homologe AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B sind endonukleolytisch aktiv. Die Enzymaktivität wird durch Mg²⁺, Mn²⁺ und Ca²⁺ gefördert, jedoch nicht durch Ni²⁺ und Zn²⁺. Zudem konnte eine Sensitivität gegenüber Salzen (NaCl, KCl) und anderen gelösten Stoffen (Imidazol) festgestellt werden.

Sowohl AtMUS81-EME1A als auch AtMUS81-EME1B können ein 3'-Überhang-Substrat schneiden, allerdings mit einer deutlich höheren spezifischen Aktivität von AtMUS81-EME1B.

Eine besondere Bedeutung kommt der Prozessierung der intakten HJ-Struktur (XO) zu. In dieser Arbeit konnte für beide rekombinant in *E. coli* exprimierte AtMUS81-EME1A- und AtMUS81-EME1B-Endonukleasekomplexe die Prozessierung der intakten HJ nachgewiesen werden. Dies wurde bislang überhaupt nur – mit einer Ausnahme – bei endogenen Proteinextrakten der Hefen und des Menschen beobachtet. Die nHJ stellt ebenfalls ein gutes Substrat für beide Homologe dar.

Der Mechanismus der Prozessierung durch AtMUS81-EME1A und AtMUS81-EME1B entspricht einem „Nick-counternick“-Mechanismus, wie er für HJ-Resolvasen typisch ist.

Dem ersten Schnitt in der HJ folgt immer unmittelbar ein zweiter, was zur Auflösung der HJ-Struktur in genickte Duplexe führt. Dabei liegen die Positionen ihrer endonukleolytischen Schnitte für beide Homologe im Bereich des Überkreuzungspunktes der HJ, jeweils in 5'-Richtung gegenüberliegender DNA-Stränge gleicher Polarität.

Es konnte somit in dieser Arbeit erstmals für Pflanzen gezeigt werden, dass in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zwei funktionelle Homologe von EME1, nämlich AtEME1A und AtEME1B zusammen mit dem Interaktionspartner AtMUS81 *in vitro* zwei enzymatisch aktive Endonukleasekomplexe bilden. Die erzielten Ergebnisse zeigen eine Beteiligung der AtMUS81-EME1-Endonukleasekomplexe an Rekombinations- und Reparaturprozessen.

8. Summary

In this work, the MUS81-EME1 endonuclease complexes from *Arabidopsis thaliana* were characterized biochemically. The MUS81-EME1 complex – a member of the XPF/MUS81 family of nucleases – is involved in different DNA-repair mechanisms and preserves genome stability. Defects in one of these repair mechanisms are associated with genomic instability and predisposition to cancer .

Whereas homologues of the MUS81-EME1 endonuclease complex could be found in all eukaryotes, even two EME1-homologues, namely AtEME1A and AtEME1B were identified in *A. thaliana*.

Within this work, AtMUS81-EME1A and AtMUS81-EME1B were cloned successfully in a coexpression vector and could be expressed functionally in *E.coli*. In addition, a non-functional protein form of AtMUS81 was constructed by introducing a directed pointmutation in the AtMUS81-ORF (substitution of aminoacids aspartate to alanine in the catalytic centre) that served as a quality control for purification. The purification of the protein complexes via Strep-Tactin chromatography and subsequent Cu²⁺-IMAC was optimized. The quality of purification –indicated by functional protein complexes of interest without enzymatic contamination – could be approved by AtMUS81(D470-471A)-EME1A and AtMUS81(D470-471A)-EME1B.

Both homologues AtMUS81-EME1A and AtMUS81-EME1B display endonucleolytic activity.

Enzymatic activity is supported by Mg²⁺, Mn²⁺ and Ca²⁺ but not by Ni²⁺ and Zn²⁺. Furthermore, a sensitivity against salts (NaCl, KCl) and other solutes (imidazole) could be detected.

Both, AtMUS81-EME1A and AtMUS81-EME1B, can cleave a 3'-flap substrate, however with higher specific activity detected for AtMUS81-EME1B.

Of particular importance is the processing of the intact HJ-structure. In this work, for both recombinant AtMUS81-EME1A and AtMUS81-EME1B endonuclease complexes expressed in *E. coli*, processing of the intact HJ (XO) could be demonstrated. This has been observed at all – with one exception – with endogenous protein extracts from yeasts and human. The nHJ (nXO) also displays a good substrate for both homologues.

The mechanism of processing by AtMUS81-EME1A and AtMUS81-EME1B corresponds to a nick-counternick mechanism, characteristic for HJ-resolvases. The first cut is immediately followed by a second one, leading to the resolution of the HJ-structure to nicked duplexes. Thereby, the endonucleolytic cleavage sites for both homologues are located within the region of the HJ-junction branch point in 5' direction on opposing strands of like polarity.

Finally, in this work, it could be shown for the first time for plants, that in *A. thaliana*, two functional homologues of EME1, namely AtEME1A and AtEME1B, form two enzymatically active endonuclease complexes with the interaction partner AtMUS81. The results indicate an involvement of both AtMUS81-EME1 endonuclease complexes in recombination and repair processes.

9. Referenzen

- Abraham, J., Lemmers, B., Hande, M. P., Moynahan, M. E., Chahwan, C., Ciccina, A., Essers, J., Hanada, K., Chahwan, R., Khaw, A. K., McPherson, P., Shehabeldin, A., Laister, R., Arrowsmith, C., Kanaar, R., West, S. C., Jasin, M. und Hakem, R. (2003). "Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells." *Embo J* **22**(22): 6137-47.
- Aravind, L., Walker, D. R. und Koonin, E. V. (1999). "Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems." *Nucleic Acids Res* **27**: 1223-1242.
- Aravind, L., Makarova, K. S. und Koonin, E. V. (2000). "SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories." *Nucleic Acids Res* **28**(18): 3417-32.
- Argueso, J. L., Wanat, J., Gemici, Z. und Alani, E. (2004). "Competing Crossover Pathways Act During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **168**(4): 1805-16.
- Bastin-Shanower, S. A., Fricke, W. M., Mullen, J. R. und Brill, S. J. (2003). "The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10." *Mol Cell Biol* **23**(10): 3487-96.
- Berchowitz, L. E., Francis, K. E., Bey, A. L. und Copenhaver, G. P. (2007). "The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*." *PLoS Genet* **3**(8): e132.
- Blais, V., Gao, H., Elwell, C. A., Boddy, M. N., Gaillard, P. H., Russell, P. und McGowan, C. H. (2004). "RNA interference inhibition of Mus81 reduces mitotic recombination in human cells." *Mol Biol Cell* **15**(2): 552-62.
- 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.
- Boddy, M. N., Gaillard, P. H., McDonald, W. H., Shanahan, P., Yates, J. R., 3rd und Russell, P. (2001). "Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase." *Cell* **107**(4): 537-48.
- Britt, A. B. (1999). "Molecular genetics of DNA repair in higher plants." *Trends Plant Sci* **4**(1): 20-25.
- Buchanan, B. B., Gruissen, W., Jones, R. L. (2000). "Biochemistry and molecular biology of plants." *American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland*.
- Chang, J. H., Kim, J. J., Choi, J. M., Lee, J. H. und Cho, Y. (2008). "Crystal structure of the Mus81-Eme1 complex." *Genes Dev* **22**(8): 1093-106.
- Chen, X. B., Melchionna, R., Denis, C. M., Gaillard, P. H., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M. N., Russell, P., Vialard, J. und McGowan, C. H. (2001). "Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro." *Mol Cell* **8**(5): 1117-27.
- Choi, Y. J., Ryu, K. S., Ko, Y. M., Chae, Y. K., Pelton, J. G., Wemmer, D. E. und Choi, B. S. (2005). "Biophysical characterization of the interaction domains and mapping of the contact residues in the XPF-ERCC1 complex." *J Biol Chem* **280**(31): 28644-52.
- Ciccina, A., Constantinou, A. und West, S. C. (2003). "Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease." *J Biol Chem* **278**(27): 25172-8.
- Ciccina, A., McDonald, N. und West, S. C. (2008). "Structural and Functional Relationships of the XPF/MUS81 Family of Proteins." *Annu Rev Biochem* **77**: 259-287.
- Constantinou, A., Chen, X. B., McGowan, C. H. und West, S. C. (2002). "Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities." *Embo J* **21**(20): 5577-85.

- Cowan, J. A. (1998). "Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry." Chem Rev **98**(3): 1067-1088.
- de Boer, J. und Hoeijmakers, J. H. (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes." Carcinogenesis **21**(3): 453-60.
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Jaspers, N. G. und Hoeijmakers, J. H. (1998). "DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity." J Biol Chem **273**(14): 7835-42.
- de los Santos, T., Loidl, J., Larkin, B. und Hollingsworth, N. M. (2001). "A role for MMS4 in the processing of recombination intermediates during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **159**(4): 1511-25.
- de los Santos, T., Hunter, N., Lee, C., Larkin, B., Loidl, J. und Hollingsworth, N. M. (2003). "The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast." Genetics **164**(1): 81-94.
- Dendouga, N., Gao, H., Moechars, D., Janicot, M., Vialard, J. und McGowan, C. H. (2005). "Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis." Mol Cell Biol **25**(17): 7569-79.
- Doe, C. L., Dixon, J., Osman, F. und Whitby, M. C. (2000). "Partial suppression of the fission yeast *rqh1(-)* phenotype by expression of a bacterial Holliday junction resolvase." Embo J **19**(11): 2751-62.
- Doe, C. L., Ahn, J. S., Dixon, J. und Whitby, M. C. (2002). "Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks." J Biol Chem **277**(36): 32753-9.
- Doe, C. L., Osman, F., Dixon, J. und Whitby, M. C. (2004). "DNA repair by a Rad22-Mus81-dependent pathway that is independent of Rhp51." Nucleic Acids Res **32**(18): 5570-81.
- Doherty, A. J., Serpell, L. C. und Ponting, C. P. (1996). "The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA." Nucleic Acids Res **24**(13): 2488-97.
- Dubest, S., Gallego, M. E. und White, C. I. (2002). "Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants." EMBO Rep **3**(11): 1049-54.
- Dürr, Jasmin. (2004). "Expression und Nachweis der Endonukleaseaktivität der Mus81-Eme1 und Mus81-Eme2 Komplexe von *A. thaliana*." BotanikII, Universität Karlsruhe (TH).
- Ehmsen, K. T. und Heyer, W. D. (2008). "*Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease." Nucleic Acids Res.
- Enzlin, J. H. und Scharer, O. D. (2002). "The active site of the DNA repair endonuclease XPF-ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif." Embo J **21**(8): 2045-53.
- Fabre, F., Chan, A., Heyer, W. D. und Gangloff, S. (2002). "Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16887-92.
- Fricke, W. M., Bastin-Shanower, S. A. und Brill, S. J. (2005). "Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease." DNA Repair (Amst) **4**(2): 243-51.
- Froget, B., Blaisonneau, J., Lambert, S. und Baldacci, G. (2008). "Cleavage of stalled forks by fission yeast *mus81/eme1* in absence of DNA replication checkpoint." Mol Biol Cell **19**(2): 445-56.
- Fu, Y. und Xiao, W. (2003). "Functional domains required for the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease complex formation and nuclear localization." DNA Repair (Amst) **2**(12): 1435-47.

- Gaillard, P. H., Noguchi, E., Shanahan, P. und Russell, P. (2003). "The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism." Mol Cell **12**(3): 747-59.
- Gao, H., Chen, X. B. und McGowan, C. H. (2003). "Mus81 endonuclease localizes to nucleoli and to regions of DNA damage in human S-phase cells." Mol Biol Cell **14**(12): 4826-34.
- Gaskell, L. J., Osman, F., Gilbert, R. J. und Whitby, M. C. (2007). "Mus81 cleavage of Holliday junctions: a failsafe for processing meiotic recombination intermediates?" Embo J **26**(7): 1891-901.
- Geuting, Verena. (2005). "Klonierung, Expression, Aufreinigung und Aktivitätsmessung Mus81-Eme1A und Mus81-Eme1B Komplexe von *A. thaliana*." BotanikII, Universität Karlsruhe (TH).
- Giraud-Panis, M. J. und Lilley, D. M. (1998). "Structural recognition and distortion by the DNA junction-resolving enzyme RusA." J Mol Biol **278**(1): 117-33.
- Haber, J. E. und Heyer, W. D. (2001). "The fuss about Mus81." Cell **107**(5): 551-4.
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J. und Kanaar, R. (2006). "The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks." Embo J **25**(20): 4921-32.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S. L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H. B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I. D. und Kanaar, R. (2007). "The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 1096-1104.
- Hartung, F., Plchova, H. und Puchta, H. (2000). "Molecular characterization of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res **28**(21): 4275-82.
- Hartung, F. und Puchta, H. (2001). "Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants." Gene **271**(1): 81-6.
- 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.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. und Solinger, J. A. (2003). "Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight?" Trends Biochem Sci **28**(10): 548-57.
- Higgins, J. D., Buckling, E. F., Franklin, F. C. und Jones, G. H. (2008). "Expression and functional analysis of AtMUS81 in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over." Plant J **54**(1): 152-62.
- Hiyama, T., Katsura, M., Yoshihara, T., Ishida, M., Kinomura, A., Tonda, T., Asahara, T. und Miyagawa, K. (2006). "Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G2/M checkpoints and promotes rereplication in human cells." Nucleic Acids Res **34**(3): 880-92.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "DNA repair mechanisms." Maturitas **38**(1): 17-22; discussion 22-3.
- Hollingsworth, N. M. und Brill, S. J. (2004). "The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions." Genes Dev **18**(2): 117-25.
- Ii, M. und Brill, S. J. (2005). "Roles of SGS1, MUS81, and RAD51 in the repair of lagging-strand replication defects in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **48**(4): 213-25.
- Interthal, H. und Heyer, W. D. (2000). "MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **263**(5): 812-27.
- Johnson-Schlitz, D. und Engels, W. R. (2006). "Template disruptions and failure of double Holliday junction dissolution during double-strand break repair in *Drosophila* BLM mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 16840-5.

- Kai, M., Boddy, M. N., Russell, P. und Wang, T. S. (2005). "Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress." Genes Dev **19**(8): 919-32.
- Kaliraman, V., Mullen, J. R., Fricke, W. M., Bastin-Shanower, S. A. und Brill, S. J. (2001). "Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease." Genes Dev **15**(20): 2730-40.
- Kobbe, D., Blanck, S., Demand, K., Focke, M. und Puchta, H. (2008). "AtRECQ2, a RecQ-helicase homologue from Arabidopsis thaliana, is able to disrupt different recombinogenic DNA-structures in vitro." Plant J.
- Lilley, D. M. und White, M. F. (2001). "The junction-resolving enzymes." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(6): 433-43.
- Liu, R., Qiu, J., Finger, L. D., Zheng, L. und Shen, B. (2006). "The DNA-protein interaction modes of FEN-1 with gap substrates and their implication in preventing duplication mutations." Nucleic Acids Res **34**(6): 1772-84.
- Liu, Y. und West, S. C. (2004). "Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 937-44.
- McPherson, J. P., Lemmers, B., Chahwan, R., Pamidi, A., Migon, E., Matysiak-Zablocki, E., Moynahan, M. E., Essers, J., Hanada, K., Poonepalli, A., Sanchez-Sweetman, O., Khokha, R., Kanaar, R., Jasin, M., Hande, M. P. und Hakem, R. (2004). "Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression." Science **304**(5678): 1822-6.
- Mimida, N., Kitamoto, H., Osakabe, K., Nakashima, M., Ito, Y., Heyer, W. D., Toki, S. und Ichikawa, H. (2007). "Two Alternatively Spliced Transcripts Generated from OsMUS81, a Rice Homologue of Yeast MUS81, Are Upregulated by DNA-Damaging Treatments." Plant Cell Physiol.
- 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.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R. und Gloor, G. B. (1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair." Mol Cell Biol **14**(3): 1613-25.
- 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.
- Newman, M., Murray-Rust, J., Lally, J., Rudolf, J., Fadden, A., Knowles, P. P., White, M. F. und McDonald, N. Q. (2005). "Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition." Embo J **24**(5): 895-905.
- Nishino, T. und Morikawa, K. (2002). "Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors." Oncogene **21**(58): 9022-32.
- Nishino, T., Komori, K., Ishino, Y. und Morikawa, K. (2005). "Structural and functional analyses of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 nuclease: asymmetric DNA binding and cleavage mechanisms." Structure **13**(8): 1183-92.
- Nishino, T., Ishino, Y. und Morikawa, K. (2006). "Structure-specific DNA nucleases: structural basis for 3D-scissors." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 60-7.
- Nomura, Y., Adachi, N. und Koyama, H. (2007). "Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication." Genes Cells **12**(10): 1111-22.
- Odagiri, N., Seki, M., Onoda, F., Yoshimura, A., Watanabe, S. und Enomoto, T. (2003). "Budding yeast mms4 is epistatic with rad52 and the function of Mms4 can be replaced by a bacterial Holliday junction resolvase." DNA Repair (Amst) **2**(3): 347-58.

- Ogrunc, M. und Sancar, A. (2003). "Identification and characterization of human MUS81-MMS4 structure-specific endonuclease." *J Biol Chem* **278**(24): 21715-20.
- Oh, S. D., Lao, J. P., Taylor, A. F., Smith, G. R. und Hunter, N. (2008). "RecQ helicase, Sgs1, and XPF family endonuclease, Mus81-Mms4, resolve aberrant joint molecules during meiotic recombination." *Mol Cell* **31**(3): 324-36.
- Osman, F., Dixon, J., Doe, C. L. und Whitby, M. C. (2003). "Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis." *Mol Cell* **12**(3): 761-74.
- Osman, F. und Whitby, M. C. (2007). "Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks." *DNA Repair (Amst)*.
- Pamidi, A., Cardoso, R., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Poonepalli, A., Tamblyn, L., Perez-Ordóñez, B., Hande, M. P., Sanchez, O. und Hakem, R. (2007). "Functional interplay of p53 and Mus81 in DNA damage responses and cancer." *Cancer Res* **67**(18): 8527-35.
- Paques, F. und Haber, J. E. (1999). "Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 349-404.
- Puchta, H. (1999). "Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells." *Genetics* **152**(3): 1173-81.
- Puchta, H. (2005). "The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution." *J Exp Bot* **56**(409): 1-14.
- Roberts, J. A. und White, M. F. (2005). "DNA end-directed and processive nuclease activities of the archaeal XPF enzyme." *Nucleic Acids Res* **33**(20): 6662-70.
- Roberts, J. A. und White, M. F. (2005). "An archaeal endonuclease displays key properties of both eukaryal XPF-ERCC1 and Mus81." *J Biol Chem* **280**(7): 5924-8.
- Roseaulin, L., Yamada, Y., Tsutsui, Y., Russell, P., Iwasaki, H. und Arcangioli, B. (2008). "Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks." *Embo J*.
- Schmidt, T. G. und Skerra, A. (2007). "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." *Nat Protoc* **2**(6): 1528-35.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S. D. und Michel, B. (1998). "RuvAB acts at arrested replication forks." *Cell* **95**(3): 419-30.
- Sekelsky, J. J., McKim, K. S., Chin, G. M. und Hawley, R. S. (1995). "The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei-9* encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad1." *Genetics* **141**(2): 619-27.
- Shen, B., Singh, P., Liu, R., Qiu, J., Zheng, L., Finger, L. D. und Alas, S. (2005). "Multiple but dissectible functions of FEN-1 nucleases in nucleic acid processing, genome stability and diseases." *Bioessays* **27**(7): 717-29.
- Smith, G. R., Boddy, M. N., Shanahan, P. und Russell, P. (2003). "Fission yeast Mus81.Eme1 Holliday junction resolvase is required for meiotic crossing over but not for gene conversion." *Genetics* **165**(4): 2289-93.
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. und Stahl, F. W. (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." *Cell* **33**(1): 25-35.
- Taylor, E. R. und McGowan, C. H. (2008). "Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3757-62.
- 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., Singh, M.B., Misra, M. K., Bhalla, P. L., Tuteja, R. (2001). "Molecular mechanisms of DNA-damage and repair: progress in plants." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **36**: 337-397.

- Whitby, M. C. und Dixon, J. (1998). "Substrate specificity of the SpCCE1 holliday junction resolvase of *Schizosaccharomyces pombe*." J Biol Chem **273**(52): 35063-73.
- Whitby, M. C., Osman, F. und Dixon, J. (2003). "Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4." J Biol Chem **278**(9): 6928-35.
- Whitby, M. C. (2005). "Making crossovers during meiosis." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1451-5.
- White, M. F. und Lilley, D. M. (1997). "Characterization of a Holliday junction-resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Cell Biol **17**(11): 6465-71.
- Wu, F., Liu, S. Y., Tao, Y. M., Ou, D. P., Fang, F. und Yang, L. Y. (2008). "Decreased expression of methyl methanesulfonate and ultraviolet-sensitive gene clone 81 (Mus81) is correlated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma." Cancer **112**(9): 2002-2010.
- Yip, T. T., Nakagawa, Y. und Porath, J. (1989). "Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography." Anal Biochem **183**(1): 159-71.
- 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 Oktober 2005 bis Oktober 2008 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

Verena Geuting

Lebenslauf

Verena Friederike Geuting

geboren am 23.12.1979 in Hamburg (Nationalität: deutsch)

- 1986-1990 Grundschule Leonberg Höfingen, Grundschule Pfinztal Berghausen
- 1990-1991 Geschwister-Scholl-Realschule Bildungszentrum Pfinztal Berghausen
- 1991-1999 Abitur am Ludwig-Marum-Gymnasium Bildungszentrum Pfinztal Berghausen
- 1999-2005 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Karlsruhe (TH)
2002-2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Botanischen Institut II, Betreuung
des pflanzenphysiologischen Großpraktikums (Enzymkinetik)
- 2005 Diplomarbeit am Botanischen Institut II
„Klonierung, Expression, Aufreinigung und Aktivitätsmessung der MUS81-
EME1A- und MUS81-EME1B-Komplexe von *Arabidopsis thaliana*“ unter
Prof. Dr. Holger Puchta
September 2005 Abschluss des Studiums mit Diplom
- seit 2005 Doktorandin am Botanischen Institut II der Universität Karlsruhe (TH),
Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen,
unter Prof. Dr. Holger Puchta