
Biochemische Charakterisierung zweier funktioneller Holliday Junction Resolvasen aus *Arabidopsis thaliana*: AtGEN1 und AtSEND1

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologe Markus Bauknecht

aus

Friedrichshafen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Korreferent: PD Dr. Dietmar Gradl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Holger Puchta für die Möglichkeit, nach meiner Diplomarbeit an seinem Lehrstuhl bleiben und für meine Promotion eine herausfordernde Thematik bearbeiten zu dürfen, welche in ihren experimentellen Ansprüchen meinen Interessen entgegen kam. Auch danke ich ihm, dass er mir immer wieder Zeit und Mittel einräumte, wenn sich das Projekt auf verschlungeneren Wegen zum Ziel bewegte als anfangs erwartet. Zu guter Letzt danke ich ihm für die im Rahmen meiner Promotion gewonnenen Einsichten in die Realität der Wissenschaft und die daraus gewonnene Erfahrung, welche für meinen weiteren beruflichen Werdegang sehr hilfreich sein wird.

Bei Herrn PD Dr. Dietmar Gradl bedanke ich mich für sein Interesse und seine sofortige Bereitschaft als Korreferent meiner Dissertation zu fungieren, sowie die gute und lehrreiche Zeit im Projektpraktikum bei ihm.

Meiner Betreuerin, Frau Dr. Daniela Kobbe kann ich nicht genug danken für alles, was sie für mich getan hat. Liebe Daniela, du bist schon lange nicht mehr nur die Betreuerin während meiner Diplom- und Doktorarbeit, sondern auch eine Freundin. Was du zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hast, ist mehr als die experimentelle Unterstützung und die unzähligen, mehrstündigen Diskussionen, aus denen sich, durch deinen anderen Blickwinkel auf die vorhandenen Daten, immer wieder neue Zusammenhänge und Möglichkeiten ergeben haben. In diesen Diskussionen habe ich wahrhaftig gelernt, dass Wissenschaft Diskussion bedeutet und wie daraus neue Ideen entstehen. Darüber hinaus aber warst du mir eine unglaubliche Stütze ohne die ich mehr als einmal aufgegeben hätte. Immer wieder hast du durch deine positiven Impulse neue Möglichkeiten eröffnet und warst ein beständiger Gegenpol zu meinem Pessimismus. Du hast dir meine aus Frustration geborenen Tiraden zu allem Möglichen angehört und es dann geschafft, mir das Positive in Allem bewusst zu machen. Tausend mal „Danke!“ sind nicht genug.

Bei Herrn AOR Dr. Manfred Focke bedanke ich mich nicht nur für das kritische Lesen dieses Manuskripts (die DNA-Duplicates lassen grüßen), sondern auch für die vielen kleinen und großen Ratschläge und die Möglichkeit, jeden erdenklichen Aspekt des Projekts mit ihm zu diskutieren. Darüber hinaus danke ich dir, Manfred, für die vielen Gespräche über buchstäblich Gott und die Welt und das daraus entstandene freundschaftliche Verhältnis, was für mein Wohlbefinden am Institut so wichtig war.

Frau Dr. Katharina Seeliger danke ich besonders, sowohl für die Möglichkeit zu fachlichen Diskussionen als auch Gesprächen als Freundin. Auch sage ich Danke für das Korrekturlesen meines Manuskripts und die Motivationsmails. Katha, deine Lebensfreude und -energie, dein Wissen, dein Einsatz für die Allgemeinheit und dein ganzes Wesen haben mich immer wieder beeindruckt und du warst ebenso wie Daniela ein Vorbild für mich.

Daniela, Manfred, Katha, ihr wart und seid für mich das Herz und die Seele der Biochemie.

Auch bei allen anderen Biochemikern, aktuellen und ehemaligen, die durch die gemeinschaftliche Arbeitsweise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich herzlich. Die gegenseitige Bereitschaft, über die verschiedenen Projekte zu diskutieren, Erfahrungen auszutauschen, die vielen (schlechten) Witze oder das Ertragen der selbigen und andere Kleinigkeiten sind Erinnerungen, die ich nicht missen möchte. Spätestens der Umzug ins FZU hat mir gezeigt, dass wir ein tolles Team waren und sind.

Den Auszubildenden der Biochemie der letzten Jahre möchte ich noch ein gesondertes Wort des Dankes zukommen lassen. Ich weiß, auch wenn ich immer wieder mal herumgemeckert habe, wie viel Arbeit ihr uns Doktoranden abnehmt und wie sehr wir durch eure Unterstützung im Laboralltag profitieren.

Bei den übrigen Mitgliedern der Botanik II bedanke ich mich für das überwiegend gute Verhältnis und die erfreuten Gesichter, wenn man sich nach der Trennung auf FZU und WHS irgendwo über den Weg lief. Oli, Alex, Frieder und Simon, jetzt liegt es an euch, das Witzniveau flach zu halten.

Herrn Michael Meier danke ich für die schnelle Hilfe bei zahlreichen Computerproblemen zu fast jeder Tages- und Nachtzeit und die entspannenden Fachsimpeleien zu unserem gemeinsamen Hobby. Man sieht sich online, Micha.

Bei Herrn M.Sc. Dominik Graf bedanke ich mich für die Experimente während seiner Bachelorarbeit, deren Ergebnisse zum Teil in diese Arbeit eingeflossen sind.

Meinen drei besten Freunden, Moritz Kaufmann, Joachim Wehrstein und Manuela Mitterer, möchte ich dafür danken, dass sie eben diese geblieben sind, obwohl der Kontakt streckenweise sehr selten war und kaum von mir ausging. Danke, dass ihr in unsere Freundschaften so viel investiert habt und mir zu jeder Zeit trotz schlechter Laune ein offenes Ohr geliehen habt und gute Gesellschaft bei Feuer und Fleisch oder am Telefon wart.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meiner Mutter Gisela Bauknecht und meiner Schwester Anja Bauknecht, aber auch bei meinen Großeltern Christine und Richard Kirchner (Ich hoffe du schaust von oben zu, Opa) und meinem Onkel Alfred Kirchner bedanken. Insbesondere dafür, dass sie mich so nehmen wie ich mit meinen vielen Ecken und Kanten bin. Gerade die letzten eineinhalb Jahre habe ich gelernt, was es wert ist solchen bedingungslosen, unerschütterlichen Rückhalt zu haben, einfach weil man Familie ist. Obwohl ich gefühlt kaum etwas für euch getan habe, wart ihr immer da, wenn ich in irgendeiner Art Hilfe brauchte und ihr habt mir geholfen aufzustehen, wenn ich am Boden lag. Ohne euch gäbe es mich nicht und ohne euch hätte ich die letzten eineinhalb harten Jahre nicht geschafft. Danke euch... vor allem dir, Mama!

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 HOLLIDAY JUNCTIONS IM KONTEXT DER DNA-REPARATUR	2
1.2 DIE HOLLIDAY JUNCTION: EINE DREIDIMENSIONALE DYNAMISCHE STRUKTUR	9
1.3 BEKANNTE HJ-RESOLVASEN	12
1.3.1 Die HJ-Resolvasen der Prokaryoten und Phagen	13
1.3.2 Eukaryotische HJ-Resolvasen	21
1.3.3 Die HJ-Resolvasen der Pflanzen	31
1.4 ZIELE DER ARBEIT	32
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>33</u>
2.1 MATERIAL	33
2.1.1 <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	33
2.1.2 Oligonukleotide	34
2.1.3 Ausgewählte Chemikalien	38
2.1.4 Marker, Enzyme, Kits	38
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	39
2.1.6 Verbrauchsmaterial	42
2.1.7 Ausgewählte Geräte und Software	42
2.2 METHODEN	43
2.2.1 Bestimmung der Genstrukturen und Klonierung	43
2.2.2 Herstellung der rekombinanten Proteine für die Charakterisierung	46
2.2.3 Endonuklease-Assays	50
<u>3. ERGEBNISSE</u>	<u>61</u>
3.1 BIOINFORMATISCHE ANALYSEN DER PFLANZLICHEN HJ-RESOLVASEN	61
3.1.1 Zwei Homologe der HJ-Resolvasen in höheren Pflanzen	61
3.1.2 Verifizierung der cDNA-Sequenzen von AtGEN1 und AtSEND1	63
3.1.3 Die <i>Chromo domain-like</i> -Variante ist in beiden Orthologen konserviert	64
3.2 KLONIERTE KONSTRUKTE, EXPRESSION, AUFRÄUENIGUNG	66

3.2.1	Aktivitätsnachweise und Negativkontrollen	67
3.3	SUBSTRATSPEZIFITÄT VON ATGEN1 UND ATSEND1	68
3.4	EINFACH VERZWEIGTE JUNCTIONS: 5'- UND 3'-FLAP	71
3.5	ZWEIFACH VERZWEIGTE JUNCTIONS: X26-RFs	72
3.6	ATGEN1 UND ATSEND1 AN GENICKTEN HOLLIDAY JUNCTIONS	75
3.6.1	Die nX-30: eine nHJ mit zentralem Nick.....	75
3.6.2	Die nX-32: eine zweite migrierbare nHJ.....	79
3.6.3	Auflösung genickter HJs über ein RF-Intermediat.....	83
3.7	DIE STATISCHE X0-HJ: BESTIMMUNG DER SCHNITTPOSITION	84
3.8	ATGEN1 UND ATSEND1 SIND HJ-RESOLVASEN.....	86
3.8.1	Schnittmuster mit nahezu perfekter Symmetrie	87
3.8.2	Religierbare Produkte	90
4.	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>92</u>
4.1	BIOINFORMATISCHE ANALYSEN DER PFLANZLICHEN HJ-RESOLVASEN	92
4.1.1	Zwei Homologe potentieller HJ-Resolvasen in Pflanzen.....	92
4.1.2	<i>chromo-like</i> Domäne	93
4.2	KLONIERTE KONSTRUKTE, EXPRESSION, AUFREINIGUNG	94
4.2.1	Konservierte AS.....	95
4.3	SUBSTRATSPEZIFITÄT.....	97
4.4	DIE NICHT-RESOLVASEAKTIVITÄT: REF-I	98
4.4.1	Eine mögliche Rolle für die Ref-I-Aktivität <i>in vivo</i> ?.....	99
4.5	ATGEN1 UND ATSEND1: ZWEI FUNKTIONELLE HJ-RESOLVASEN	101
4.6	GEMEINSAMKEITEN UND UNTERSCHIEDE	109
5.	<u>AUSBLICK</u>	<u>111</u>
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>112</u>
7.	<u>SUMMARY.....</u>	<u>114</u>
8.	<u>REFERENZEN.....</u>	<u>116</u>
9.	<u>ANHANG</u>	<u>125</u>
PUBLIKATIONEN.....		i
ERKLÄRUNG.....		ii

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Reparatur von Doppelstrangbrüchen.....	4
Abbildung 1.2:	Reparatur und Schadenstoleranz an Replikationsgabeln.....	7
Abbildung 1.3:	Offen planare und stacked X-Konformation der HJs.....	10
Abbildung 1.4:	Konformationsvergleich von intakter und genickter HJ.....	11
Abbildung 1.5:	Entdeckungsgeschichte der HJ-Resolvasen.....	13
Abbildung 1.6:	Substrate für die Charakterisierung der HJ-Resolvasen.....	14
Abbildung 1.7:	Die Rad2/XPG-Nukleasefamilie.....	25
Abbildung 2.1:	Übersicht und Aufbau der verwendeten rekombinanten Proteine.....	45
Abbildung 2.2:	Aufbau des Semi-Dry-Western Blot-Stapels.....	49
Abbildung 2.3:	Prinzip von nativer gegenüber denaturierender PAGE – mögliche Aussagen.....	59
Abbildung 3.1:	Bioinformatische Analysen zur Sequenzhomologie.....	62
Abbildung 3.2:	Bestimmung der ORF-Grenzen.....	63
Abbildung 3.3:	Die <i>Chromo domain-like</i> -Variante (CDLV).....	64
Abbildung 3.4:	Die <i>Chromo domain-like</i> -Variante der Klasse 4 (Resolvasen).....	65
Abbildung 3.5:	Aufgereinigte rekombinante Proteine.....	66
Abbildung 3.6:	Aktivitätsnachweis von AtGEN1 und AtSEND1 an der pmHJ.....	68
Abbildung 3.7:	Genickte Duplices (nD) sind keine Substrate für AtGEN1 und AtSEND1.....	69
Abbildung 3.8:	Umsatz verschiedener verzweigter DNA-Strukturen über Zeit.....	70
Abbildung 3.9:	Aktivität an 5'- und 3'-Flap-Substraten.....	72
Abbildung 3.10:	Schnittmusterbestimmung an X26-RFs, Sequenziergel.....	73
Abbildung 3.11:	Schnittmusterbestimmung an X26-RFs, Quantifizierung.....	74
Abbildung 3.12:	Schnittmusterbestimmung an der nX-30.....	76
Abbildung 3.13:	Schnittmuster der nX-30.....	77
Abbildung 3.14:	AtGEN1 und AtSEND1 an nX-30 – native Produktstrukturen.....	78
Abbildung 3.15:	Identität des 30 nt-Schnittprodukts.....	79
Abbildung 3.16:	Schnittmusterbestimmung an der nX-32.....	81
Abbildung 3.17:	Schnittmuster der nX-32.....	82
Abbildung 3.18:	AtGEN1 und AtSEND1 an nX-32 – native Produktstrukturen.....	83
Abbildung 3.19:	AtGEN1 und AtSEND1 an der statischen X0-HJ – native Produktstrukturen.....	85
Abbildung 3.20:	Schnittmuster der statischen X0-HJ.....	86
Abbildung 3.21:	AtGEN1 und AtSEND1 an der migrierbaren X26-HJ – native Produktstrukturen.....	87
Abbildung 3.22:	Schnittstellenbestimmung an X26-HJ.....	88
Abbildung 3.23:	Schnittmuster der migrierbaren X26-HJ.....	89
Abbildung 3.24:	Religierbare Resolvaseprodukte.....	90
Abbildung 4.1:	Asymmetrie der Sequenz am JP der X26.....	98
Abbildung 4.2:	HJ-Resolvaseaktivität von AtSEND1 an der nX-30.....	104
Abbildung 4.3:	HJ-Resolvaseaktivität von AtGEN1 an der nX-32.....	105
Abbildung 4.4:	HJ-Resolvaseaktivität von AtSEND1 an der nX-32.....	106
Abbildung 4.5:	HJ-Resolvaseaktivität von AtGEN1 an der nX-30.....	107
Abbildung 9.1:	pETDuet1-StrepII-PS Vektorkarte.....	126
Abbildung 9.2:	pETDuet1-HisStrepII-PS-C Vektorkarte.....	127

Abbildung 9.3:	Übersicht der Negativkontrollen – 1	128
Abbildung 9.4:	Übersicht der Negativkontrollen – 2 (HJs).....	129
Abbildung 9.5:	Schnittstellenbestimmung an X0-5'-Flaps	130
Abbildung 9.6:	Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 an den X26-RFs	131
Abbildung 9.7:	Quantifizierung der Schnittprodukte an der nX-30 – vollständiger Datensatz	132
Abbildung 9.8:	Quantifizierung der Schnittprodukte an der nX-32 – vollständiger Datensatz	133
Abbildung 9.9:	Schnittstellenbestimmung an X0-HJ.....	134
Abbildung 9.10:	Quantifizierung der Schnittprodukte an der X0-HJ – vollständiger Datensatz.....	135
Abbildung 9.11:	Quantifizierung der Schnittprodukte an der X26 – vollständiger Datensatz	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht der HJ-Resolvasen	21
Tabelle 2.1:	Übersicht über die verwendeten Chaperonexpressionsplasmide	34
Tabelle 2.2:	Primer zur cDNA-Bestimmung und Sequenzierungen von AtGEN1 und AtSEND1 ..	35
Tabelle 2.3:	Klonierungsprimer	35
Tabelle 2.4:	Übersicht der verwendeten Substratoligonukleotide	36
Tabelle 2.5:	Herstellung der oligonukleotidbasierenden Modellstrukturen	51
Tabelle 2.6:	Typische Elektrophoresebedingungen	57
Tabelle 4.1:	Die konservierten Aminosäuren in den Homologen von HsGEN1 und ScYen1.....	96
Tabelle 4.2:	Sequenzkontext der Hauptschnittpositionen an der X26	102

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AS/aa	Aminosäure
BER	Basenexzisionsreparatur
BIR	<i>Break-induced replication</i> (BIR)
Bp	Basenpaar
CD	Chromo-Domäne
CDLV	<i>Chromo domain-like-Variante</i>
CO	Crossover
CPT	Camptothecin
CSD	Chromo shadow-Domäne
dHJ	doppelte Holliday Junction
D-Loop	<i>displacement loop</i>
DPM	<i>decays per minute</i> , Zerfälle pro Minute
DSB	Doppelstrangbrüche (DSB)
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
dsDNA	doppelsträngige DNA

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HJ/sHJ	Holliday Junction
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JP	Junction Point, Überkreuzungspunkt
kb	Kilobase
kD	kurzer Duplex
kDa	Kilodalton
LSC	Liquid Scintillation Counter = Liquid Scintillation Analyzer
MMR	Mismatchreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
NCO	Non-Crossover
nD	genickter Duplex
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i> , nicht-homologe Endverknüpfung
nHJ	genickte Holliday Junction
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Open reading frame (Offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
PRR	Postreplikativen Reparatur
SDSA	<i>synthesis-dependent strand-annealing</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSA	Single-Strand-Annealing
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBE-PAGE	Tris-Borat-EDTA-Polyacrylamidgelelektrophorese
UTR	untranslatierter Bereich

1. Einleitung

Sowohl für das Überleben eines jeden Organismus als Ganzes als auch für das jeder einzelnen Zelle ist die korrekte und weitestgehend vollständige Weitergabe der genetischen Information von einer Zelle an ihre Tochterzellen unerlässlich. Die Genomstabilität muss gewährleistet sein.

Die genetische Information liegt als Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Moleküle vor. Die sie aufbauenden Nukleinbasen sowie das sie verbindende Zucker-Phosphat-Rückgrat bilden auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften Angriffspunkte für zahlreiche endo- und exogene Faktoren, welche codierten Informationen verändern können. Solche Schädigungen müssen möglichst fehlerfrei repariert werden, um die Anzahl an Mutationen gering zu halten und die Genomstruktur zu bewahren. Dies ist insofern überlebenswichtig, da bereits eine einzige Mutation ein hohes Risiko für die Zelle bergen kann, sollte es die Funktion essentieller Enzyme oder struktureller Proteine beeinträchtigen (Buchanan *et al.*, 2000).

Dem gegenüber steht die Tatsache, dass es ohne Veränderungen der genetischen Information keine Evolution gäbe. Veränderungen der Erbinformation können, auf Artenebene betrachtet, unter bestimmten Selektionsdrücken einen Vorteil für das Individuum darstellen und so letztendlich zum Überleben des Individuums und damit der Art beitragen. Dies bezieht sich zum einen auf spontan auftretende Mutationen, welche potentiell fatal oder eben vorteilhaft sein können, zum anderen auf die gezielte Neuorganisation des Genoms im Rahmen der meiotischen Rekombination.

Die Bedeutung von Genomstabilität und gleichzeitiger Flexibilität, sowie deren enge Verknüpfung werden deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass die gleichen zellulären Mechanismen für beide Zwecke benutzt werden: Wege der Schadensreparatur wie die homologe Rekombination (HR) dienen gleichzeitig im Rahmen der sexuellen Fortpflanzung zur Neuorganisation des Genoms nach gezielter Doppelstrangbruchinduktion durch die Zelle selbst (Hartung und Puchta, 2000).

Trotz der Vielzahl an schädlichen Einflüssen, wie z.B. ultraviolette und ionisierende Strahlung, alkylierende Agenzien oder freie Radikale, besitzen alle Lebewesen ein relativ stabiles Genom (Tuteja *et al.*, 2001). Dies liegt an der evolutiv bereits sehr frühen Entwicklung effizienter DNA-Reparaturmechanismen. Das evolutive Alter der DNA-Reparatur, aber z.B. auch der DNA-Replikation, macht es wenig verwunderlich, dass diese Mechanismen und deren beteiligten Faktoren nicht nur zwischen Pflanzen, Tieren und Pilzen konserviert sind, sondern teilweise auch über die Grenze zwischen Pro- und Eukaryoten hinaus. Dies macht die vergleichende Betrachtung der Erkenntnisse aller Modellorganismen zu einer Notwendigkeit, welche aber gleichzeitig großes Potential birgt. Die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Organismen ist zwar auf Grund von z.B. pflanzenspezifischen Besonderheiten nicht immer gegeben, dennoch bietet der Vergleich Möglichkeiten für neue Ansätze und Erklärungen. Ebenso stützen sich viele Ergebnisse gegenseitig

und bauen so ein größeres, vollständigeres Bild von den Funktionsweisen der DNA-Reparatur auf, als es die Betrachtung einer einzelnen Art jemals könnte.

Beispiele für solche konservierten Wege der DNA-Reparatur sind die Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur (BER bzw. NER), die Mismatchreparatur (MMR), sowie für Strangbrüche das *non-homologous end-joining* (NHEJ) und die bereits erwähnte homologe Rekombination (HR) mit ihren weiteren Unterteilungen. Je nach DNA-Schaden und Reparaturmechanismus können während der Prozessierung intermediäre Strukturen wie D-Loops (*displacement loop*) und *chicken foot*-Strukturen bzw. Holliday Junctions (HJ) entstehen (Abbildung 1.1-3 und Abbildung 1.2-6a) Die Auflösung dieser Intermediate ist für die Zelle ebenso wichtig wie die Reparatur des Schadens selbst. Deshalb ist es wenig überraschend, dass die Forschung mehrere parallele und teilweise redundante Wege z.B. der Auflösung von Holliday Junctions zu Tage förderte. Die Auflösung solcher komplexer Strukturen kann z.B. durch Entwindung und Dekatenierung oder durch das Schneiden an speziellen Überkreuzungspunkten geleistet werden. Bekannte beteiligte Faktoren umfassen daher Mitglieder der RecQ-Helikasen und Topoisomerasen (Bennett und Keck, 2004; Mankouri und Hickson, 2007), sowie strukturspezifische Endonukleasen wie MUS81 oder GEN1/Yen1 (Boddy *et al.*, 2001; Ip *et al.*, 2008).

Die Holliday Junction wurde 1964 von Robin Holliday erstmals als eine intermediäre Struktur im Rahmen seines Modells zur Genkonversion in der Meiose von Pilzen beschrieben (Holliday, 1964). Bereits 1961 zeichneten Meselson und Weigle eine Struktur, welche eine HJ darstellte (Meselson und Weigle, 1961). Der vermutlich erste visuelle Nachweis einer HJ gelang Potter und Dressler, 1977 über Elektronenmikroskopie und zeigte in bestechender Klarheit die Struktur einer HJ in ihrer offen planaren Form, wie sie gerne in zweidimensionalen, schematischen Darstellungen benutzt wird (z.B. Abbildung 1.3 und Abbildung 1.4, jeweils in der Mitte).

Das Modell von der Genkonversion in Pilzen stellte sich über die Zeit in seinen Grundzügen als korrekt heraus und verhalf der Holliday Junction zu großer Beachtung. Wie Leach, 2007 zusammenfasste, vereinte R. Holliday in seinem Modell bereits bekannte Fakten, die auch heute noch das Wissen über die Entstehung meiotischer Crossover widerspiegeln.

1.1 Holliday Junctions im Kontext der DNA-Reparatur

Holliday Junctions sind als intermediäre Strukturen nicht nur in der Meiose involviert, sondern treten auch bei der schadensinduzierten DNA-Reparatur über homologe Rekombination, der *Break-induced replication* (BIR) und der Postreplikativen Reparatur (PRR) auf. Doppelstrangbrüche (DSB), die zu den toxischsten DNA-Schäden überhaupt gehören, können über NHEJ, *single strand annealing* (SSA) und HR repariert werden (Jackson und Bartek, 2009), wobei das NHEJ und SSA ohne HJ-ähnliche Intermediate auskommen. Sie sollen dennoch der Vollständigkeit halber hier kurz erläutert werden.

Non-homologous end-joining

Im somatischen Gewebe höherer Eukaryoten überwiegt der Anteil der NHEJ bei der Reparatur von DSBs (Sargent *et al.*, 1997). Allerdings ist die NHEJ fehleranfällig und kann neben fehlerfreier Reparatur auch zu Punktmutationen, Deletionen aber auch Insertionen führen (Puchta, 1999; Daley *et al.*, 2005). Die Grundprinzipien der NHEJ sind in allen untersuchten Organismen gleich (Übersicht in Wilson, 2007). Zuerst werden die freien DSB-Enden über den Ku70/Ku80-Heterodimer, welcher in

allen Eukaryoten konserviert ist, stabilisiert und durch die Dimerisierung zweier Heterodimere in räumlicher Nähe gehalten. Eventuell vorhandene, die Ligation störende Überhänge werden durch Nukleasen entfernt, Einzelstranglücken können dagegen über Polymerasen aufgefüllt werden (Abbildung 1.1-1a und b). Die DSB-Reparatur durch die NHEJ ist mit Ligation der DNA-Rückgrate abgeschlossen.

Single-strand-annealing

Beim SSA ist das Vorhandensein direkter Sequenzwiederholungen beiderseits des DSB Voraussetzung (Lin *et al.*, 1984). Im Unterschied zur NHEJ werden beim SSA nicht die freien DSB-Enden oder kurze 3'-Überhänge verknüpft, sondern über 5'-3'-Resektion längere 3'-Einzelstrangbereiche erzeugt (Abbildung 1.1-2). Der Ablauf der Resektion ist dabei der HR analog und wird dort genauer erläutert werden (siehe nächster Absatz). Durch die langen 3'-Überhänge ist es möglich, dass bei direkten Wiederholungen die komplementären Sequenzen Basenpaarungen eingehen können. Eventuelle Überhänge und Einzelstranglücken werden wie bei der NHEJ durch Nukleasen entfernt bzw. durch Polymerasen aufgefüllt (Abbildung 1.1-2a und b). Der letzte Schritt ist die Ligation der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen des DNA-Rückgrats beiderseits der Nicks. SSA bietet zwar eine effiziente Methode der DSB-Reparatur (Orel *et al.*, 2003), führt aber zum Verlust des gesamten Sequenzabschnitts zwischen den *repeat*-Regionen (Siebert und Puchta, 2002).

Homologe Rekombination

Während der ersten Reifeteilung der Meiose erfolgt die Reparatur der induzierter DSBs ausschließlich über die HR. Dieser Vorgang ist für die Paarung und spätere Segregation der homologen Chromosomen essentiell (Mimitou und Symington, 2009; Cole *et al.*, 2010). In somatischen Zellen kann die, in der Regel fehlerfreie, HR-Reparatur dagegen nur während der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus ablaufen, da nur zu diesen Zeitpunkten das primäre Template, das Schwesterchromatid, vorhanden ist (Aylon *et al.*, 2004; Ira *et al.*, 2004).

Die Abläufe der somatischen HR sollen am Beispiel der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erläutert werden (Übersicht in Mimitou und Symington, 2009). Homologe in Säugern werden in Klammern angegeben, sollte ihre Bezeichnung abweichen.

Die Initiation der HR erfolgt durch die Erkennung und Bindung der DSB-Enden durch den MRX-Komplex (MRN-Komplex), bestehend aus der Einzelstrang-Exo-/Endonuklease ScMre11, dem DNA bindenden Protein ScRad50 und ScXrs2 (HsNBS1), welches mit der Checkpoint-Kinase ScTel1 (HsATM) interagiert. Eine weitere Einzelstrang-Endonuklease ScSae2 (HsCtIP) ist an der initialen Endresektion beteiligt. Diese geht über in die prozessive 5'-3'-Resektion, für welche unter anderem die Aktivität von ScExo1 benötigt wird. Dabei handelt es sich um eine der Rad2/XPG-Nukleasefamilie (siehe Kapitel 1.3.2.2) zugehörige 5'-3'-Exonuklease, welche *in vitro* auch eine Flap-Nukleaseaktivität aufweist (Tran *et al.*, 2004). Daneben arbeiten die 3'-5'-RecQ-Helikase ScSgs1 (HsBLM) und ScDna2, welches eine ssDNA-Endonuklease- sowie eine Helikaseaktivität besitzt, zusammen, um lange ssDNA-Überhänge zu erzeugen (Zhu *et al.*, 2008; Symington und Gautier, 2011). Diese werden durch das heterotrimere eukaryotische Einzelstrang-Bindeprotein RPA unter Ausbildung eines Nukleoprotein-Filaments gebunden und stabilisiert.

RPA wird in der Folge aus dem Nukleoprotein-Filament von der Rekombinase Rad51 verdrängt. Diese vermittelt die Stranginvasion und Homologiesuche im homologen Duplex, unter Ausbildung eines

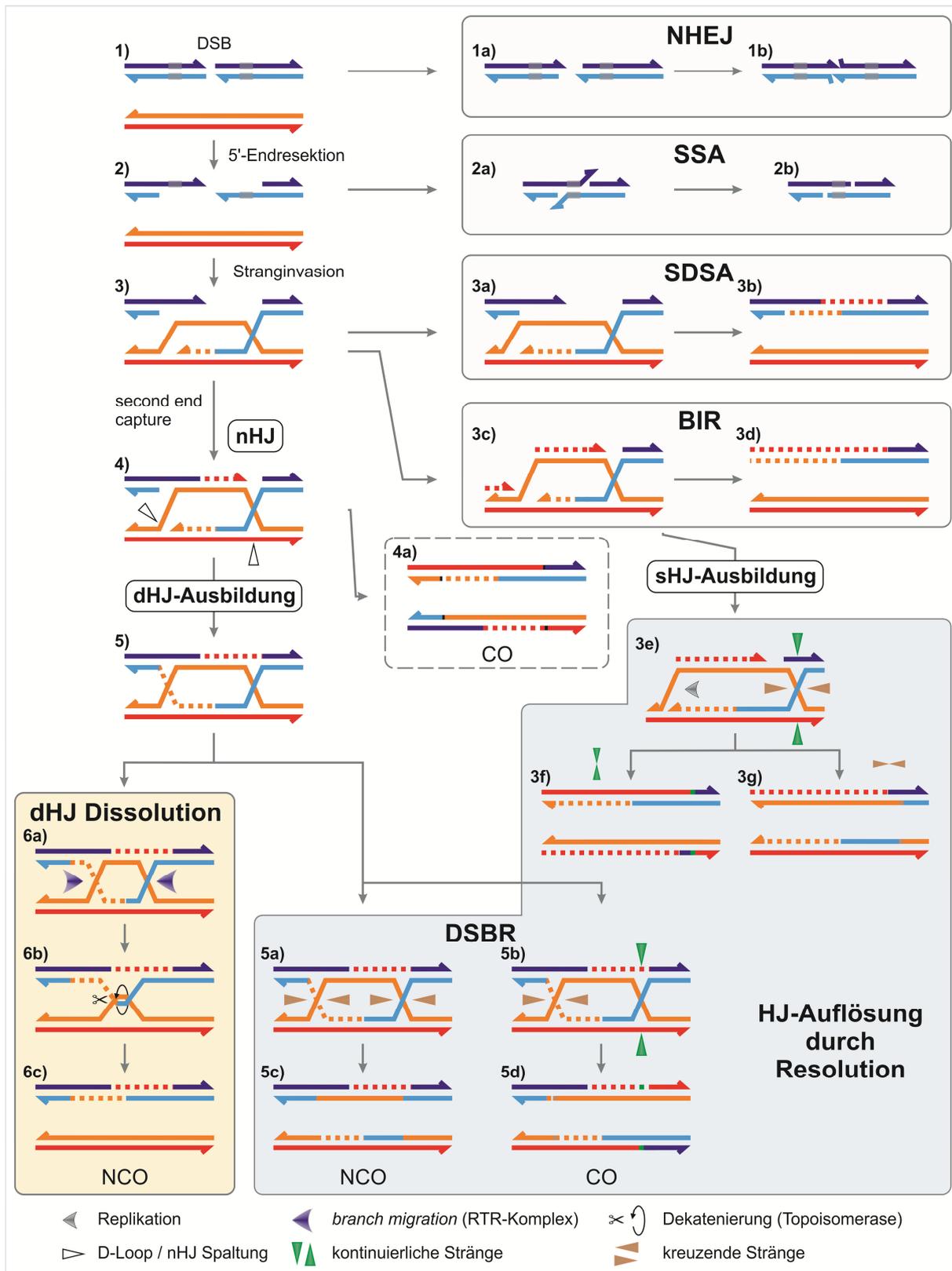


Abbildung 1.1: Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Für die Reparatur von DSBs (Doppelstrangbrüchen) stehen der Zelle zahlreiche teils fehleranfällige, teils konservative Reparaturmechanismen zur Verfügung. Tritt ein DSB auf (1), kann dieser über NHEJ (*Non-homologous end-joining*) wieder verschlossen werden (1a und 1b), wobei es durch die lokal begrenzte Resektion der 5'-Enden des Bruches zu potentiell schädlichen Mutationen kommen kann. Erfolgt eine umfangreichere 5'-3'-Endresektion (2) und liegen beiderseits des Bruches sich wiederholende Sequenzen in der gleichen Orientierung vor, kann der Bruch über das SSA (*single strand annealing*) verschlossen werden, wobei jedoch die gesamte Sequenzinformation zwischen den *repeats* verloren geht. Alternativ kann ein durch die 5'-3'-Endresektion erzeugter langer 3'-Überhang in homologe

Duplexbereiche (des Schwesterchromatids während der Mitose bzw. des homologen Chromosoms während der Meiose) invadieren und dabei den nicht komplementären Strang verdrängen. Die entstehende Struktur wird *displacement loop* (D-Loop) genannt. Mit dem komplementären Strang als Matrize wird das invadierte 3'-Ende über Neusynthese verlängert (**3**). Nach dem SDSA-Modell (*synthesis-dependent strand-annealing*) wird die Neusynthese so lange weitergeführt, bis das verlängerte 3'-Ende den Bruch überspannt und genügend Sequenzhomologie für eine korrekte Paarung mit dem anderen Bruchende aufweist (**3a**). Über z.B. Antirekombinasen wird der verlängerte Strang aus dem D-Loop herausgelöst und schlägt die Brücke über den Bruch. In der Folge dient er nun selbst als Matrize für die Synthese des komplementären Strangs (**3b**). Ist jedoch das zweite Ende des Bruches nicht vorhanden, kann die Restaurierung des Chromosoms über BIR (*Break-induced replication*) erfolgen. Dabei wird mit der Initiation der Rückwärtsstrangsynthese eine Replikationsgabel gebildet (**3c**), welche den verloren gegangenen Chromosomenarm vom Ort des Bruches bzw. der Invasion bis zum Ende des homologen Arms wieder herstellt. Der D-Loop kann entweder vor der Replikationsgabel hergeschoben werden oder es kommt durch *branch migration* des Überkreuzungspunkts in die entgegengesetzte Richtung zur Stabilisierung einer einzelnen HJ (sHJ), welche durch Resolution aufgelöst werden kann (**3e**). In beiden Fällen ist die BIR jedoch potentiell hochmutagen, da es zu wiederholten, möglicherweise ektopischen, Neuinvasionen in homologe Sequenzen kommen kann. In jedem Fall kommt es zum Verlust der Heterozygotität (**3d, f und g**). (**4**) Ist das zweite Bruchende, wie in (**3**) abgebildet, vorhanden und wird der D-Loop stabilisiert, kann es zum *second end capture* kommen: Der verdrängte Strang des D-Loops paart mit den komplementären Sequenzen am zweiten Ende des DSB und dient als Matrize für die Reparatursynthese des zweiten 3'-Endes. Diese Struktur stellt eine genickte HJ (nHJ) dar und kann über Nukleasen aufgelöst werden. Wird gleichzeitig das Ende des D-Loop vor dem invadierenden Strang geschnitten, werden zwei vollständige Chromatiden wiederhergestellt, allerdings unter Ausbildung eines Crossovers (**4a**). (**5**) Alternativ kann es durch das Reannealing des invadierenden Stranges zur Ausbildung einer doppelten HJ (dHJ) kommen. Diese kann zum einen über Dissolution aufgelöst werden, wobei durch die Enzyme des RTR-Komplexes zuerst die beiden HJs bis zur Ausbildung einer Hemikatenanstruktur aufeinander zugeschoben werden, welche dann durch die Topoisomerase des RTR-Komplexes zu Non-Crossover-Produkten aufgelöst wird (**6a bis c**). Zum anderen kann die dHJ wie die sHJ im Rahmen der BIR über Resolution durch Endonukleasen aufgelöst werden (**5a und b**). Dabei entscheidet die relative Orientierung der Schnittachsen an beiden HJs, hier für zwei der vier Möglichkeiten dargestellt, über die Entstehung von Crossovern oder Non-Crossovern (**5c und d**). Verändert nach Schwartz und Heyer, 2011.

displacement loop (D-Loop). Der komplementäre Strang wird für die Reparatursynthese über die Position des DSB hinweg genutzt (Abbildung 1.1-3 und 3a). Am D-Loop kann die HR nun verschiedene Wege einschlagen, deren genaue Regulation noch unbekannt ist.

Durch Auflösung des D-Loops durch die *strand displacement* Aktivität von ScSrs2 (in Mensch die RecQ-Helikase HsBLM und die Antirekombinase HsRTEL1) wird die Reparatur in den *synthesis-dependent strand-annealing*-Weg (SDSA) geleitet. In *Arabidopsis thaliana* konnte hierin für AtRTEL1 eine Funktion in der meiotischen sowie in der somatischen Rekombination (Knoll, 2011; Seeliger, 2011), sowie für AtSRS2 eine *in vitro* Antirekombinaseaktivität (Blanck *et al.*, 2009) gezeigt werden. Das aus dem D-Loop herausgelöste, neu synthetisierte 3'-Ende kann dann mit der komplementären Sequenz im gegenüberliegenden, resektierten Ende des DSB hybridisieren und so den DSB überbrücken. Vorhandene Einzelstranglücken werden über Polymerasen aufgefüllt und abschließend über Ligation verknüpft (Abbildung 1.1-3b).

Kommt es zum *second end capture*, beschreibt zum Beispiel das Doppelstrangbruchreparaturmodell (DSBR) die weiteren Vorgänge. Hierfür wird zunächst der D-Loop erweitert, bis der verdrängte Strang über komplementäre Sequenzen mit dem zweiten Ende des DSB paaren kann, woraufhin dieses ebenfalls über Polymerasen, mit dem verdrängten Strang des D-Loops als Matrize, verlängert werden kann (Szostak *et al.*, 1983). Die dabei entstehende Struktur ähnelt einer genickten HJ (nHJ), welche von strukturspezifischen Nukleasen, z.B. ScMus81-Mms4 (AtMUS81-EME1A bzw. EME1B) erkannt und geschnitten werden kann, was in der Auflösung zu Crossover-Produkten resultiert (Abbildung 1.1-4a, Osman *et al.*, 2003; Geuting *et al.*, 2009). Alternativ kann das invadierende und über Neusynthese verlängerte 3'-Ende ebenfalls mit dem zweiten Ende des DSB paaren. Es kommt zur Ausbildung einer Struktur, die doppelte Holliday Junction (dHJ, Abbildung 1.1-5) genannt wird, da sie

aus zwei benachbarten HJs besteht. Mit Ausbildung der dHJ ist zwar der DSB geschlossen, also *de facto* repariert, doch liegt jetzt eine physikalische Verknüpfung zweier DNA-Helices vor, welche für das schadensfreie Überleben der Zelle aufgelöst werden muss. Dies kann durch zwei endonukleolytische Schnitte je Überkreuzungspunkt erreicht werden. Dabei entscheidet die Orientierung der einen Schnittrichtung zur anderen, ob Crossover- oder Non-Crossover-Produkte entstehen (Abbildung 1.1-5 a bis d). Strukturspezifische Endonukleasen, die anhand ihrer *in vitro*-Daten für eine solche Aktivität in Frage kommen sind ScMus81-Mms4, ScYen1 (HsGEN1) und ScSlx1-Slx4 (HsSLX1-BTBD12) (Boddy *et al.*, 2001; Ip *et al.*, 2008; Fekairi *et al.*, 2009). Eine zweite Möglichkeit dHJs aufzulösen, die nicht zur klassischen DSBR gezählt wird, geschieht unabhängig von strukturspezifischen Endonukleasen durch die Aktivität des RTR-Komplexes (Abbildung 1.1-6a bis c). Dieser besteht aus einer RecQ-Helikase (ScSgs1 bzw. HsBLM), der Topoisomerase 3 (ScTop3, HsTOPOIII α) und dem Strukturprotein Rmi1. Die Helikaseaktivität der RecQ-Helikase bewegt die beiden Überkreuzungspunkte (Junction Point, JP) der dHJ über *branch migration* aufeinander zu, bis es zur Ausbildung einer Hemikatenanstruktur kommt. Diese wird von der Topoisomerase aufgelöst, resultierend in Non-Crossover-Produkten.

Break-induced replication

Liegt ein DSB in der Zelle vor und das *second end capture* kann nicht erfolgen oder das zweite Ende des DSB ist nicht verfügbar, wie z.B. bei kollabierten Replikationsgabeln oder der Degradation der Telomere, verfügt die Zelle mit der *Break-induced replication* (BIR) über einen weiteren, HR-basierten Reparaturmechanismus. Am freien Ende des DSB wird durch Endresektion ein 3'-Einzelstrangüberhang erzeugt, welcher von ScRad51 gebunden und so in homologe Sequenzen des Schwesterchromatids invadieren kann. Wie bei den bereits beschriebenen Modellen kommt es zur Ausbildung eines D-Loops und zur Verlängerung des invadierenden Strangs mit dem Schwesterchromatid als Matrize. Gleichzeitig wird die Folgestrangsynthese neu initiiert (Abbildung 1.1-3c), was die BIR vom SDSA-Mechanismus unterscheidet (Wang *et al.*, 2004; Lydeard *et al.*, 2007). Dabei entsteht eine einzelne HJ-ähnliche Struktur an der rückwärtigen (der Replikationsrichtung abgewandten) Seite des D-Loops, welche durch *branch migration* entgegengesetzt zur Replikationsrichtung stabilisiert werden könnte (Ho *et al.*, 2010; Pardo und Aguilera, 2012). Wird diese HJ durch endonukleolytische Schnitte aufgelöst, entsteht eine neue Replikationsgabel, welche das beschädigte Chromatid bis zu den Telomeren mit dem Schwesterchromatid als Matrize restaurieren kann (Abbildung 1.1-3e, Malkova *et al.*, 1996; Lydeard *et al.*, 2007). Dabei werden aber natürlich alle Allele des verloren gegangenen Teils in die des Schwesterchromatids überführt; es kommt zum Verlust der Heterozygotität (*loss of heterozygosity* = LOH, Abbildung 1.1-3f und g). Alternativ kann der ursprüngliche D-Loop als Replikationsgabel ohne Auflösung der HJ-ähnlichen Struktur immer weiter verlängert werden, wobei ihm die Replikationsgabel während der Neusynthese des Chromatids folgt (Abbildung 1.1-3c und d).

Für die prozessive Reparatursynthese bei der BIR ist ScPol32, die nicht essentielle Untereinheit der DNA Polymerase δ , notwendig (Lydeard *et al.*, 2007). Zu Chromosomen-Neuorganisationen kommt es, wenn die Neusynthese des Chromosomenarms nicht prozessiv in einem fort geschieht, sondern Zyklen aus D-Loop Auflösung und neuer Stranginvasion durchlaufen werden. Dann kann es zu ektopischer Rekombination mit anderen Sequenzen im Genom kommen (Smith *et al.*, 2007). Auf Grund dessen und dem LOH ist die BIR unterdrückt, so lange ein zweites DSB-Ende vorliegt (Smith *et al.*, 2007; Llorente *et al.*, 2008).

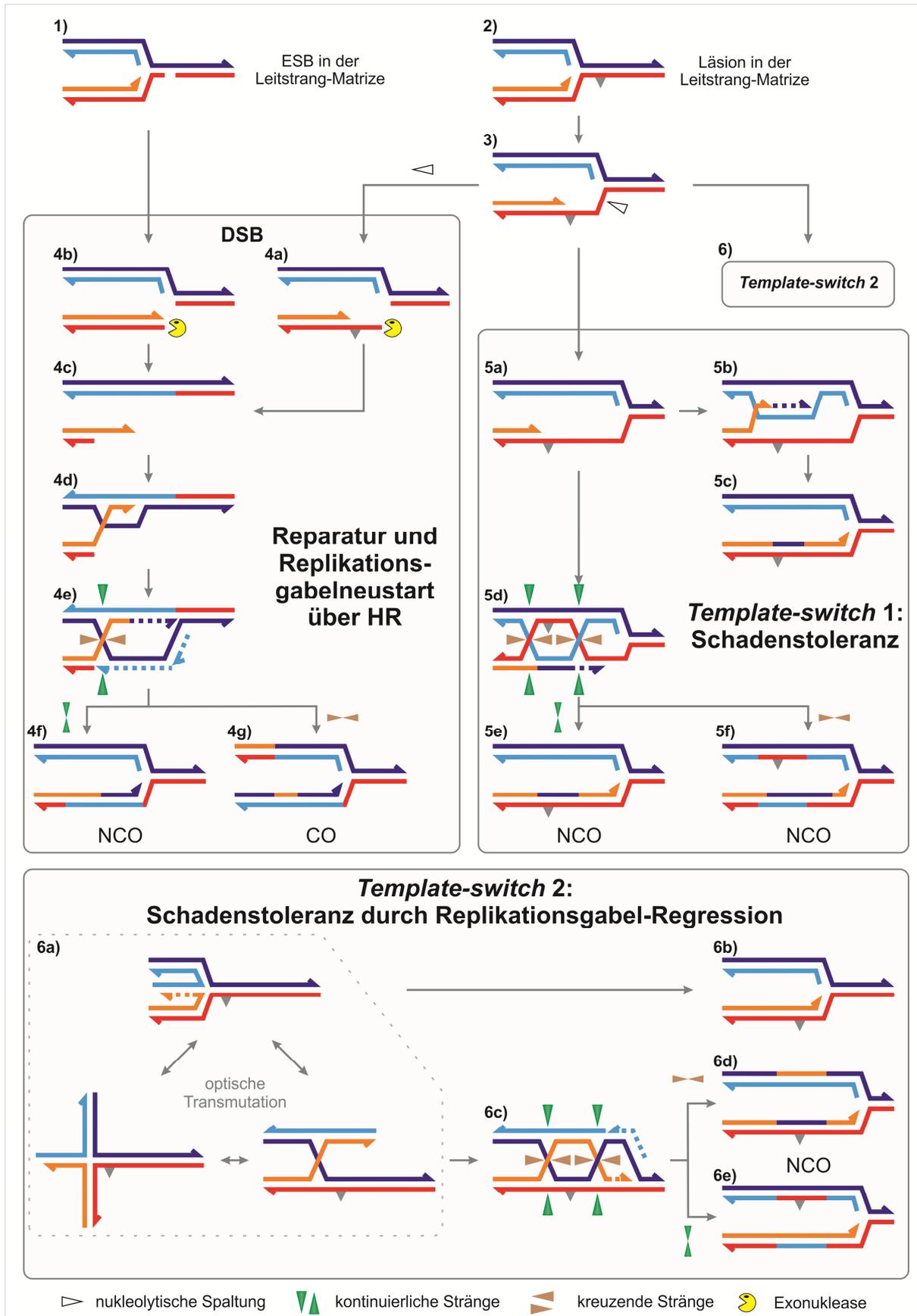


Abbildung 1.2: Reparatur und Schadenstoleranz an Replikationsgabeln

(1) Einzelstrangbrüche (ESB) und Läsionen (2) blockieren die Replikationsgabel, wenn sie auf ein solches Hindernis trifft. Zur Überwindung stehen der Zelle z.B. die Mechanismen der Schadenstoleranz über *template-switch* und der

HR-gestützten Reparatur zur Verfügung. Eine Läsion in der Matrize des Leitstranges führt zur Entkopplung von Leit- und Folgestrangsynthese **(3)**. Die blockierte Replikationsgabel kann durch nukleolytische Spaltung vor der Läsion (z.B. durch ScMus81-Mms4) in einen einseitigen DSB überführt werden (Hanada *et al.*, 2006) **(4a)**. Ein Einzelstrangbruch in der Matrize des Leitstranges wird automatisch zu einem solchen einseitigen DSB, wenn die Replikationsgabel auf ihn trifft **(4b)**. Über 5'-3'-Endresektion wird die Läsion entfernt **(4a)** und ein überstehendes 3'-Ende gebildet **(4c)**, welches durch RAD51-vermittelte Stranginvasion in die bereits replizierten komplementären Bereiche des Schwesterchromatids einen D-Loop erzeugt **(4d)**. Der verdrängte Strang wird ebenso wie der zum 3'-Ende komplementäre Strang als Matrize für die DNA-Synthese verwendet. Für die vollständige Wiederherstellung der Replikationsgabel muss die HJ-Struktur, welche durch Invasion und Neusynthese entstanden ist, aufgelöst werden **(4e)**. Dabei entscheidet die Richtung der Schnittachse über die Bildung von Non-Crossovers **(4f)**, kontinuierliche Stränge geschnitten) oder Crossovers **(4g)**, kreuzende Stränge geschnitten). Als Alternative zur Reparatur kann die Zelle die durch Entkopplung der Leit- und Folgestrangsynthese entstandenen Einzelstrangbereiche zur Überbrückung des Schadens über *template-switch* nutzen (Li und Heyer, 2008) **(5a)**. Das blockierte 3'-Ende des Vorwärtsstranges kann über Helikasen entwunden und von Rad51 zur Stranginvasion in das Schwesterchromatid genutzt werden. Dabei dient der bereits replizierte Folgestrang als Matrize für die Verlängerung des Leitstrangs **(5b)**. Durch Herauslösen aus dem D-Loop kann der so verlängerte Leitstrang über die Läsion hinweg hybridisieren und die Replikation kann fortgeführt werden **(5c)**. Im zweiten Modell der Schadenstoleranz-Wege kann der vor der Läsion einzelsträngige Leitmatrizenstrang den synthetisierten Folgestrang verdrängen und mit dessen Matrize hybridisieren. Durch Leitstrangsynthese mit dem verdrängten Strang als Matrize entsteht eine dHJ, welche von Resolvasen aufgelöst werden kann. Dabei entscheidet die relative Orientierung der Schnittachsen an beiden HJs über die Art der Produkte: werden an beiden HJs jeweils die kontinuierlichen oder kreuzenden Stränge geschnitten, entstehen Non-Crossover-Produkte **(5e und f)**, während eine Kombination der beiden unterschiedlichen Schnittrichtungen zu Crossovers führt (nicht gezeigt). **(6)** Die Rückführung der Replikationsgabel ist ein weiterer Weg der Schadenstoleranz über *template-switch*, welcher über Helikasen und Translokasen eingeleitet werden kann (Machwe *et al.*, 2006; Kobbe *et al.*, 2008; Unk *et al.*, 2010). Bei der Gabelregression kann das 3'-Ende des blockierten Leitstranges mit dem längeren 5'-Ende des Folgestranges hybridisieren und diesen als Matrize nutzen. Die resultierende Struktur wird anhand der in **6a oben** dargestellten Form *chicken foot*-Struktur genannt und entspricht einer HJ, wie die optischen Transmutationen in **6a unten** zeigen. Die *chicken foot*-Struktur kann durch Umkehrung der Gabelregression wieder zu einer prozessiven Replikationsgabel umgewandelt werden **(6b)**. Alternativ kann es vor der Läsion zur Stranginvasion des verlängerten 3'-Endes des Leitstranges kommen. Dabei wird eine dHJ gebildet **(6c)**, welche analog zu **5d** durch Resolution in eine prozessive Replikationsgabel überführt werden kann, wobei Non-Crossover **(6d und e)** oder Crossover (nicht gezeigt) entstehen können.

Reparatur von Schäden während der Replikation

Doppelte Holliday Junctions als Rekombinationsintermediate kommen in *S. cerevisiae* vor allem in der Meiose vor, in mitotischen Zellen sind sie 10x weniger häufig (Schwacha und Kleckner, 1995; Bzymek *et al.*, 2010). Trotzdem hat sich gezeigt, dass die HJ-auflösenden Enzyme eine Rolle in der Reparatur spontaner DNA-Schäden in der Mitose spielen (Agmon *et al.*, 2011). Andersen *et al.*, 2011 postulieren darüber hinaus, dass strukturspezifische Nukleasen bei der Prozessierung von Intermediaten, welche bei der Behebung replikationsassoziierter Schäden auftreten können, involviert sind.

Tatsächlich finden sich HJ-ähnliche Strukturen in Modellen zur Reparatur und dem Replikationsgabelneustart über HR und der Postreplikativen Reparatur (PRR). Die PRR ist Teil der schadenstoleranten Reparatur, welche das Voranschreiten der Replikation ungeachtet eines Schadens über die Schadstelle hinaus ermöglicht. Dies ist vorteilhaft, da ein Replikationsstopp fatal für die Zelle enden würde, während ein überbrückter Schaden anschließend über BER, NER oder HR entfernt werden kann (Li und Heyer, 2008). Die Vorgänge zur Überbrückung oder Reparatur eines Schadens an der Replikationsgabel sind in Abbildung 1.2 zusammengefasst und werden in der Abbildungslegende detailliert erklärt.

1.2 Die Holliday Junction: eine dreidimensionale dynamische Struktur

Da die HJ als zentrales Element der DNA-Rekombination angesehen wurde, unternahm man bereits früh Anstrengungen um mehr über ihre dreidimensionale Struktur herauszufinden. Ausführliche Übersichtsartikel wurden von Lilley, 2000 und Khuu *et al.*, 2006 verfasst. Die Kernpunkte werden hier noch einmal dargestellt.

Lilley und Kollegen beschrieben bereits 1988, dass 4-Wege-Kreuzungen (*four way junctions*), wie HJs in der Literatur auch genannt werden, in Abhängigkeit der Pufferbedingung zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen können (Duckett *et al.*, 1988). Dabei haben zweiwertige Metallionen den größten Einfluss auf die räumliche Struktur. In Abwesenheit zweiwertiger Metallionen, wie Mg^{2+} , wurde unter Niedrigsalzbedingungen sowohl über vergleichende gelelektrophoretische als auch mit auf *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) basierenden Analysen gezeigt, dass eine aus vier Oligonukleotiden bestehende HJ eine nahezu planare Konformation annimmt, in der die vier helikalen Arme der Junction zu den Ecken eines Quadrates ausgerichtet sind (Duckett *et al.*, 1988, Abbildung 1.3 -Mitte). Diese offen planare Konformation mit vier Symmetrieachsen ermöglicht die größtmögliche Minimierung der Effekte der elektrostatischen Abstoßung durch die negativ geladenen Phosphate des Zucker-Phosphat-Rückgrats (Lilley, 2000). Die Zugänglichkeit des Junction Point (JP) für Endonukleasen und gleichzeitig die Fähigkeit zur *branch migration* sollten in dieser Form optimal sein. Tatsächlich wurde gezeigt, dass manche HJ-auflösende Enzyme ebenso wie der EcRuvAB-Komplex durch die Bindung der Junction eine Konformation erzwingen, welche der offen planaren Konformation ähnlich ist (Parsons *et al.*, 1995; Fogg *et al.*, 2001; Khuu *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2011). Spontane *branch migration* läuft in Abwesenheit von Mg^{2+} um drei Größenordnungen schneller ab, als im Mg^{2+} -haltigen Milieu (Panyutin und Hsieh, 1994). Für Translokasen (Enzyme, die NTP-Hydrolyse mit der gerichteten Bewegung an ss- oder dsDNA koppeln (Singleton *et al.*, 2007)) wie HsHLTF, HsFANCM und AtFANCM wurde gezeigt, dass sie im Unterschuss von freiem Mg^{2+} *branch migration* katalysieren können und Mg^{2+} in der Reaktion die Aktivität hemmt (Markus Bauknecht (unveröffentlichte Daten), Gari *et al.*, 2008; Blastyak *et al.*, 2010). Auch dies deutet darauf hin, dass HJs ohne den Einfluss zweiwertiger Ionen in der offen planaren Form leicht migrierbar sind. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde spekuliert, ob die offen planare Form die physiologisch relevante Form einer HJ darstellt (Lilley, 2000). Allerdings kann diese Aussage nicht uneingeschränkt getroffen werden. Es gilt, dass die Struktur im physiologischen Kontext einer Dynamik mit der offen planaren Konformation als Intermediat und den zweiten möglichen Konformation der *stacked X-structure* unterliegt.

Die *stacked X-Form* einer HJ ist durch antiparalleles coaxiales Stacking je zweier Helices charakterisiert, d.h. je zwei, im offen planaren Modell rechtwinklig angeordnete Helices, bilden eine einzige kontinuierliche Helix, mit einer gemeinsamen Achse, wie in Abbildung 1.3 durch die dunkelrosanen Pfeile angedeutet. Dabei beschreibt z.B. das Stacking A+B/C+D, dass die beiden Helices A und B und die Helices C und D jeweils eine einzige kontinuierliche Helix mit einer gemeinsamen Achse bilden (Abbildung 1.3, links). Die H-förmigen Darstellungen in Abbildung 1.3 entsprechen den Seitenansichten einer HJ. Eine Seite der *stacked X-Konformation* weist eine durchgängige kleine Furche auf, während die entgegengesetzte Seite den Charakter einer großen Furche besitzt (Lilley, 2000). In der Frontalansicht (Abbildung 1.3, jeweils ganz außen) wird die rechtshändige, X-förmige Anordnung der *stacked X-Konformation* mit einem spitzen Winkel zwischen 40° und 60° deutlich (von Kitzing *et al.*, 1990; Nowakowski *et al.*, 1999; Eichman *et al.*, 2000).

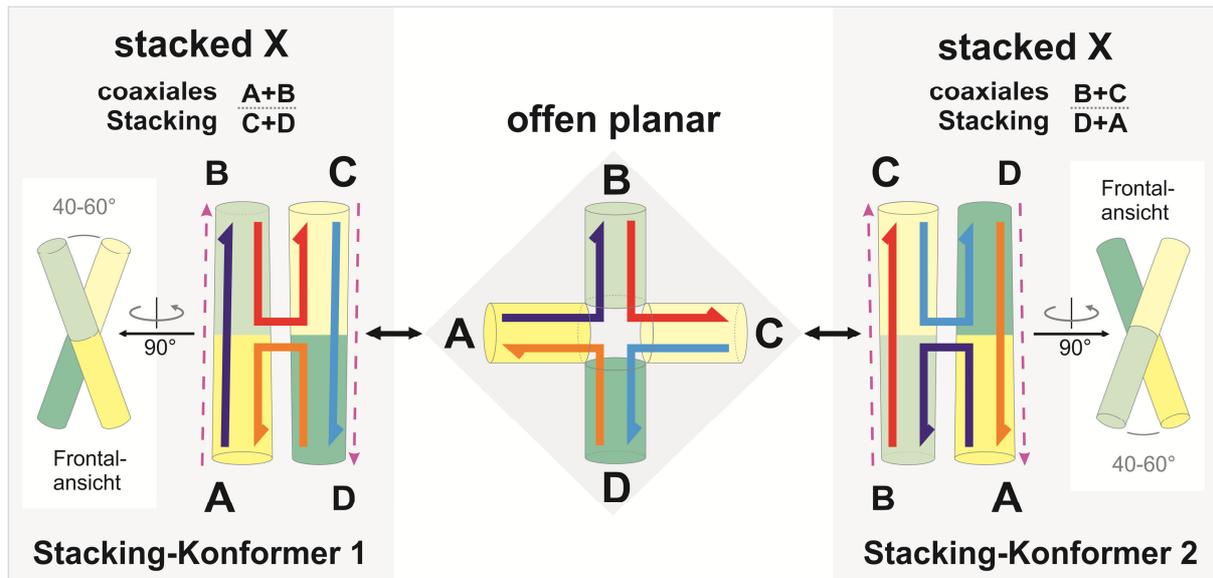


Abbildung 1.3: Offen planare und stacked X-Konformation der HJs

Zentral ist schematisch eine HJ dargestellt, wie sie in der offenen planaren Konformation mit den helicalen Armen A bis D auf die vier Ecken eines Quadrats ausgerichtet ist. Links und rechts daneben sind die H-förmigen Seitenansichten der beiden möglichen Konformere der *stacked X*-Form dargestellt. Je zwei helicale Arme der HJ sind coaxial gestackt, d.h. sie bilden eine kontinuierliche Helix mit einer einzigen Helixachse (gestrichelte Pfeile in dunkelrosa). Kontinuierliche Stränge laufen parallel zur Helixachse, während die diskontinuierlichen Stränge von einer Helix in die andere überwechseln. Ganz außen ist in der Frontalansicht die namensgebende X-förmige Anordnung der gestackten Helices dargestellt.

Die antiparallele Anordnung der gestackten Helices (in Abbildung 1.3 durch die Richtung der kontinuierlichen Stränge und die gestrichelten Achsenpfeile dargestellt) hat zur Folge, dass sich keine der DNA-Stränge überkreuzen, sondern U-förmig von einer Helix in die andere wechseln. Obwohl diese Strukturen den frühen Modellen einer HJ widerspricht, wurde bereits über zahlreiche unabhängige Methoden gezeigt, dass die beiden Helixachsen antiparallel vorliegen (Chen *et al.*, 1988; Churchill *et al.*, 1988; Duckett *et al.*, 1988; Cooper und Hagerman, 1989; Murchie *et al.*, 1989; von Kitzing *et al.*, 1990; Murchie *et al.*, 1991; Clegg *et al.*, 1992). Der abschließende Beweis wurde mit der Auflösung der ersten Kristallstrukturen aufgelöst erbracht (Nowakowski *et al.*, 1999; Ortiz-Lombardia *et al.*, 1999; Eichman *et al.*, 2000).

Unter physiologischen Bedingungen quenchen zweiwertige Metallionen, wie Mg^{2+} , bereits in niedrigen Konzentrationen von 100 μM die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der einzelnen Helices (Duckett *et al.*, 1990). Auch einwertige Ionen wie Natrium- oder Kalium-Ionen können (unvollständiges) Stacking vermitteln, allerdings sind dazu höhere Konzentrationen von 50 mM nötig (Duckett *et al.*, 1990; Clegg *et al.*, 1992).

Wie in Abbildung 1.3 ersichtlich, sind zwei Stacking-Konformere möglich. Ob und welche davon bevorzugt ist, hängt von den vier Basenpaarungen am Junction Point und der weiteren Sequenzkomposition von mindestens drei Basenpaaren und den JP ab (Übersicht in Lilley, 2000). Beispiele aus der Literatur sind die statischen Junctions J1, J3 und J7. Die Junctions J1 und J3 besitzen eine starke entgegengesetzte Bevorzugung für eines der beiden Stacking-Konformere, während J7 die beiden Formen zu ungefähr gleichen Teilen einnimmt (Duckett *et al.*, 1988; Grainger *et al.*, 1998; McKinney *et al.*, 2003).

In Hinblick auf die Migrierbarkeit der Junction ergibt sich aus der *stacked X*-Konformation eine interessante Beobachtung. Wie bereits erwähnt, wurde für die *stacked X*-Konformation gezeigt, dass

die *branch migration* 1000x länger für einen Ein-Nukleotid-Schritt braucht, als in der offenen planaren Konformation in Abwesenheit von Mg^{2+} (Panyutin und Hsieh, 1994). Somit stellt sich die Frage, wie die dynamische Struktur der HJ mit den Rekombinationsmodellen, die auf *branch migration* basieren, vereinbar ist. Der Vergleich von Konformations-Austauschrate und Schrittgeschwindigkeit bei der *branch migration* zeigt jedoch, dass der Wechsel zwischen den Konformeren schneller geschieht als die Verschiebung des Junction Points. Dieses Verhältnis bleibt auch bei höheren Magnesiumkonzentrationen erhalten. Somit ist die offene planare Konformation als leicht migrierbares Intermediat während jedem Verschiebungsschritt mehrmals verfügbar (Panyutin *et al.*, 1995; McKinney *et al.*, 2003).

Junctions mit Nick im Junction Point

Da in der vorliegenden Arbeit auch Holliday Junctions mit einem Einzelstrangbruch (Nick) in einem der vier Stränge verwendet wurden, ist die Arbeit von Pöhler *et al.*, 1994 interessant. In ihr beschreiben die Autoren die dreidimensionale Struktur einer genickten HJ auf Basis der J3, welche in ihrer *stacked X*-Konformation einen starken Bias für das coaxiale Stacking der Helices B+X und H+R aufweist. In dieser Konformation sind die Stränge x und h kontinuierlich und die Stränge b und r wechseln die helikale Achse (Abbildung 1.4A). Der Nick wurde direkt im fixierten JP positioniert. In

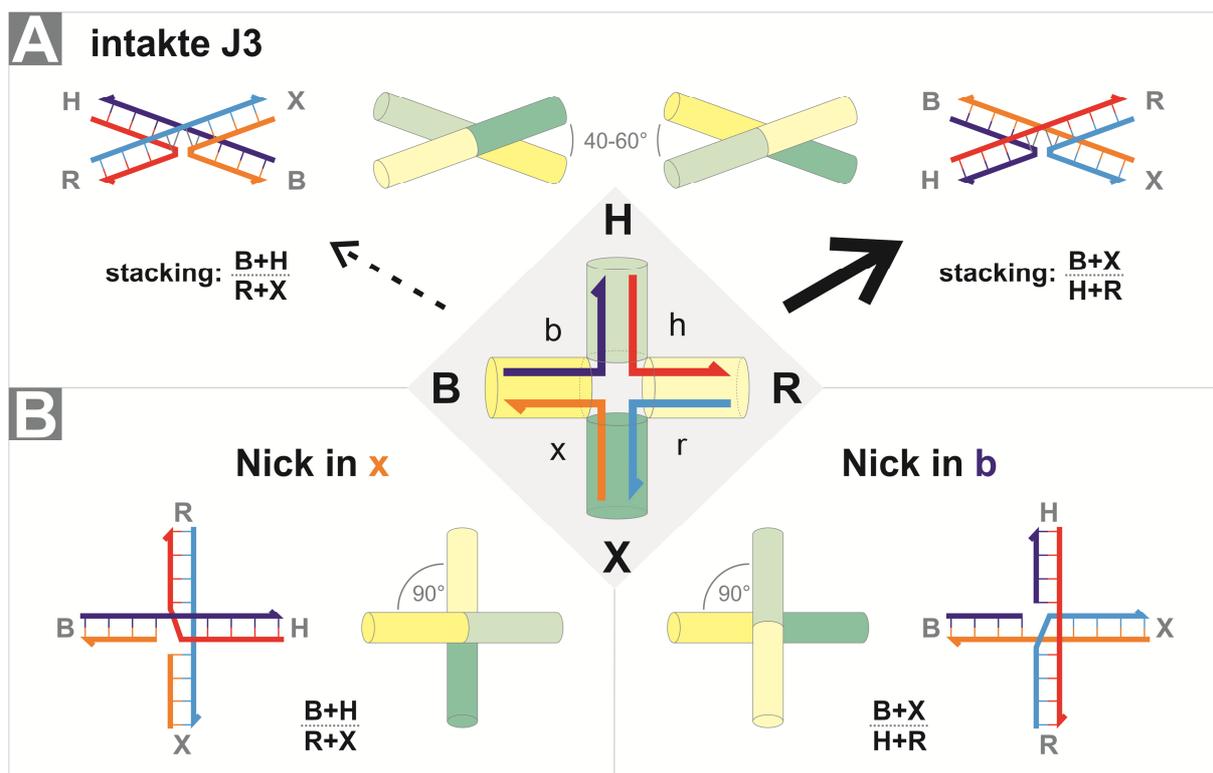


Abbildung 1.4: Konformationsvergleich von intakter und genickter HJ

Mitte: Übersichtsschema über die Junction 3. Kleine Buchstaben bezeichnen die Stränge, große Buchstaben bezeichnen helikale Arme. Halbe Pfeilspitzen symbolisieren das 3'-Ende der Oligonukleotide. **A:** Die Junction 3 besitzt eine starke Bevorzugung für B+X/H+R-Stacking (rechte Seite), während der B+H/R+X-Konformer kaum vorkommt (linke Seite). In beiden Fällen bilden die gestackten Helices einen spitzen Winkel. **B:** Ein Nick in einem der Stränge führt zu einer rechtwinkligen Anordnung der gestackten Helices. Dabei wird das Stacking so gesteuert, dass der genickte Strang und sein gegenüberliegender Strang den Wechsel zwischen den Helices vollziehen. Der Nick in Strang b resultiert im bevorzugten Stacking der intakten J3 (B+X/H+R, rechts), während eine genickter Strang x das Stacking in die seltenere Konformation drängt (B+H/R+X, links).

Anwesenheit von Mg^{2+} kam es wie bei der intakten J3 zu coaxialem Stacking. Allerdings ordneten sich die beiden Helixachsen nicht wie in der J3 in einem vorhergesagten Winkel von 60° , sondern in einem Winkel von 90° an.

Abhängig davon, welcher Strang genickt wurde, ließ sich die bevorzugte Stacking-Konformation beeinflussen. Der Nick im b-Strang führte zu coaxialem Stacking der Helices B+X sowie H+R, während der Nick im x-Strang zu coaxialem Stacking der Helices B+H und R+X führte (Abbildung 1.4B)., Letztere entspricht der von der intakten J3 seltener eingenommenen Konformation. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich eine HJ bevorzugt so anordnet, dass die durch Nicks unterbrochenen Stränge den Helixwechsel vollziehen. Dieser Effekt tritt ausschließlich dann auf, wenn der Nick direkt im JP lokalisiert ist. Bereits ein um ein Nukleotid nach 3' oder 5' des JP verschobener Nick hat keinen Einfluss mehr auf das coaxiale Stacking der statischen HJ. Für eine migrierbare HJ mit homologem Kernbereich lässt sich aber postulieren, dass sich der Nick am JP positioniert, was den Einfluss auf das Stacking wiederherstellen sollte und die Junction mit dem Nick am JP fixieren könnte (Pöhler *et al.*, 1994). Dies ist für die Interpretation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten nHJs von Interesse.

1.3 Bekannte HJ-Resolvasen

HJ-Resolvasen gehören zu den strukturspezifischen Endonukleasen, welche, wie der Name schon sagt, spezifische DNA-Strukturen erkennen und durch endonukleolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats auflösen. Dabei wird allgemein angenommen, dass sie das entsprechende Substrat in einer bestimmten Konformation binden oder eine günstige Konformation mit der Bindung erzeugen. Die Art der Auflösung der Zielstrukturen unterscheidet sich genauso wie die Substratspezifitäten. Grob lassen sich die strukturspezifischen Endonukleasen anhand ihrer Aktivitäten an HJs in zwei Arten unterteilen: (1) Resolvasen, welche eine HJ asymmetrisch schneiden und in der Regel andere verzweigte Strukturen gleich oder besser umzusetzen vermögen sowie (2) klassische HJ-Resolvasen, die eine ausgeprägte Präferenz für HJs gegenüber anderen verzweigten Strukturen aufweisen und deren Schnitte absolut punktsymmetrisch zum JP orientiert sind und die somit in sofort religierbaren Produkten resultieren.

Im Folgenden werden die Begriffe „Resolvase“ und „HJ-Resolvase“ ausschließlich für die klassischen HJ-Resolvasen benutzt. Die weiteren Vertreter werden allgemein als strukturspezifische Nukleasen oder HJ-auflösende Enzyme bezeichnet werden.

Nach der Veröffentlichung von Robin Hollidays Genkonversionsmodell vergingen nur wenige Jahre, bis die ersten HJ-Resolvasen aus den Bakteriophagen T7 und T4 isoliert und charakterisiert wurden (siehe Abbildung 1.5, Center und Richardson, 1970; Panayotatos und Wells, 1981; Mizuuchi *et al.*, 1982). Damit stellen die phagencodierten Resolvasen die am längsten untersuchte Gruppe der Resolvasen dar. Das eubakterielle RuvC-Protein aus *Escherichia coli* war die erste bakterielle Resolvase, die charakterisiert wurde, und dient bis heute als Modellenzym der HJ-Resolution, auch wenn inzwischen Zweifel an der vollständigen Übertragbarkeit auf die Eukaryoten bestehen (Schwartz und Heyer, 2011). Bereits vor der Isolierung von EcRuvC waren Resolvaseaktivitäten aus zellfreien Extrakten von Hela-Zellen und den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* bekannt (Waldman und Liskay, 1988; Kleff *et al.*, 1992). Mit der Charakterisierung der ersten archaebakteriellen HJ-Resolvase im Jahr 1999 wurde gezeigt, dass die Fähigkeit HJs über symmetrische Resolution aufzulösen in allen drei Reichen des Lebens vorhanden war, auch wenn die Identität der nukleären eukaryotischen Resolvasen noch lange Jahre im Dunkeln blieb (West, 2009).

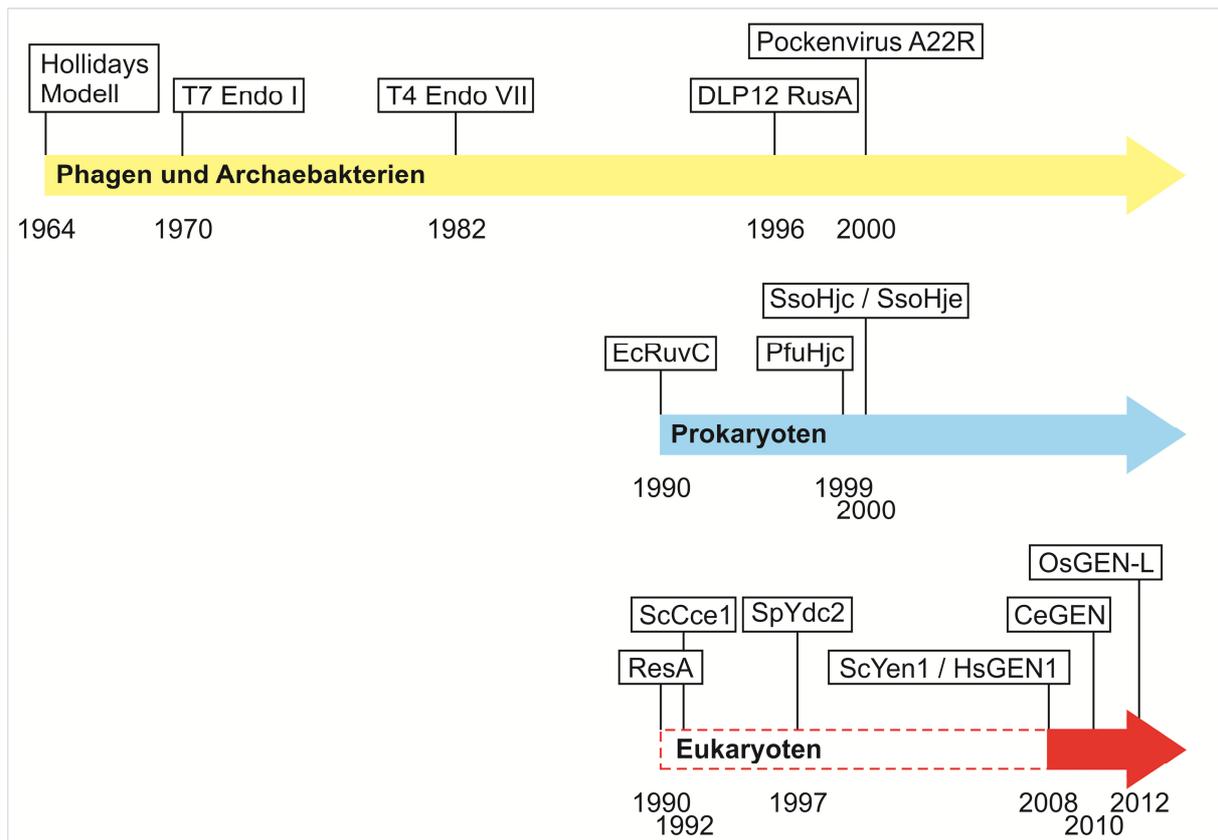


Abbildung 1.5: Entdeckungsgeschichte der HJ-Resolvasen

Bei ScCce1 und SpYdc2 handelt es sich um orthologe HJ-Resolvasen aus den Mitochondrien der Hefen. ResA steht für Resolvaseaktivität A in Säugerzellen, wobei die Identität der verantwortlichen Enzyme lange Zeit unbekannt war.

Vor der Identifizierung der ersten eukaryotischen nukleären Resolvasen waren andere strukturspezifische Endonukleasen bekannt, welche HJs durch asymmetrische Schnitte aufzulösen vermochten. Bei diesen handelte es sich um die in *S. cerevisiae* identifizierten Proteinkomplexe der XPF-Nukleasenfamilie, ScMus81-Mms4 und ScRad1-Rad10 (Habraken *et al.*, 1994; Boddy *et al.*, 2001), sowie den Heterodimer ScSlx1-Slx4 (Mullen *et al.*, 2001; Fricke und Brill, 2003). Jedoch entsprach keine der Aktivitäten dem EcRuvC-Paradigma und der ResA getauften Aktivität mammalischer Kernextrakte.

Inzwischen ist bekannt, dass trotz der funktionellen und mechanistischen Analogien die eukaryotischen HJ-Resolvasen keine Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu den Resolvasen der Prokaryoten und Phagen aufweisen, was die Identifizierung erschwerte. Die bis heute gesammelten *in vitro*-Daten unterstreichen zwar die funktionellen Gemeinsamkeiten der HJ-Resolvasen in allen Reichen des Lebens, zum anderen aber offenbaren sich deutliche Unterschiede in den mechanistischen Details der einzelnen Vertreter, wie zum Beispiel der Gewichtung von Struktur gegenüber Sequenzspezifität (siehe Tabelle 1.1 und Kapitel 1.3.1 bis 1.3.3).

1.3.1 Die HJ-Resolvasen der Prokaryoten und Phagen

Die meisten Resolvasen der Prokaryoten und Phagen lassen sich in eine von zwei strukturellen Klassen einteilen: die Integrase-Familie mit einem aktiven Zentrum, welches der RNaseH ähnelt (Nowotny *et al.*, 2005), und die Endonukleasenfamilie, deren AS des aktiven Zentrums wie bei einer

Typ II Restriktionsendonuklease angeordnet sind. Interessanterweise entspricht diese Verteilung der Resolvasen auf die beiden Nukleasefamilien nicht der Verteilung auf die Reiche (vgl. Tabelle 1.1). Bei allen phagencodierten und prokaryotischen Resolvasen handelt es sich um kleine, als Homodimere aktive, Proteine zwischen 14 und 19 kDa (Osman *et al.*, 2009).

Entdeckt wurden die phagencodierten Resolvasen anhand von Mutanten, welche zwar ihre Wirtsbakterien befallen und ihr Genom von diesen replizieren lassen konnten, die befallenen Zellen jedoch multimere Formen von genomischer Phagen-DNA akkumulierten. Als Voraussetzung für die Auflösung dieser schnell sedimentierenden DNA (*very-fast-sedimenting*, VFS) wurde die Aktivität von Endonukleasen postuliert, wodurch die einzelnen Phagen Genome voneinander getrennt würden (Kemper und Brown, 1976; Kemper und Janz, 1976).

1.3.1.1 Bakteriophagen T4 Endonuklease VII

Die Endonuklease VII (T4 Endo VII) liegt in Lösung in einem Äquilibrium zwischen Monomer und Homodimer vor, wobei das Dimer einem rapiden Austausch an Untereinheiten unterliegt und demnach frei in der Lösung relativ instabil ist (Pöhler *et al.*, 1996; Giraud-Panis und Lilley, 1997). Die Bindung als Homodimer an kreuzförmige DNA-Strukturen ist dagegen hochaffin (Pöhler *et al.*, 1996). Die T4 Endo VII entspricht dem klassischen Modell einer HJ-Resolvase. Sie besitzt eine hohe Spezifität für verzweigte DNA-Strukturen gegenüber anderen möglichen Substraten. Insbesondere Substrate, welche die Struktur einer HJ nachahmen, wie oligonukleotidbasierende 4-Wege-Kreuzungen (statische und mobile) und die plasmidbasierenden HJs durch *inverted repeats*, werden gebunden und endonukleolytisch aufgelöst. Aber auch oligonukleotidbasierende Substrate, die eine Replikationsgabel oder einen D-Loop nachahmen, werden geschnitten, wenn auch mit deutlich geringerer Aktivität (Mizuuchi *et al.*, 1982; Mueller *et al.*, 1988; Benson und West, 1994; Giraud-Panis und Lilley, 1997). Einzel- (ss) oder doppelsträngige (ds) DNA werden von der T4 Endo VII nicht erkannt.

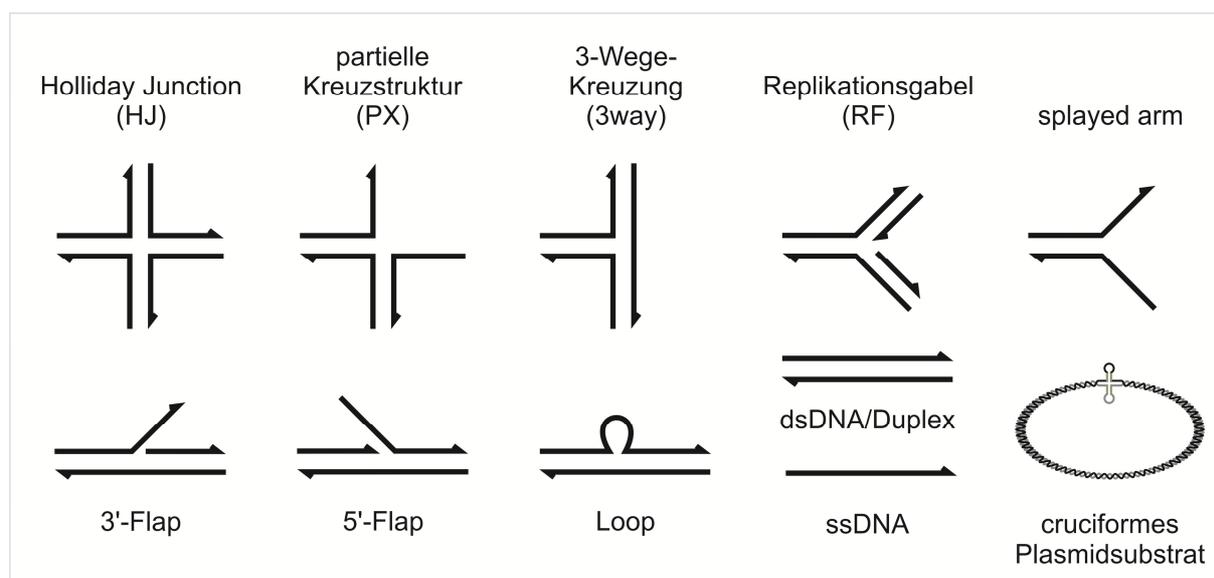


Abbildung 1.6: Substrate für die Charakterisierung der HJ-Resolvasen

Schematische Übersicht über die zur Charakterisierung der HJ-Resolvasen verwendeten Modellsubstrate und ihre entsprechenden Abkürzungen. Halbe Pfeilspitzen symbolisieren das 3'-Ende der Oligonukleotide.

Die Auflösung zu zwei genickten DNA-Duplices erfolgt über zwei Schnitte mit perfekter Symmetrie in gegenüberliegenden DNA-Strängen entgegengesetzter Polarität. Dabei liegen die Schnitte immer 2-4 nt in 3'-Richtung vom JP entfernt (Jensch *et al.*, 1989). Die Enden der Schnittprodukte tragen dabei jeweils ein 5'-Phosphat bzw. ein 3'-OH. Diese können demnach über Ligaseaktivität z.B. der T4 DNA-Ligase ohne weitere Prozessierung zu vollständig intakten Doppelhelices verknüpft werden (Mizuuchi *et al.*, 1982; Giraud-Panis und Lilley, 1997).

Pottmeyer und Kemper postulieren einen Einfluss der Sequenz auf die Auswahl der Schnittposition in mobilen Junctions bzw. die Effizienz der Schnitte an statischen HJs (Pottmeyer und Kemper, 1992). Ähnliches wurde von Picksley *et al.*, 1990 an einer weiteren oligonukleotidbasierenden Junction gezeigt, welche bevorzugt nach Thyminen geschnitten wurde. Andere Untersuchungen zeigten dagegen, dass T4 Endo VII innerhalb des homologen Bereichs einer mobilen HJ ohne Bevorzugung einer bestimmten Sequenz schneidet (Mizuuchi *et al.*, 1982). Im Allgemeinen wird die T4 Endo VII als rein strukturspezifische HJ-Resolvase angesehen (Lilley und White, 2001). Es lässt sich argumentieren, dass die Bevorzugung eines Pyrimidins wie Thymin 3' des Schnittes noch keine Sequenzspezifität darstellt, da der Einfluss der Sequenz nicht auf die direkt an die Schnittposition angrenzenden Basen beschränkt ist. Beispielsweise besitzt EcRuvC eine bevorzugte Consensus-Sequenz, welche die drei Basen 5' und eine Base 3' der geschnittenen Phosphodiesterbindung umfasst (siehe Kapitel 1.3.1.4, Shah *et al.*, 1994). Die Auflösung der Kristallstrukturen mehrerer strukturspezifischer Endonukleasen zeigte auch, dass mehrere Nukleotide die Kontakte zwischen Junction und Resolvase ausmachen, was ebenfalls für den weiteren Sequenzkontext als Einflussfaktor spricht (Biertümpfel *et al.*, 2007; Hadden *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008).

Ein weiterer Aspekt der Resolution ist die Konformation der HJ, in welcher diese an die Resolvase gebunden vorliegt. Vergleichende Elektrophoresen nach paarweisem Restriktionsverdau des DNA-Resolvasekomplexes zeigten, dass die HJ durch die Bindung an die T4 Endo VII in eine beinahe offen planare Konformation gebracht wird (Pöhler *et al.*, 1996). Dabei wird das Stacking zweier diagonal gegenüberliegender Helices, die sich 25° außerhalb der planaren Ebene anordnen, aufgelöst (Biertümpfel *et al.*, 2007). Die aktiven Zentren des Homodimers gelangen so in räumliche Nähe zum Zucker-Phosphat-Rückgrat der kreuzenden Stränge, welche bevorzugt von der T4 Endo VII geschnitten werden (Mueller *et al.*, 1988; Biertümpfel *et al.*, 2007). Damit ist die T4 Endo VII eine Ausnahme unter den HJ-Resolvasen, da alle anderen, bisher in diesem Aspekt charakterisierten Vertreter, bevorzugt die kontinuierlichen Stränge der HJ schneiden (siehe Tabelle 1.1).

1.3.1.2 Bakteriophagen T7 Endonuklease I

Die Endonuklease I des Bakteriophagen T7 ist ein 149 AS kleines Protein mit einer Molekülmasse von 17 kDa (Center und Richardson, 1970; Sadowski, 1971). Es ist involviert in die Auflösung von stark verzweigten Rekombinationsintermediaten, die bei Mutationen des Gens während der Replikation des Phagengenoms akkumulieren (Kerr und Sadowski, 1975; Tsujimoto und Ogawa, 1978). Auch *in vitro* wurde eine deutliche Präferenz für verzweigte DNA-Substrate beschrieben, wobei das Substratspektrum breiter ist als beispielsweise das der T4 Endo VII. Statische oligonukleotidbasierende HJs haben sich gleichberechtigt mit partiellen Kreuzstrukturen aus drei Oligonukleotiden (PX) als die bevorzugten Substrate herausgestellt, dicht gefolgt von mobilen HJs. Schwächer umgesetzt werden 3-Wege-Kreuzungen (*3way junctions*) und am schlechtesten bestimmte *splayed arm* Strukturen (Dickie *et al.*, 1987). Wie für die T4 Endo VII konnte die hohe

Affinität für HJs durch die Stabilität des Enzym-DNA-Komplexes in Anwesenheit eines 1000fachen Überschusses von dsDNA als Kompetitor gezeigt werden (Duckett *et al.*, 1995).

Die Hauptschnittstelle lag unabhängig von der Art der Junction immer ein Nukleotid 5' der Verzweigungsstelle bzw. des Übergangs zwischen Duplex und einzelsträngigen Bereichen. Im Falle der HJ-Substrate erfolgte die Resolution über absolut symmetrische Schnitte zu religierbaren Produkten (Dickie *et al.*, 1987; Picksley *et al.*, 1990). Zwei Gruppen beschrieben eine moderate Sequenzspezifität für die T7 Endo I: Morgan und seine Mitarbeiter zeigten an einer mobilen HJ mit einem 8 nt umfassenden homologen Kernbereich eine Bevorzugung für Schnitte zwischen einem 5'-Adenin und 3'-Cytosin (Dickie *et al.*, 1987), während Picksley *et al.*, 1990 bevorzugte Schnitte zwischen zwei Pyrimidinen zeigten und einen vorläufigen Consensus formulierten (5'-(^C/_T)↓(^C/_T)-3', wobei ↓ die Position des Schnittes symbolisiert). Ein weiterer Nachweis der Sequenzspezifität liegt in der Tatsache, dass *splayed arm*-Substrate je nach den verwendeten Oligonukleotiden, also je nach Sequenz umgesetzt wurden, wie Morgans Gruppe zeigen konnte. Jedoch wurde gleichzeitig für HJ-Substrate gezeigt, dass der Einfluss der Sequenz der Strukturspezifität untergeordnet ist, denn eine statische HJ wurde immer 1 nt 5' des JP geschnitten, selbst wenn direkt daneben die bevorzugte Sequenz (5'-A↓C-3') vorhanden war (Dickie *et al.*, 1987).

Die Auflösung der Kristallstruktur eines Junction-Resolvase-Komplexes zeigte, in welcher Konformation die T7 Endo I eine HJ bindet und schneidet (Hadden *et al.*, 2007). Dabei formen die beiden Proteinmonomere jeweils eine vorwiegend positiv geladene Furche, welche im Homodimer im rechten Winkel zueinander orientiert sind. Die Junction wird über ihre Flanken in diesen Furchen fixiert, wobei die Seite mit dem Charakter der großen Furche der Resolvase zugewandt ist. Das coaxiale Stacking der *stacked X*-Konformation bleibt dabei erhalten, jedoch wird eine der beiden Achsen um 130° gedreht, so dass die Achsen wie die Furchen der Dimeroberfläche einen rechten Winkel bilden (Declais *et al.*, 2003). In dieser Konformation gelangen die Aminosäurereste der aktiven Zentren, welche die nukleolytische Spaltung katalysieren, genau ein Nukleotid 5' des JP an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der beiden kontinuierlichen Stränge.

1.3.1.3 Archaeobakterien: PfuHjc, SsoHjc, SsoHje

Neben den HJ-Resolvasen der Phagen und Viren stellen die Archaeobakterien mit zunächst drei charakterisierten Enzymen aus zwei Arten ein weiteres gut untersuchtes Feld dar.

Bei Hjc (*Holliday junction cleavage*) aus *Pyrococcus furiosus* (PfuHjc) handelt es sich um ein 123 AS kleines Protein, welches in Lösung als Homodimer mit einer Molekülmasse von ca. 28 kDa vorliegt (Komori *et al.*, 1999). Entsprechend den Eigenschaften einer klassischen HJ-Resolvase bindet es an seine Substrate ebenfalls als Homodimer und vermittelt deren Resolution über symmetrisch orientierte, religierbare Schnitte (Komori *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 2000), wobei die Kristallstruktur einen den Restriktionsendonukleasen des Typs II analogen Mechanismus nahelegt (Nishino *et al.*, 2001).

Bevorzugte Substrate für PfuHjc *in vitro* sind sowohl oligonukleotidbasierende statische und mobile HJs, als auch RecA-vermittelte Rekombinationsstrukturen auf Plasmidbasis, welche zur *branch migration* über mehrere Hundert bis Tausend Basenpaare fähig sind (Komori *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 2000). Sehr schlecht werden 3-Wege-Kreuzungen umgesetzt, egal ob sie statisch oder teilweise mobil sind. Ebenso verhält es sich mit Loop-Strukturen, für deren detektierbaren Umsatz eine 10x höhere Proteinkonzentration notwendig ist als für Modell-HJs (Komori *et al.*, 2000). Einzelsträngige

Oligonukleotide, dsDNA, dsDNA mit einem 1 bp Mismatch und splayed arm-Substrate werden nicht umgesetzt.

Die Schnittmusterbestimmung an HJs und (schlecht umgesetzten) 3-Wege-Kreuzungen ergab eine Hauptschnittposition 3 nt 3' des JP, welche von ein bis drei Nebenschnitten begleitet wurde. Haupt- und Nebenschnitte sind dabei absolut symmetrisch (Komori *et al.*, 2000). Die Modellierung einer HJ in *stacked X*-Konformation in das aktive Zentrum der Kristallstruktur von PfuHjc lässt eine Bevorzugung für Schnitte in den kontinuierlichen Armen am wahrscheinlichsten erscheinen (Nishino *et al.*, 2001). Allerdings ermöglichen die experimentellen Daten bisher dazu keine klare Aussage (Komori *et al.*, 2000).

Das Ortholog zu PfuHjc in *Sulfolobus solfataricus*, SsoHjc, schneidet die statische J3 ebenfalls paarweise symmetrisch drei Nukleotide 3' des JP, allerdings erzeugt es keine schwächeren Nebenschnitte (Kvaratskhelia und White, 2000a). Wie für PfuHjc ist unklar, ob eine Bevorzugung der diskontinuierlichen Stränge in der *stacked X*-Konformation vorhanden ist oder nicht. Die Superposition der Tertiärstrukturen von SsoHjc und PfuHjc lässt aber zumindest auf den gleichen Schnittmechanismus schließen (Middleton *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu PfuHjc wurde für SsoHjc jedoch eine potentielle Sequenzspezifität postuliert. Die Autoren schreiben zwar selbst, dass der Probenumfang für eine Aussage zu gering ist. Dennoch ist es auffällig, dass an der getesteten Jbm5, einer mobilen Junction mit 12 nt homologem Kernbereich, nur Sequenzen mit dem Konsensus 5'-TA^(G/T)↓T-3' geschnitten wurde. Bei einer reinen Strukturelektivität wären mehr Schnitte zu erwarten gewesen.

Sulfolobus solfataricus war der erste Organismus, für den das Vorhandensein zweier HJ-Resolvasen beschrieben wurde. Neben SscHjc ist im Genom von *S. solfataricus* die zweite Resolvase SsoHje (*Holliday junction endonuclease*) codiert, deren Genprodukt ein 135 AS kleines Protein von 15,5 kDa ist (Kvaratskhelia und White, 2000b). Ob SsoHjc und SsoHje Paraloge darstellen, ist jedoch fraglich. Middleton *et al.*, 2004 postulieren einen viralen Ursprung von SsoHje, was durch Unterschiede in den *in vitro*-Eigenschaften der beiden Proteine bestärkt wird. SsoHje schneidet die getesteten statischen HJs J1 und J3 immer 2 nt 3' des JP, was ein Nukleotid näher am Überkreuzungspunkt liegt als bei SsoHjc. Die Jbm5 wird von SsoHje an mehreren Positionen im homologen Bereich geschnitten, jedoch ohne erkennbare Sequenzbevorzugung. Im Gegensatz zu den Hjc-Homologen weist SsoHje eine klare Bevorzugung für Schnitte in kontinuierlichen Strängen auf, was sowohl für J1 als auch J3 gezeigt wurde (Kvaratskhelia und White, 2000b). Der Grund für diesen Unterschied mag in der Quartärstruktur der beiden Enzymdimere liegen, die sich in der Anordnung der jeweiligen Untereinheiten zueinander unterscheiden (Middleton *et al.*, 2004).

1.3.1.4 *Escherichia coli* RuvC: Das RuvC-Paradigma

Die möglicherweise bekannteste HJ-Resolvase ist das Genprodukt des Gens *RuvC* aus *Escherichia coli*. Beschrieben wurde es erstmals anhand von *E. coli* Stämmen, welche eine erhöhte Sensitivität gegenüber ultravioletter und ionisierender Strahlung sowie dem DNA-Crosslinker Mitomycin C (MMC) aufwiesen. Die ursprünglich charakterisierten Mutationen betrafen alle drei Gene des *Ruv*-Lokus: *EcRuvA*, *EcRuvB* und *EcRuvC* (Otsuji *et al.*, 1974; Sharples *et al.*, 1990), deren Genprodukte als multimerer Komplex (EcRuvABC-Komplex) während der Rekombination entstehende HJs prozessieren (Übersicht in West, 1997). Dabei fungiert das ss- und dsDNA-Bindeproteine EcRuvA als Rekrutierungsfaktor für EcRuvB, welches eine DNA-Helikaseaktivität besitzt. Zudem bringt EcRuvA die Holliday Junction in eine offen planare Konformation, welche die *branch migration* stark begünstigt,

indem es die vier helikalen Arme in positiv geladenen Kanälen an den Innenseiten zweier Tetramere positioniert. EcRuvB, welches als Motor der *branch migration* fungiert, bildet an zwei gegenüberliegenden Helices neben EcRuvA je einen hexameren Ring, durch dessen zentrale Öffnung die DNA-Doppelhelix geführt wird. Unter ATP-Verbrauch wird diese über die Helikasefunktion von EcRuvB durch die zentrale Öffnung gezogen und so der Überkreuzungspunkt der Junction verschoben.

Die Resolvase EcRuvC interagiert ebenfalls mit diesem Komplex und ist an der Auflösung der Junction nach erfolgter *branch migration* beteiligt. Dabei wird postuliert, dass EcRuvC die Sequenz der Junction nach bevorzugten Schnittstellen absucht, während diese durch den Komplex gefädelt wird. Wird eine geeignete Schnittsequenz (siehe unten) erreicht, löst EcRuvC die Junction durch symmetrisch orientierte, religierbare Schnitte auf (West, 1997).

Die *in vitro* Charakterisierung des 183 AS langen und ca. 19 kDa schweren EcRuvC ergab, dass die Assoziation mit dem RuvAB-Komplex für die Resolvaseaktivität nicht erforderlich ist, sondern dass das in Lösung als Homodimer vorliegende EcRuvC allein verschiedene Modell-HJs auflösen konnte (Connolly *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991; Dunderdale *et al.*, 1994). Dabei besitzt EcRuvC im Gegensatz zu anderen Resolvasen (z.B. T7 Endo I) eine sehr stark ausgeprägte Präferenz für HJ-Strukturen gegenüber anderen verzweigten DNA-Junctions und unverzweigten Substraten, welche nicht umgesetzt werden können (Benson und West, 1994). Auffällig ist, dass hauptsächlich mobile HJs mit homologen Kernbereichen unterschiedlicher Größen als Endonukleasesubstrate geeignet waren, während statische Modell-HJs lediglich mit extrem erniedrigter Effizienz aufgelöst wurden. Mitarbeiter von M. Whitby konnten an einer solchen statischen HJ zeigen, dass die Schnittpositionen, in einem Bereich von einem Nukleotid 5' bis 3' des JP lokalisiert sind (Osman *et al.*, 2009), was sich mit früheren Erkenntnissen an mobilen Junctions deckt (Bennett und West, 1996; Shida *et al.*, 1996; Fogg *et al.*, 1999). Die schlechte Effizienz dieser Schnitte lässt sich leicht über die ausgeprägte Sequenzspezifität von EcRuvC erklären. Zwar bindet das Dimer unabhängig von der Sequenz mit hoher Affinität an HJs, für die endonukleolytische Aktivität ist jedoch das Vorhandensein einer vier Basenpaare umfassenden Sequenz erforderlich, welche der Consensus-Sequenz 5'-(A/T)TT↓(G/C)-3' entsprechen muss. Dies wurde eindrucksvoll von der Gruppe um Stephen C. West gezeigt, welche an einem RecA-vermittelten Rekombinationssubstrat mit einem migrierbaren Bereich von 1 kb 23 Hotspots für die Resolvaseaktivität von EcRuvC detektieren konnten (Shah *et al.*, 1994). Demnach unterscheidet sich EcRuvC deutlich von den in den vorigen Kapiteln beschriebenen HJ-Resolvasen der Phagen und Archaea darin, dass zusätzlich zur Strukturspezifität die Sequenzspezifität einen großen Einfluss auf die Aktivität hat. Shah und Coautoren sehen starke Parallelen zwischen der Typ II Restriktionsendonuklease EcoRV und EcRuvC (Shah *et al.*, 1997). Von EcoRV ist demnach bekannt, dass nur die Basen der vollständigen Erkennungssequenz (5'-GAT↓ATC-3') die zum aktiven Zentrum passende räumliche Struktur aufweisen und somit korrekt mit den katalytischen Aminosäuren interagieren können.

EcRuvC bindet *in vitro* eine HJ weder in ihrer *stacked X*-Konformation noch in ihrer offen planaren Form, auch wenn letztere sich in das aktive Zentrum der Kristallstruktur von EcRuvC modellieren lässt (Ariyoshi *et al.*, 1994). Stattdessen nimmt eine an EcRuvC gebundene HJ eine, der offen planaren Form ähnliche, Konformation ein, wobei die Winkel zwischen den Helixarmen nicht 90° sind: je zwei gegenüberliegende Winkel sind spitz, die anderen beiden sind stumpfe Winkel und damit größer als 90°. Als kontinuierliche Stränge werden jeweils die Stränge angesehen, die einen solchen stumpfen Winkel einschließen. Diese kontinuierlichen Stränge sind diejenigen, welche an den katalytischen

Aminosäuren zu liegen kommen und geschnitten werden, sofern sie eine passende Erkennungssequenz enthalten (Bennett und West, 1995).

1.3.1.4.1 Der Nick-Counternick-Mechanismus am Beispiel von RuvC

Der Nick-Counternick-Mechanismus, in seinen Grundzügen 1992 erstmals von Pottmeyer und Kemper postuliert, steht (1) dafür, dass die endonukleolytischen Schnitte in gegenüberliegenden DNA-Strängen bei der Auflösung einer HJ nicht simultan erfolgen und sich nicht gegenseitig bedingen, also unabhängig voneinander sind. Stattdessen folgt dem ersten Schnitt in einem Strang der HJ (Nick) ein zweiter, gegenüberliegender Schnitt (Counternick) katalysiert durch das zweite aktive Zentrum des Homodimers. Um jedoch im Kontext einer beweglichen, migrierenden HJ in der Zelle eine produktive Resolution zu ligierbaren Produkten zu ermöglichen, müssen Nick und Counternick zeitlich dicht aufeinanderfolgen. Deshalb beinhaltet der Nick-Counternick-Mechanismus (2) zusätzlich eine deutliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit des Counternick als Folge des ersten Schnittes. Die Erkenntnisse, die diesem Modell zugrunde liegen, sollen hier dargestellt werden, gefolgt von einer Diskussion warum die postulierte Unabhängigkeit der Schnitte im Nick-Counternick-Mechanismus nicht absolute Gültigkeit besitzt, sondern die Vorgänge an der HJ deutlich komplexer sind.

Der Befund, dass die Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 eine statische HJ mit unterschiedlichen Effizienzen und Schnittpositionen in den vier Oligonukleotiden schnitt, führte Pottmeyer und Kemper dazu, die Unabhängigkeit der Schnitte anzunehmen (Pottmeyer und Kemper, 1992). Nachfolgende Untersuchungen mit EcRuvC unterstützten diese Annahme. So wurde gezeigt, dass eine HJ, deren optimale Erkennungssequenz für EcRuvC mit einem nicht hydrolysierbaren 3'-S-Phosphorothiolat zwischen dem Thymin und Guanin blockiert wurde, von EcRuvC im gegenüberliegenden, unmodifizierten Strang genickt werden konnte, wenn auch mit deutlich schlechterer Effizienz. Dabei blieb die Bindungsaffinität durch die Modifikation unverändert (Fogg und Lilley, 2000). Weiterhin lösten Heterodimere aus EcRuvC und nukleasedefizientem EcRuvC D7A eine plasmidbasierende HJ aus palindromischen Sequenzen, welche die optimale Erkennungssequenz am Junction Point aufwiesen, zu genickten Produkten auf. Identische Daten wurden für ScCce1 veröffentlicht (Fogg *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse können und wurden so interpretiert, dass für einen Nick in einem der beiden aufzulösenden Stränge der Counternick nicht notwendig ist, also beide Schnittereignisse unabhängig voneinander erfolgen können.

Der zweite Aspekt des Nick-Counternick-Mechanismus, die beschleunigte Reaktion des Counternicks, wurde unter anderem mit oligonukleotidbasierenden Modell-HJs, die in einem Strang bereits einen Nick aufwiesen, gezeigt. EcRuvC setzt eine solche genickte HJ 8x schneller um als die entsprechende intakte HJ, während der aktive Schnitt durch EcRuvC in der optimalen Consensus-Sequenz die Schnitteffizienz einer gegenüberliegenden suboptimalen Erkennungssequenz um den Faktor 500 erhöhte (Fogg und Lilley, 2000). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für die strukturspezifische Nuklease SpMus81-Eme1, welche intakte HJs nur schlecht oder gar nicht umsetzen kann, eine genickte HJ jedoch das bevorzugte Substrat darstellt (Osman *et al.*, 2003). Die Grundlage für die Beschleunigung des Schnitts gegenüber einem bereits existierenden Nick (enzymatischen oder artifiziellen Ursprungs) liegt in der erhöhten Flexibilität einer genickten HJ gegenüber einer intakten HJ. Die Modellierung des HsMUS81-EME1-Heterodimers mit einer genickten HJ bietet eine elegante Erklärung für den Effekt der erhöhten Flexibilität auf die Schnitteffizienz des Counternick. Die dreidimensionale Struktur des HsMus81-Eme1-Heterodimers lässt keine Modellierung einer intakten gestackten oder

offen planaren HJ zu, welche die geschnittenen Positionen des Zucker-Phosphat-Rückgrats in die Nähe des aktiven Zentrums bringen würde. Über Austausch einzelner Aminosäuren und die Auflösung der Kristallstruktur von HsMUS81-EME1 wurde gezeigt, dass oberhalb der positiv geladenen Furche, an deren Grund das aktive Zentrum der katalytischen Untereinheit HsMUS81 liegt, weitere basische Aminosäure lokalisiert sind, welche für die effiziente Auflösung genickter HJs essentiell sind. Ist die sterische Fixierung durch einen Nick in einem der kontinuierlichen Stränge vermindert, kann die genickte HJ über Kontakte mit diesen basischen Aminosäuren an der Oberfläche von HsMUS81 dahingehend verformt werden, dass der kontinuierliche Strang mit seinen bevorzugten Schnittpositionen genau mit dem aktiven Zentrum in Deckung gebracht wird (Chang *et al.*, 2008).

Für EcRuvC könnte ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle spielen, da es die Junction durch die Bindung stark verformt. Darüber hinaus hat ein weiterer Faktor einen starken Einfluss auf die Induktion der Schnitteffizienz des Counternicks. Wie bereits erwähnt, führt ein Nick in einem Strang einer Modell-HJ zu einer achtfachen Steigerung der Aktivität, während die optimale Erkennungssequenz die Schnitteffizienz einer suboptimalen um den Faktor 500 erhöhen kann. Dieser massive Unterschied in den Induktionsraten lässt sich über die Entstehung des Nicks, bzw. dessen 5'-Endes erklären. Die von J. M. Fogg und D. M. J. Lilley für die genickte HJ verwendeten Oligonukleotide wiesen bis auf den radioaktiv markierten Strang eine 5'-Hydroxylgruppe auf, während die endonukleolytische Spaltung durch EcRuvC ein 3'-OH und ein 5'-Phosphat zurücklässt (Iwasaki *et al.*, 1991; Dunderdale *et al.*, 1994). Kürzlich wurde für EcRuvC gezeigt, dass eine genickte HJ mit einem 5'-Phosphat im Nick 50x besser umgesetzt wird als die identische nHJ mit einem 5'-OH (Osman *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die strukturspezifische Endonuklease SpMUS81-EME1 nicht zwischen einem Nick mit und einem Nick ohne 5'-Phosphat, was die Autoren so interpretieren, dass die erhöhte sterische Flexibilität der Junction durch die Unterbrechung eines Stranges ausreicht um eine Induktion der Schnittgeschwindigkeit zu erreichen (Osman *et al.*, 2009).

Nicht nur für die klassischen HJ-Resolvasen sondern auch andere HJ-auflösende Enzyme scheinen somit die Kriterien des Nick-Counternick-Mechanismus erfüllt und erklärt zu sein. Jedoch liefern die gleichen Arbeiten, die diese Kriterien untermauern, auch Ergebnisse, welche zusammen mit weiteren Erkenntnissen die Gültigkeit des Mechanismus in seiner ursprünglichen Form fraglich erscheinen lassen.

Es lässt sich argumentieren, dass die bilateralen Schnitte an HJs nicht vollständig unabhängig voneinander stattfinden. Wären die beiden Schnitte völlig unabhängig, so dürfte das Vorhandensein einer schlecht geschnittenen Erkennungssequenz von EcRuvC in einem Arm einer HJ nicht die Schnitteffizienz der optimalen Erkennungssequenz im gegenüberliegenden Arm beeinflussen, wie aber von Shah *et al.*, 1997 und Fogg und Lilley, 2000 gezeigt. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die überraschende Asymmetrie in den aktiven Zentren des RuvC-Dimers aus dem gramnegativen Eubakterium *Thermus thermophilus*. Die Kristallstruktur des TthRuvC-Homodimers offenbart zwei mögliche Konformationen des Monomers, welche sich in der asymmetrischen Ausrichtung dreier aromatischer Aminosäuren innerhalb eines flexiblen Loops in der Nähe der des aktiven Zentrums unterscheiden (Chen *et al.*, 2013). Gezielte Austausche dieser aromatischen AS führten zu deutlichen Veränderungen im Umsatz einer Modell-HJ. Zudem ergab die Modellierung einer HJ-Bindung, dass nur eines der beiden Protein-Konformere eine Positionierung des kontinuierlichen Strangs der Junction im aktiven Zentrum zulassen würde. Somit ist es möglich, dass immer nur eines der beiden

Monomere in der für den Schnitt notwendigen Konformation vorliegt und das Nicking eine Konformationsänderung beider Monomere und der DNA nach sich zieht.

Zusammengenommen lässt die aktuelle Datenlage ein Schnittmodell möglich erscheinen, in dem die bilateralen Schnitte weder sich gegenseitig bedingend simultan erfolgen noch völlig unabhängig voneinander sind (Chen *et al.*, 2013).

Tabelle 1.1: Übersicht der HJ-Resolvasen

nd = nicht bestimmt, kon. = kontinuierlicher Strang wird geschnitten, dis. = kreuzender (diskontinuierlicher) Strang wird geschnitten, Substratspezifität: **starke/deutliche Aktivität**, moderate Aktivität, (schwache Aktivität); ¹Sequenzspezifität: ++ = stark, (+) = schwach, ²SsoHjc schneiden an der J1 den kontinuierlichen, an der J3 den kreuzenden Strang, ³SsoHjc zeigt eine schwache Sequenzspezifität, PfuHjc schneidet dagegen sequenzunabhängig

Name	Organismus	Substrat-spezifität	Konfor-mation (HJ)	geschnit-ter Strang (HJ)	Sequenzspezifität	
					¹	Konsensus
Nuklease-Superfamilie: Typ II Restriktionsendonukleasen						
Endonuklease I	Bakteriophage T7	HJ, PX , 3fach-Junction, (splayed arm)	coaxial 90°	kon.	(+)	5'-(C/T)↓(C/T)-3'
Hjc	<i>P. furiosus</i> , <i>S. solfataricus</i>	HJ , (3fach-Junction, Loop)	stacked X	kon./ dis. ²	(+) Sso ³	5'-TA(G/T)↓T
Hje	<i>S. solfataricus</i>	HJ , (3fach Junction mit bulge)	offenes X	kon.	(+)	nd
Integrase-Superfamilie: RNaseH						
RuvC	<i>E. coli</i>	mobile HJ , (statische HJ)	offenes X	kon.	++	5'-(A/T)TT↓(G/C)-3'
A22R	Vaccinia Virus	HJ, 3way	nd	nd	(+)	5'-(G/C)↓(T/A)-3'
Ydc2	<i>S. pombe</i>	HJ	offen planar	kon.	++	5'-T↓-3'
Cce1	<i>S. cerevisiae</i>	HJ	offen planar	kon.	++	5'-CT↓-3'
Klasse 4 der Rad2/XPG-Nukleasefamilie						
GEN1	<i>H. sapiens</i>	HJ , 5'-Flap, RF	nd	kon.	(+)	nd
Yen1	<i>S. cerevisiae</i>	HJ	nd	nd	(+)	nd
GEN-1	<i>C. elegans</i>	HJ	nd	nd	(+)	nd
GEN-L	<i>O. sativa</i>	HJ , 5'-Flap, RF	nd	nd	nd	nd
keine Zuordnung						
Endonuklease VII	Bakteriophage T4	HJ , RF, D-Loop	offenes X, verzerrt	dis.	(+)	-
Rus A	lambdoider Prophage DLP12	HJ	flexibel	kon.	++	↓CC-3'

1.3.2 Eukaryotische HJ-Resolvasen

Im Gegensatz zu den ausführlich charakterisierten HJ-Resolvasen der Phagen und Prokaryoten, ist über die eukaryotischen Vertreter dieser Enzymklasse verhältnismäßig wenig bekannt. Dies liegt zum einen an der späten Identifizierung der für die Resolvaseaktivität eukaryotischer Zellextrakte verantwortlichen Proteine, zum anderen am deutlich breiteren Spektrum strukturspezifischer

Endonukleasen im eukaryotischen System. Während die Resolvasen entsprechend dem RuvC-Paradigma in Prokaryoten und Phagen die universellen HJ-auflösenden Enzyme darzustellen scheinen, ist die Situation in Eukaryoten mit verschiedenen strukturspezifischen Endonukleasen ungleich komplexer (Andersen *et al.*, 2011; Muñoz-Galván *et al.*, 2012; Zakharyevich *et al.*, 2012).

Die späte Identifizierung der klassischen Resolvasen der Eukaryoten ist in der fehlenden Homologie zu den Phagen und Prokaryoten auf Sequenzebene zu begründet. Offensichtlich handelt es sich bei der Evolution der Resolvasen nicht um eine von einem gemeinsamen Vorfahren ausgehende Entwicklung, sondern um eine, in den verschiedenen Reichen des Lebens unabhängige konvergierende Evolution. Diese führte zu spezialisierten Proteinen, welche sich zwar auf Sequenzebene nicht gleichen, jedoch auffallend ähnliche funktionelle und strukturelle Eigenschaften besitzen und einen in seinen Grundzügen universellen Mechanismus zur Auflösung HJ-ähnlicher Strukturen darstellen (Rass *et al.*, 2010).

1.3.2.1 Charakterisierung strukturspezifischer Endonukleasen in Hefe

Das Heterodimer SpMus81-Eme1 war die erste nukleäre Endonuklease, für die eine HJ-auflösende Aktivität beschrieben wurde (Boddy *et al.*, 2001). Die in allen Eukaryoten und Archaea konservierten Untereinheiten des Dimers werden anhand ihrer Domänenstruktur der ERCC4/XPF-Nukleasefamilie, deren Mitglieder an der NER beteiligt sind, zugeordnet. SpMus81 und SpEme1 besitzen eine zentrale, im Fall von SpEme1 nukleolytisch inaktive, ERCC4-Domäne, sowie zwei C-terminale *Helix-hairpin-Helix* Domänen (HhH2). Bevorzugte Substrate von SpMus81-Eme1 sind jedoch nicht vollständige HJs, sondern vor allem frühe Rekombinationsintermediate wie D-Loops und unligierte genickte HJs (Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2007). Diese werden durch Schnitte zwischen drei und neun Nukleotiden 5' des JP bzw. des Nicks aufgelöst. Vollständige HJs werden analog über asymmetrisch orientierte Nicks und Counternicks zu Produkten aufgelöst, die Einzelstranglücken (Gaps) bzw. Einzelstrangüberhänge (Flaps) aufweisen und somit nicht direkt religierbar sind. Somit entsprechen die Eigenschaften des MUS81-EME1-Komplexes nicht denen einer klassischen Resolvase.

Das Heterodimer ScSlx1-Slx4 ist eine weitere strukturspezifische Endonuklease, welcher eine Funktion in der Auflösung intermediärer Strukturen der DNA-Rekombination zugeschrieben wurde. Interessanterweise wurde ScSlx1 und ScSlx4 über ein Screening nach Mutationen, welche in Abwesenheit der RecQ-Helikase ScSgs1 zu synthetischer Letalität führten, identifiziert, in welchem ebenfalls ScMus81 und ScMms4, die *S. cerevisiae* Orthologe zu SpMus81-Eme1, beschrieben wurden (Mullen *et al.*, 2001). Ursprünglich wurden die Slx1-Slx4-Homologe aus Hefe als 5'-Flap-Endonuklease beschrieben (Fricke und Brill, 2003; Coulon *et al.*, 2004) und erst kürzlich reihten sie sich in die HJ-auflösenden Enzyme ein, als für HsSLX1-SLX4 gezeigt wurde, dass es eine mobile Modell-HJ mit 12 bp Kernbereich durch symmetrische, religierbare Schnitte aufzulösen vermochte (Fekairi *et al.*, 2009).

In *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurden die Resolvasen ScCce1 und SpYdc2 (auch SpCce1 genannt) beschrieben. Es handelt sich dabei um kerncodierte, jedoch in den Mitochondrien aktive Proteine (Symington und Kolodner, 1985; Kleff *et al.*, 1992; Ezekiel und Zassenhaus, 1993; White und Lilley, 1997b). Entsprechend zeigen *Scce1Δ*-Zellen keine Defekte in der mitotischen oder meiotischen Rekombination, stattdessen jedoch einen Wachstumsphänotyp von fragil wirkenden Zellen und die Akkumulation nicht aufgelöster Rekombinationsintermediate in ihren Mitochondrien (Kleff *et al.*, 1992; Lockshon *et al.*, 1995; Doe *et al.*, 2000).

Das aktive Zentrum der mitochondriellen Hefe-Resolvasen zeigt deutliche Ähnlichkeiten zum eubakteriellen Musterbeispiel, weshalb SpYdc2 und ScCce1 in der Integrase-Superfamilie eingeordnet werden. Ihre *in vitro*-Eigenschaften weisen weitere deutliche Parallelen zum EcRuvC-Musterbeispiel auf. Sie liegen in Lösung bevorzugt als Dimer vor, können jedoch Untereinheiten dynamisch austauschen und weisen, im Gegensatz zur T7 Endo I, eine sehr hohe Strukturspezifität für HJs auf (White und Lilley, 1996; Whitby und Dixon, 1997; White und Lilley, 1997b; Oram *et al.*, 1998). SpYdc2 besitzt zwar eine recht breite Bindungsaffinität für verzweigte und unverzweigte DNA-Substrate (3-Wege-Kreuzungen, 5'-Flaps, *splayed arm*, genickter und vollständiger Duplex, 5'-Überhänge), ist jedoch unter annähernd physiologischen Bedingungen nur an HJs nukleolytisch aktiv (Whitby und Dixon, 1998). Die bilateralen Schnitte erfolgen innerhalb der Lebenszeit eines Substrat-Enzym-Komplexes in sequentieller Manier (Fogg *et al.*, 2000). In Analogie zu EcRuvC weisen ScCce1 und SpYdc2 eine starke Sequenzspezifität für die Dinukleotidsequenz 5'-CT↓-3' auf, welche ähnlich stringent wirkt wie bei EcRuvC (White und Lilley, 1996; White und Lilley, 1997b; Oram *et al.*, 1998; Schofield *et al.*, 1998). Die Bindung einer HJ über die Seite der kleinen Furche an SpYdc2 bringt die Junction in eine offen planare Konformation mit 4zähliger Symmetrie und zu den Ecken eines Quadrates ausgerichteten Helices (Ceschini *et al.*, 2001). Zudem wird die Paarung der beiden am nächsten am JP liegenden Basenpaare aller vier Armen gelöst (Declais und Lilley, 2000). Eine Unterscheidung von kontinuierlichen und kreuzenden Strängen ist in dieser Konformation schwierig, dennoch zeigen ScCce1 und SpYdc2 eine Bevorzugung für Schnitte am oder ein Nukleotid um den JP im kontinuierlichen Strang (White und Lilley, 1997a; White und Lilley, 1998; Declais und Lilley, 2000). Interessant ist auch, dass das Dimer von SpYdc2 in zwei unterschiedlichen Konformeren der Untereinheiten kristallisiert wurde. Dabei legen die Unterschiede in der Ausrichtung von Aminosäureseitenketten, die an der Koordination zweiwertiger Metallionen beteiligt sind, das Vorhandensein einer katalytisch aktiven und einer katalytisch inaktiven Untereinheit in einem Dimer nahe (vergleiche TthRuvC im Kapitel 1.3.1.4.1, Ceschini *et al.*, 2001).

Die Rolle mitochondrieller HJ-Resolvasen im Menschen ist nicht oder kaum untersucht, obwohl die möglichen Folgen von Aktivitätsverlusten, namentlich Mutationen und Deletionen im mitochondriellen Genom, in Krankheiten eine Rolle spielen und als ein Mechanismus der Alterung vermutet werden (Wallace, 1992; Tuppen *et al.*, 2010).

Die Suche nach den eukaryotischen HJ-Resolvasen führte zur Entdeckung HJ-auflösender Aktivitäten in zellfreien Extrakten von HeLa-Zellen, Zellen der humanen Plazenta und des Kalbsthymus, wobei für letztere bereits zum Zeitpunkt ihrer Beschreibung grundlegende Charakteristiken einer Resolvase bestätigt werden konnten (Jeyaseelan und Shanmugam, 1988; Waldman und Liskay, 1988; Elborough und West, 1990). Die weiterführende Charakterisierung nach verbesserter fraktionierender Aufreinigung offenbarte eine enge Substratspezifität. Lediglich HJs wurden von den aufgereinigten Fraktionen zu religierbaren Produkten umgesetzt, während an Strukturen, welche der T4 Endo VII als Substrat dienen können, keinerlei Aktivität beobachtet wurde (Hyde *et al.*, 1994). Da jedoch das verantwortliche Enzym für diese Aktivität verborgen blieb, wurde sie in der Literatur durch Resolvase A (ResA) beschrieben. Mit der Identifikation von ScYen1 und HsGEN1, wurde nicht nur das Rätsel um die ResA-Aktivität gelöst, sondern es zeigte sich auch, dass die eukaryotischen HJ-Resolvasen zu einer größeren, bereits bekannten Familie von Nukleasen gehören.

1.3.2.2 Die Rad2/XPG-Familie der Nukleasen

Die Rad2/XPG-Nukleasefamilie¹ der Eukaryoten umfasst monomere, strukturspezifische Endo- und Exonukleasen, welche anhand ihrer Struktur und Funktionen in vier Unterklassen eingeteilt werden (Abbildung 1.7). Allen gemeinsam ist der generelle Domänenaufbau und die Fähigkeit 5'-Flap-Substrate zu prozessieren (Harrington und Lieber, 1994; Lee und Wilson, 1999; Hohl *et al.*, 2003). Dabei weisen alle Vertreter der Familie im Bereich der N-terminal lokalisierten funktionellen Domänen einen hohen Grad an Konservierung auf Ebene der Primärstruktur auf, was insbesondere die für die nukleolytische Aktivität essentiellen sauren und aromatischen AS betrifft (Tabelle 4.1). Der C-terminale Bereich ist deutlich schlechter konserviert, teilt aber zwischen allen Vertretern der Familie seinen ungeordneten Charakter, welcher auf eine hohe strukturelle Flexibilität schließen lässt (Wright und Dyson, 1999).

1.3.2.2.1 Exo- und Endonukleasen: Die Klassen 1 bis 3 der Rad2/XPG-Familie

Klasse 1: Endonukleasen der Nukleotidexzisionsreparatur

Die Klasse 1 umfasst mit den Homologen zu ScRad2 und HsXPG die namensgebenden Endonukleasen der Nukleotidexzisionsreparatur, welche das 3'-Ende von DNA-Bubble-Strukturen in Folge einer 5'-Incision schneiden. Mutationen in HsXPG gehören zu den Ursachen der Erbkrankheit *Xeroderma pigmentosum*, welche durch einen zellulären Defekt in der Reparatur von UV-Schäden gekennzeichnet ist (Schärer, 2008). Die ScRad2-Homologe sind die größten Vertreter der Rad2/XPG-Familie und weisen als einzige der vier Klassen eine vom Rest abweichende Anordnung der funktionellen Domänen auf (Abbildung 1.7). Die ersten ungefähr 100 AS bilden die N-terminale XPG-Domäne (XPG-N), welche zusammen mit der internen XPG-Domäne (XPG-I) die Nukleasedomäne bildet. Beide Domänen sind durch einen langen Spacerbereich von ungefähr 600 AS getrennt, der eine Rolle in der Substraterkennung und in der Interaktion mit weiteren Faktoren der NER spielt (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005). Die Position der dritten konservierten Domäne, der in der sequenzunabhängigen DNA-Bindung involvierten *helix-hairpin-helix*-Domäne (HhH2), ist in allen Vertretern der Rad2/XPG-Familie konserviert: Sie schließt fast direkt C-terminal an die XPG-I-Domäne an.

Klasse 2: replikative Flap-Endonukleasen

Die Proteine der Klasse 2 schneiden bevorzugt 5'-Flap-Substrate und heißen entsprechend FEN1 (*flap endonuclease and five prime exonuclease*). Es handelt sich bei ihnen, verglichen mit den anderen Familienmitgliedern, um mittelgroße Proteine. Wie die Benennung bereits aussagt, besitzen die FEN1-Orthologe eine strukturspezifische Endonukleaseaktivität für 5'-Flap-Substrate (und schwächer für *splayed arm*). Die ebenfalls vermutete 5'-3'-Exonukleaseaktivität, welche ursprünglich an Duplex-DNA mit Gaps, Nicks und 3'-Überhängen beobachtet wurde, entspricht aller Wahrscheinlichkeit der 5'-Endonukleasefunktion, welche durch Atmung am ssDNA/dsDNA-Übergang stimuliert wird (Lieber, 1997). *In vivo* entfernt FEN1 die Okazaki-Fragmente während der Replikation durch hochspezifische, sequenzunabhängige Schnitte genau ein Nukleotid 3' des ssDNA/dsDNA-Übergangs, also des JP.

¹ Rad2 bezieht sich auf ScRad2 aus *S. cerevisiae*, das Ortholog zu HsXPG, nicht zu verwechseln mit SpRad2, welches das Ortholog zu HsFEN1 bzw. ScRad27 ist.

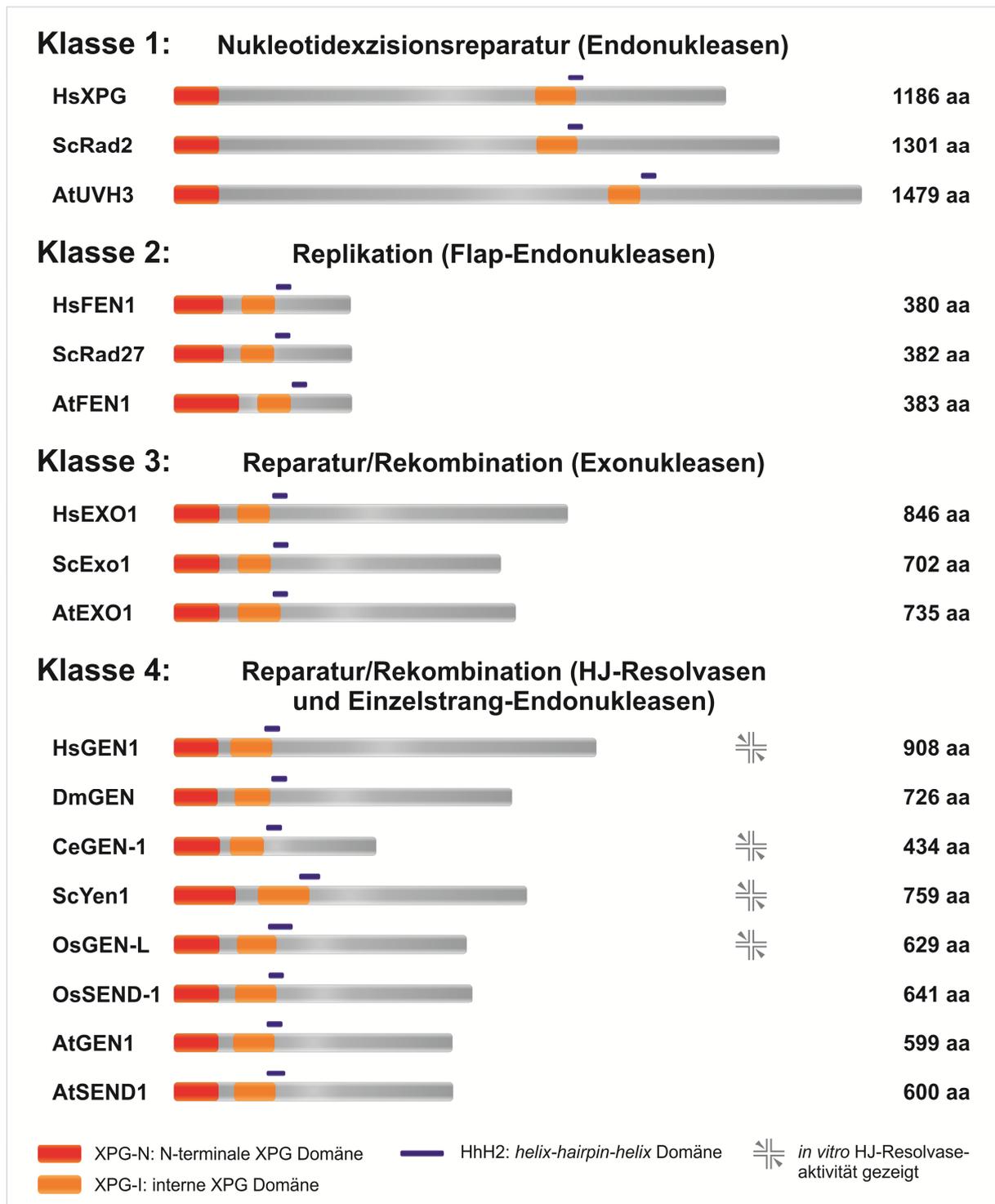


Abbildung 1.7: Die Rad2/XPG-Nukleasefamilie

Gezeigt sind exemplarisch Vertreter der Rad2/XPG-Nukleasefamilie der Säuger (Hs), Pilze (Sc) und höheren Pflanzen (At). Ihre Gesamtlänge unterscheidet sich teilweise deutlich: XPG-Homologe sind gut vier Mal länger als die FEN1-Homologe der Klasse 2, während die Klassen 3 und 4 gut halb so lang sind. Die am besten konservierten Bereiche sind die funktionellen Domänen, welche die nukleolytische Aktivität (XPG-N und XPG-I) und die DNA-Bindung (HhH2) vermitteln. Auffällig ist, dass in den Klassen 2 bis 4 diese drei Domänen alle nahe dem N-Terminus gruppiert sind, während die N-terminale XPG Domäne der XPG-Homologe der Klasse 1 durch einen langen Spacerbereich von den eher C-terminal lokalisierten XPG-I und HhH2 Domänen getrennt ist. Für die die HJ-Resolvasen beinhaltende Klasse 4 sind alle bisher näher charakterisierten Vertreter gezeigt. Homologe, für die eine *in vitro* HJ-Resolvaseaktivitäten beschrieben wurde, sind durch eine kleine HJ-Struktur gekennzeichnet.

Dabei wird zuerst die Paarung des terminalen Nukleotids am benachbarten 3'-Ende gelöst, was mit der entstandenen Lücke von einem Nukleotid nach Abspaltung des 5'-Überhangs einen sofort ligierbaren, genickten Duplex erzeugt (Tsutakawa *et al.*, 2011). Tatsächlich erhöht das Vorhandensein eines 3'-Überhangs von exakt einem Nukleotid am JP die *in vitro* Aktivität von HsFEN1 um das 33fache (Finger *et al.*, 2009). Das Wissen über den FEN1-Schnittmechanismus beschränkt sich nicht nur auf seine biochemischen Eigenschaften. Die Rollen einzelner konservierter AS im aktiven Zentrum in Hinblick auf Substratbindung, Koordination von Metallionen und katalytische Aktivität sind aufgeklärt (Shen *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004) und durch hochauflösende Kristallstrukturen verschiedener Enzym-DNA-Komplexe ist es in den letzten beiden Jahren gelungen, die genauen Abläufe von Substraterkennung, -bindung und Katalyse mit eindrucksvoller Genauigkeit aufzuklären (Tsutakawa *et al.*, 2011; Tsutakawa und Tainer, 2012). Dies macht FEN1 zu einem idealen Prototypen für ein klassenübergreifendes Modell des Schnittmechanismus (Grasby *et al.*, 2012) und unterstreicht gleichzeitig die prominente Rolle, welche die Rad2/XPG-Familie in der Ergründung des eukaryotischen DNA-Metabolismus spielt. Somit erscheint es auch wenig verwunderlich, dass auch von der FEN1-Superfamilie gesprochen wird, anstelle von der Rad2/XPG-Familie.

Klasse 3: Exonukleasen der Rekombination und Reparatur

Die Proteine der Klasse 3 unterscheiden sich von den anderen drei Klassen dadurch, dass es sich um 5'-3' Exonukleasen (EXO1, *exodeoxyribonuclease 1/exonuclease 1*) statt Endonukleasen handelt. Ihr Domänenaufbau entspricht jedoch dem der Klasse 2 und 4. Obwohl endo- und exonukleolytische Spaltung zwei unterschiedliche Mechanismen nahe legen, weisen die Homologie der funktionellen Domänen und Aminosäuren sowie damit verbundene Parallelen in der Bindung und Modifikation der Substrate auf einen äquivalenten Mechanismus hin (Orans *et al.*, 2011). Dabei „franst“ das 5'-Ende eines Gaps im DNA-Duplex, dem natürlichen Substrat der EXO1 in der MMR, aus, d.h. die beiden terminalen Basenpaarungen werden unterbrochen und ähneln so einem kurzen 5'-Flap. Der gleiche Vorgang wurde bei HsFEN1 beobachtet (Tsutakawa *et al.*, 2011). EXO1 ist die primäre Exonuklease der MMR in Säugern und interagiert im Rahmen dessen mit den MMR-Faktoren MutL α (MLH1-PMS2), MutS α (MSH2-MSH6) und MutS β (MSH2-MSH6) (Nielsen *et al.*, 2004) und spielt eine essentielle Rolle bei der Endresektion in der DSB-Reparatur (Kapitel 1.1, Symington und Gautier, 2011). Zudem wurde vor kurzem eine weitere Rolle in der HR gezeigt: ScExo1 besitzt eine von seiner Exonukleaseaktivität unabhängige Funktion in der Förderung von Crossovers in Kooperation mit MutLy unter Kontrolle von ScSgs1 (dem HsBLM-Ortholog) (Zakharyevich *et al.*, 2012).

Zusammengefasst betrachtet ist ersichtlich, dass mit der Fähigkeit zu Erkennung eines JP und der Spaltung nahe diesem eine Voraussetzung für die Auflösung komplexerer DNA-Strukturen in der Rad2/XPG-Familie konserviert ist. Jedoch sind die Enzyme der Klassen 1 bis 3 als Monomere aktiv. Um jedoch Holliday Junctions nach Resolvasemanier zu prozessieren sind zwei aktive Zentren zur gleichen Zeit am Substrat erforderlich. Die Fähigkeit zur spezifischen Dimerisierung an der DNA ist die zweite Grundvoraussetzung und laut den Erkenntnissen der letzten Jahre ein charakteristisches Merkmal der Enzyme der Rad2/XPG-Klasse 4 (Rass *et al.*, 2010).

1.3.2.2.2 HJ-Resolvasen: Klasse 4 der Rad2/XPG-Familie

Die Klasse 4 wurde ursprünglich für ein Protein der höheren Pflanzen gegründet. *Oryza sativa Single-strand DNA ENDonuclease 1* (OsSEND-1) war der erste Vertreter dieser neuen Unterklasse der

Rad2/XPG-Familie (Furukawa *et al.*, 2003). Es wies die gleiche generelle Domänenorganisation wie die FEN1- und EXO1-Homologe auf, die Homologie auf Aminosäureebene, vor allem der konservierten Domänen, war jedoch näher an den Domänen der Klasse 1. OsSEND-1 wird vornehmlich in teilungsaktiven Geweben wie dem Sprossapikalmeristem und jungen Blättern exprimiert und seine Expression lässt sich durch Methylmethansulfonat (MMS) und UV-Bestrahlung induzieren. Ein aufgereinigtes Fragment bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 425, besaß eine endonukleolytische Aktivität für einzelsträngige zirkuläre M13mp18-DNA, während doppelsträngiges Plasmid nicht geschnitten wurde (Furukawa *et al.*, 2003).

DmGEN (*XPG-like endonuclease*) ist das zweite Enzym, welches der Klasse 4 zugeordnet wurde, wiederum anhand von Homologien der Primär- und Domänenstruktur (Ishikawa *et al.*, 2004). Die Charakterisierung *in vitro* ergab an einem breiten Substratsspektrum eine nukleolytische Aktivität, welche einer erweiterten FEN1-Aktivität entspricht: 5'-Flaps wurden analog zu FEN1 umgesetzt, darüber hinaus wurden verschiedene geblockte Flapsubstrate und Replikationsgabeln mit Gaps umgesetzt. Eine Modell-HJ wurde nicht als Substrat erkannt (Kanai *et al.*, 2007).

Die Gruppe von S. C. West publizierte 2008 ihre erfolgreiche Identifizierung der ersten nukleären HJ-Resolvasen aus Säugerzellen und Hefe, die nicht wie ScCce1 und SpYdc2 in den Mitochondrien lokalisiert sind: HsGEN1 und ScYen1 (Ip *et al.*, 2008). Beide Proteine zeigten deutliche Homologie zu allen Vertretern der Rad2/XPG-Familie, die deutlichste jedoch zu OsSEND-1 und DmGEN1 was die eukaryotischen Resolvasen als Mitglieder der Klasse 4 der Rad2/XPG-Nukleasen kennzeichnet. Beide Enzyme liegen in Lösung als Monomere vor, schneiden jedoch neben den familientypischen 5'-Flap-Substraten spezifisch HJs mit im Vergleich zum 5'-Flap erhöhter Affinität und Effizienz. Die dafür nötige Anwesenheit zweier aktiver Zentren am JP der HJ wird durch die substratabhängige Dimerisierung gewährleistet, welche für HsGEN1 unter anderem über Elektronenmikroskopie gezeigt wurde (Rass *et al.*, 2010). Dagegen wurde an einer RF, welche ebenfalls schwach von ScYen1 und HsGEN1 umgesetzt wird, die Bindung von Monomeren beobachtet. Somit zeichnet die Resolvasen der Klasse 4 zwei Eigenschaften aus, die sie von den übrigen Rad2/XPG-Nukleasen unterscheiden: (1) Muss ihr aktives Zentrum auch doppelsträngige DNA aufnehmen können, da eine HJ an allen Junctionarmen aus Doppelhelices besteht, und (2) die Nutzung eines konservierten Schnittmechanismus der Superfamilie über substratvermittelte Dimerisierung für die Resolution komplexerer Verzweigungen (Rass *et al.*, 2010). Welche Eigenschaft die Mitglieder der Klasse 4 zu dieser Dimerisierung befähigt, ist noch unbekannt.

1.3.2.3 *In vitro* Charakterisierung von ScYen1, HsGEN1 und CeGEN-1

Bei HsGEN1 und ScYen1 handelt es sich mit 103 bzw. 87 kDa um die bisher größten bekannten Vertreter der HJ-Resolvasen. Für die Charakterisierung wurde jedoch ein N-terminales Fragment von HsGEN1 (HsGEN1 1-527) verwendet, da sich vollständiges rekombinantes HsGEN1 als nicht löslich herausstellte (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010). Dabei unterscheidet sich die Fragmentaktivität nicht von der des über Fraktionierung aufgereinigten Enzyms. Wie bereits erwähnt liegen HsGEN1 und ScYen1 als Monomer in Lösung vor und bilden erst am HJ-Substrat ein Homodimer aus, während sie eine Replikationsgabel als Monomer binden. Die nukleolytische Spaltung verzweigter Strukturen erfolgt entsprechend durch einen oder zwei Schnitte. Dabei wird eine Modell-HJ 20x, ein 5'-Flap 7x besser umgesetzt als eine Replikationsgabel, wohingegen Duplex-DNA und *splayed arm* weder von ScYen1 noch von HsGEN1 als Substrat erkannt werden. Die Replikationsgabel wird von HsGEN1 durch zwei Schnitte aufgelöst: einen Hauptschnitt 1 nt 3' des JP und einen Nebenschnitt ein Nukleotid

weiter in 3'-Richtung. Am 5'-Flap schneidet HsGEN1 sogar an drei möglichen Positionen, wobei der Hauptschnitt der FEN1-Aktivität entspricht und exakt 1 nt 3' des JP lokalisiert ist (Rass *et al.*, 2010). Dies lässt anhand der konservierten Eigenschaften der Superfamilie vermuten dass ein 5'-Flap mit einem 1 nt-3'-Überhang am JP ebenfalls als Substrat erkannt werden würde und dieses wie von FEN1 zu ligierbarem Produkt umgesetzt würde.

An einer statischen HJ wurde gezeigt, dass sowohl ScYen1 als auch HsGEN1 in Analogie zu EcRuvC ausschließlich ein Nukleotid 3' des JP schneiden, während eine an dieser Position genickte statische HJ 5x besser umgesetzt wird. Auch dies entspricht der Aktivität von EcRuvC. Eine weitere Parallele ist die Bevorzugung zweier Hauptschnittpositionen im homologen Kernbereich einer migrierbaren Modell-HJ, wobei HsGEN1 mehr Nebenschnittstellen zeigt als ScYen1. Somit besitzen auch die Resolvasen aus Mensch und Hefe eine Präferenz für einen (noch unbestimmten) Sequenzkontext (Ip *et al.*, 2008), wobei unklar ist, wie dieser aussieht und ob sein Einfluss ebenso stark ausgeprägt ist wie in *E. coli*. Es erscheint wahrscheinlich, dass dabei die Heferesolvase eine etwas ausgeprägtere Sequenzspezifität besitzt als HsGEN1.

Die Schnittpositionen der statischen Junction J3 zeigen wie für beispielsweise EcRuvC und T7 Endo I, dass die kontinuierlichen Stränge der HJ bevorzugt werden. Religationsexperimente und die Auflösung cruciformer Plasmidsubstrate zu linearem Duplex zeigen, dass HsGEN1 auch in diesen Aspekten den Voraussetzungen einer HJ-Resolvase entspricht (Rass *et al.*, 2010). Die biologische Funktion von HsGEN1 ist noch weitestgehend unklar, während für die Hefehomologe bereits einige *in vivo*-Daten veröffentlicht wurden (siehe dazu das folgende Kapitel 1.3.2.4).

Kurz nach HsGEN1 und ScYen1 wurde mit CeGEN-1 eine dritte klassische Resolvase in einem Eukaryoten identifiziert und charakterisiert. CeGEN-1 ist mit 434 AS und einer Molekülmasse von 49,6 kDa der mit Abstand kleinste beschriebene Vertreter der Klasse 4. In einem Mutagenesecscreening nach Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und schadensinduziertem Zellzyklusarrest wurde eine Mutation identifiziert, welche im Gen von CeGEN-1 ein vorzeitiges Stoppcodon erzeugt. Das resultierende verkürzte Protein von 352 AS zeigte keine Aktivität *in vitro* und führte somit zu den in Kapitel 1.3.2.4 näher beschriebenen Phänotypen (Bailly *et al.*, 2010). Von den getesteten Substraten, setzte rekombinantes *full length* CeGEN-1 ausschließlich die beiden mobilen HJs um. Allerdings war diese Aktivität sehr schwach und wie die Autoren argumentieren ist es wahrscheinlich, dass eine (schwächere) 5'-Flap-Aktivität unterhalb der Detektionsgrenze lag (Bailly *et al.*, 2010). Die Resolution der HJ-Substrate erfolgte über symmetrisch orientierte Schnitte zu demnach potentiell religierbaren genickten Duplices. An der Jbm5 wurden zwei bevorzugte Schnittpositionen beobachtet, an der X26-HJ (dem gleichen Substrat wie von Ip *et al.*, 2008 und Rass *et al.*, 2010 verwendet) schneidet CeGEN-1 an vier Positionen, wobei ein Schnittpaar genau ein Nukleotid außerhalb des 3'-Endes des homologen Kernbereichs liegt. Anhand dessen kann auch ohne dass eine statische HJ getestet wurde, gefolgert werden, dass auch CeGEN-1 ebenfalls 1 nt 3' eines JP schneidet. Zudem ist eine ähnlich ausgeprägte Sequenzspezifität wie für ScYen1 und HsGEN1 wahrscheinlich, jedoch nicht näher bestimmt.

1.3.2.4 *In vivo* Charakterisierung von ScYen1, HsGEN1 und CeGEN-1

Die Aufklärung der *in vivo*-Funktionen der eukaryotischen Resolvasen gestaltet sich schwierig, da in den meisten Fällen eine isolierte Betrachtung über Einzelmutanten zu keinem Ergebnis führte. So zeigen *yen1Δ*-Mutanten in *S. cerevisiae* keine Sensitivitäten gegenüber einer Vielzahl an DNA-schädigenden Agenzien: Methylmethansulfonat (MMS), Hydroxyurea (HU), 4-Nitroquinolin 1-Oxid

(4NQO), Camptothecin (CPT), UV-Strahlung und Cisplatin (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Tay und Wu, 2010). Alle diese Stoffe führen, zum Teil neben anderen Effekten, zur Blockierung oder zum Zusammenbruch der Replikationsgabel. Darüber hinaus ist *scyen1Δ* insensitiv gegenüber DSB-induzierenden Faktoren wie γ -Strahlung und Phleomycin. Auch verläuft die Sporenbildung in *scyen1Δ* normal und erzeugt lebensfähige Sporen im selben Umfang wie der Wildtyp (WT), was keinen offensichtlichen meiotischen Phänotyp liefert.

Neueste Erkenntnisse unterstützen jedoch sowohl für ScYen1, CeGEN-1 als auch für HsGEN1 eine Rolle in der somatischen, replikationsassoziierten HR. Muñoz-Galván *et al.*, 2012 zeigten mit einem Assaysystem, welches spezifisch die HR-Reparatur über das Schwesterchromatid während der Replikation (*sisterchromatid repair* = SCR) anzeigt, dass *Scyen1Δ* nach der Induktion von Einzelstrangbrüchen durch die HO-Endonuklease einen Defekt in der Reparatur replikationsinduzierter DSBs aufweist. Dies ergänzt sich mit den bereits seit 2010 beschriebenen Auswirkungen des *Gen-1* Genverlusts in *C. elegans*, welche ebenfalls für eine Rolle von CeGEN-1 in der mitotischen replikationsassoziierten Reparatur von DSBs sprechen könnten (Bailly *et al.*, 2010). Darüber hinaus führt der Knockdown von *HsGen1* über siRNA in menschlichen Zelllinien zu einem erhöhten Auftreten spontaner DNA-Schäden, einer um 60 % verminderten HR-Rate nach DSB-Induktion und einer gesteigerten Zahl derjenigen Zellen, die in die Apoptose eintreten (Gao *et al.*, 2012).

Mus81Δ-Mutanten in der Spaltheefe *S. pombe*, welche kein Yen1-Ortholog besitzt, weisen einen starken Defekt in der Segregation der homologen Chromosomen im Verlauf der Meiose auf. Anstatt dass sie auf die vier Sporenzellen verteilt werden, bleibt die DNA in einer einzigen unaufgelösten Masse verwunden. Die ektopische Expression von HsGEN1 komplementiert diesen Defekt und ermöglicht vollständige meiotische Teilungen und die Ausbildung lebensfähiger Sporen (Lorenz *et al.*, 2010). Dabei erzeugt HsGEN1 jedoch Crossover und Non-Crossover ohne Bevorzugung, während SpMus81 einen deutlichen Bias zu Crossovern aufweist. Das Ergebnis zeigt dennoch, dass HsGEN1 *in vivo* HJ-Strukturen in der Meiose auflösen kann, was eine Rolle der Yen1/GEN1-Homologe in der Meiose möglich erscheinen lässt. Das gleiche wurde an einem plasmidbasierenden HJ-Substrat in *S. cerevisiae* gezeigt (Tay und Wu, 2010).

Scmus81Δ-Hefezellen zeigen eine leichte Abnahme in der Zahl lebensfähiger Sporen auf ca. 80 % des WT-Niveaus, wohingegen das zusätzliche Ausschalten von *ScYen1* zu einer drastischen Verstärkung des Effekts (nur noch 30 % des WT-Niveaus) führt (Matos *et al.*, 2011). *Scmus81Δ-yen1Δ*-Asci zeigen den gleichen Phänotyp wie die *mus81*-Mutanten in *S. pombe*. Die Dreifachmutante *Scspo11Δ-mus81Δ-yen1Δ* hebt diesen Phänotyp auf, was zeigt, dass die meiotische Rekombination der Grund für dessen Auftreten ist. Die detaillierte Charakterisierung der meiotischen Defekte in *Scyen1Δ*, *Scmus81Δ* und *Scmus81Δ-yen1Δ* ergab, dass ScMUS81 die primäre Funktion in der Auflösung meiotischer Rekombinationsintermediate zukommt, während ScYen1 als Backup-Mechanismus zur Verfügung steht, falls die Aktivität von ScMus81 entweder ausfällt (wie in *Scmus81Δ*) oder interchromosomale Brücken nicht aufgelöst wurden (Matos *et al.*, 2011). Diese Strukturen können von ScYen1 zu Beginn der Anaphase II gelöst werden, was eine korrekte Chromosomensegregation auch in der *Scmus81Δ*-Mutante ermöglicht. Fallen beide HJ-auflösende Enzyme aus, bleiben die Chiasmata zwischen den homologen Chromosomen erhalten und die Erbinformation kann nicht auf die vier Sporenzellen verteilt werden. Auch in dieser Untersuchung führte der zusätzliche Funktionsverlust von ScSpo11 zur Unterdrückung des Phänotyps, was Rekombinationsintermediate als Schlüsselstruktur bestätigt. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ergab die Untersuchung von CeGEN-1-Mutanten keine meiotischen Phänotypen (Bailly *et al.*, 2010). Auch Doppelmutanten mit Mutanten

der weiteren strukturspezifischen Nukleasen CeMUS-81, CeXPF-1 und CeSLX-1 zeigten, dass CeGEN-1 keine, zu diesen Faktoren redundante, Rolle in der Meiose spielt (Agostinho *et al.*, 2013).

Während die *Scyen1Δ*-Einzelmutante keine Sensitivitäten aufweist (siehe oben), ist die Doppelmutante *Scmus81Δ-yen1Δ* deutlich sensitiver als die *Scmus81Δ*-Einzelmutante gegenüber MMS, HU, 4NQO, Phleomycin, CPT, ionisierender und UV-Strahlung und Cisplatin (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Tay und Wu, 2010). Der mildere Phänotyp in der *Scrad52Δ-mus81Δ-yen1Δ*-Dreifachmutante deutet an, dass toxische Rekombinationsintermediate der Grund für die Sensitivitäten sind (Blanco *et al.*, 2010). Daraus wird gefolgert, dass *ScMus81* und *ScYen1* überlappende und redundante Funktionen in der Reparatur replikationsassoziierter Schäden haben, wobei *ScYen1* die Funktionen von *ScMus81* nur zum Teil übernehmen kann (ersichtlich an den sichtbaren Phänotypen der *Scmus81Δ*-Einzelmutante, welche ein funktionelles *ScYen1*-Genprodukt besitzen).

γ-Strahlung verursachte in einer Dosis, die DSBs erzeugen würde, keine Sensitivität der *Scmus81Δ-yen1Δ*-Doppelmutante (Blanco *et al.*, 2010). Demnach spielt *ScYen1* in der Reparatur nicht-replikationsassoziierter, induzierter DSBs im Gegensatz zu *HsGEN1* keine Rolle (siehe oben, Gao *et al.*, 2012).

Sowohl für das *Yen1* der Hefen als auch *HsGEN1* existieren Hinweise für eine Trennung in katalytische und nichtkatalytische Funktionen. Das *Yen1*-Gen der Hefe *Klyveromyces lactis*, wie *S. cerevisiae* aus der Familie der *Saccharomycetaceae*, codiert ebenfalls für eine HJ-Resolvase und die *Klyen1Δ*-, *Klmus81Δ*- und *Klmus81Δ-yen1Δ*-Mutanten verhalten sich gegenüber MMS gleich wie ihre Orthologe in *S. cerevisiae* (Chen und Astrom, 2012). Die Überexpression von *KIYen1* in *Klmus81Δ* führt zu einer teilweisen Komplementation der MMS-Sensitivität, während die Expression dreier nukleasedefizienter *KIYen1*-Varianten die MMS-Sensitivität der *Klmus81Δ*-Mutante zwar ebenfalls abmilderte, der Effekt jedoch weniger stark war als bei der Überexpression von WT-*KIYen1*. Die Teilkomplementation der nukleasedefizienten Varianten spricht für die Fähigkeit von *KIYen1* unabhängig von seiner Nukleaseaktivität an der Reparatur MMS-induzierter Schäden mitzuwirken, wobei es als aktive Nuklease dieser Rolle besser gerecht werden kann (Chen und Astrom, 2012).

HsGEN1 wurde ebenfalls 2012 als neues zentrosomenassoziiertes Protein beschrieben, welches innerhalb der XPG-I Domäne ein funktionelles *centrosome localization signal* (CLS) aufweist. Dieses ist ebenfalls in *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Drosophila melanogaster* und *S. cerevisiae* konserviert (Gao *et al.*, 2012). GFP-Fusionen von *HsGEN1* und nukleasedefizienten Varianten lokalisieren an den Zentrosomen, was bedeutet, dass die Nukleaseaktivität dafür nicht benötigt wird. Komplementationen mit *HsGEN1* und den nukleasedefizienten Varianten von siRNA-Knockdowns bestätigen, dass die Resolvaseaktivität nicht für die zentrosomenassoziierte Funktion benötigt wird. *HsGEN1*-Knockdown-Zellen enthalten häufiger als WT-Zellen mehrere Zellkerne und die Zahl der Mitosespindeln ist erhöht, begründet durch mehrfache Zentrosomenduplikationen. Diese Auswirkungen führen zu einer G2/M-Zellzyklusarrest und einer deutlich erhöhten Zahl apoptotischer Zellen. Alle drei beschriebenen Aspekte können durch die Expression des WT-*HsGEN1* oder einer nukleasedefizienten Variante aufgehoben werden (Gao *et al.*, 2012).

HsGEN1 und Brustkrebs

Zwei Studien haben Mutationen in *HsGEN1* identifiziert, die beide zu Trunkierungen des Proteins führen (Wood *et al.*, 2007; Forbes *et al.*, 2008). In Verbindung mit der postulierten prominenten Rolle

einer HJ-Resolvase in der HR erschien *HsGen1* damit ein Kandidat für Krebsdisposition zu sein. Turnbull *et al.*, 2010 haben daraufhin das Auftreten einer bestimmten Trunkierung, c.2515_2519del-AAGTT, die zum Verlust von 69 AS am C-Terminus führt, in Brustkrebsfällen untersucht und kamen zu dem Schluss, dass *HsGEN1* keine Rolle für die Krebsdisposition spielt. Eine neuere Untersuchung ergab jedoch ein signifikant erhöhtes Auftreten dieser Mutation in Fällen von bilateralem Brustkrebs (Kuligina *et al.*, 2013). Somit scheint ein Einfluss von *HsGEN1* auf die Krebsdisposition möglich.

1.3.3 Die HJ-Resolvasen der Pflanzen

Während seit 2008 für die Tiere und Pilze, wenn auch nicht so umfangreich wie für Prokaryoten und Phagen, bereits mehrere Resolvasen charakterisiert wurden, beschränkt sich unser Wissen über die Klasse 4 Homologe in Pflanzen auf die Einzelstrang-Endonuklease OsSEND-1 (siehe Kapitel 1.3.2.2.2) und die kürzlich charakterisierte Resolvase OsGEN-L (Furukawa *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurden weitere Homologe, wie zum Beispiel die *Arabidopsis thaliana* Homologe AtGEN1 (At1g01880) und AtSEND1 (At3g48900), nur bioinformatisch identifiziert (Furukawa *et al.*, 2003; Moritoh *et al.*, 2005).

Vor 2010 waren die Homologe der XPF-Nuklease MUS81 mit ihrem Heterodimerpartner EME1 die einzigen charakterisierten HJ-auflösenden Enzyme in Pflanzen (Hartung *et al.*, 2006; Geuting *et al.*, 2009). Im Genom von *A. thaliana* ist zwar ein Homolog zu ScSlx1 codiert, jedoch wurde bisher kein Homolog zum Scaffoldprotein ScSlx4 identifiziert (A. Knoll, unveröffentlichte Daten).

Zu OsGEN-L (*OsGEN-like*) stammen die ersten Erkenntnisse aus der Untersuchung von RNAi-knockdowns *in vivo* (Moritoh *et al.*, 2005). Das untersuchte Gen codiert für ein Protein von 629 AS mit einer Molekülmasse von 71 kDa, welches anhand der hohen Konservierung, insbesondere der XPG-I Domäne (51 % zum Menschen), der Rad2/XPG-Superfamilie zugeordnet wurde. Der Knockdown der Expression resultierte in männlicher Sterilität, was zuerst für einen meiotischen Phänotyp sprechen würde. Dieser wiederum wird oft mit einer Beteiligung des entsprechenden Faktors an der meiotischen HR in Verbindung gebracht. Eine genauere Betrachtung der Pollenentwicklung zeigte jedoch, dass die Meiose der Knockdown-Pflanzen ungestört verlief und der Phänotyp erst nach Bildung der Tetraden in der frühen Mikrosporenentwicklung zum Tragen kam. Passend zu einer Rolle von OsGEN-L in der Entwicklung des Pollens, wurden die Antheren als Hauptexpressionsort identifiziert.

Eine erste biochemische Charakterisierung ergab ausschließlich eine Aktivität am 5'-Flap, jedoch konnte ektopisch exprimiertes OsGEN-L den Rad27/Fen1-Phänotyp in *S. cerevisiae* nicht komplementieren (Moritoh *et al.*, 2005). 2012 folgte eine erneute, detaillierte Charakterisierung der *in vivo*-Eigenschaften von OsGEN-L. Allerdings fokussierte sich diese Untersuchung stark auf die Aktivität an 5'-Flaps und Replikationsgabeln, die einzigen Strukturen, die in dem breiten getesteten Spektrum umgesetzt wurden (Yang *et al.*, 2012). Dabei zeigte sich eine der Flap-Endonuklease FEN1 entsprechende Bevorzugung von 5'-Flaps mit einem einzelnen ungepaarten 3'-Nukleotid am JP. Fehlte dieses Nukleotid oder wies das Substrat eine Lücke von mehr als einem Nukleotid auf, war die Aktivität stark vermindert bzw. vollständig gehemmt. Für Replikationsgabelsubstrate zeigte sich das Gegenteil: innerhalb des getesteten Spektrums war die Aktivität beim größten Gap im Vorwärtsstrang am höchsten und führte zu Schnitten im gegenüberliegenden Rückwärtsstrang nahe des JP.

Unter, von den für die 5'-Flap-Aktivität verwendeten, abweichenden Reaktionsbedingungen löst OsGEN-L auch HJs auf (Yang *et al.*, 2012). Dies geschieht an einer statischen Modell-HJ durch Schnitte

ein Nukleotid 3' des JP, wie für HsGEN1, ScYen1 und EcRuvC beschrieben. Allerdings ist die Verteilung auf die 4 Stränge der HJ nicht gleichmäßig: drei Stränge werden bevorzugt geschnitten, während der vierte nur sehr schwach 1 bzw. 2 nt 3' des JP geschnitten wird. Native Gele zeigen die Entstehung von sowohl genicktem Duplex (Resolvaseprodukt) als auch replikationsgabelähnlichen Produkten und kurzem Duplex, welcher einem einzelnen abgetrennten Arm der HJ entspricht. Eine mobile HJ wird jedoch durch Resolvase-Aktivität mit symmetrischen Schnitten zum Teil in religierbare genickte Duplices aufgelöst. Somit wurde mit OsGEN-L die erste pflanzliche HJ-Resolvase beschrieben. Allerdings ist die Charakterisierung der Resolvase-Aktivität von OsGEN-L im Vergleich zur 5'-Flap-Aktivität oberflächlich und lässt noch Fragen offen.

Das putative *A. thaliana* Ortholog zu HsGEN1 und OsGEN-L, AtGEN1 und das nahe verwandte AtSEND1 (At3g48900) sind Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Zur gleichen Zeit beschäftigte sich eine zweite Arbeit mit möglichen *in vivo* Eigenschaften von AtGEN1 und AtSEND1. Sensitivitätsassays mit den Einzelmutanten *Atgen1Δ* und *Atsend1Δ* sowie der Doppelmutante *Atgen1Δ-send1Δ* zeigten keinerlei Sensitivitäten gegen Bleomycin, Cisplatin, CPT, HU, MMS und MMC (Klimesch, 2012). Dies entspricht *Osgen-I*, welches ebenfalls keine Sensitivität gegen MMS aufweist (Yang *et al.*, 2012). Damit bleibt die Frage nach der *in vivo*-Funktion der pflanzlichen HJ-Resolvasen-Homologe weiterhin offen.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Auflösung von Holliday Junctions (HJs) als intermediäre Strukturen im Rahmen der Homologen Rekombination bei der DNA-Reparatur und meiotischen Rekombination ist für das Überleben der Zelle unerlässlich. Eine Möglichkeit ist die Auflösung über Resolution, d.h. über symmetrisch orientierte Schnitte in gegenüberliegenden Strängen der Holliday Junction zu religierbaren Produkten.

Um die Erkenntnisse über die eukaryotischen Resolvasen im Allgemeinen und der pflanzlichen Resolvasen im Speziellen zu erweitern, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die *in vitro*-Eigenschaften der homologen Proteine AtGEN1 und AtSEND1 zu bestimmen. Zunächst sollte bioinformatisch ihr möglicher Ursprung aus einem Genduplikationsereignis in Verlauf der Evolution der höheren Pflanzen untersucht werden. Zur vergleichenden biochemischen Charakterisierung sollten anschließend rekombinante Proteine von AtGEN1 und AtSEND1 heterolog in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographien aufgereinigt werden. Dabei sollte primär die Frage geklärt werden, ob es sich sowohl bei AtGEN1 als auch AtSEND1 um funktionelle HJ-Resolvasen nach dem EcRuvC-Paradigma handelt und ob sich diese in ihren Eigenschaften unterscheiden. Hierzu sollten anhand der Literatur und den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen geeignete Substrate definiert und untersucht werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnten anhand der beobachteten Charakteristika von AtGEN1 und AtSEND1 weitere neue, interessante Fragestellungen formuliert werden. Zum einen sollte eine Nebenaktivität der beiden Proteine zur HJ-Resolution genauer charakterisiert werden. Zum anderen sollte der Einfluss eines künstlichen Nicks in einem Strang einer HJ auf die HJ-Resolvaseaktivität von AtGEN1 und AtSEND1 untersucht werden, um weiterführende Erkenntnisse über den Schnittmechanismus der eukaryotischen HJ-Resolvasen zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *E. coli*-Stämme und Plasmide

2.1.1.1 Klonierungsstämme

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

NEB5 α , New England Biolabs, Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

2.1.1.2 Expressionsstämme

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

ER2566, New England Biolabs, Genotyp: F⁻ λ ⁻ *fhuA2* [*lon*] *ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11* Δ (*mcrC-mrr*)114::IS10 R(*mcr-73::miniTn10-Tet^S*)2 R(*zgb-210::Tn10*)(*Tet^S*) *endA1* [*dcm*]

Beide verwendete Expressionsstämme tragen eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerasegens unter der Kontrolle des lac-Promotors. Die über das pET-Vektorsystem eingebrachten Zielgene stehen unter Kontrolle eines kombinierten T7/lacO-Promotors. Wie der chromosomale lac-Promotor wird auch dieser über das LacI-Genprodukt inhibiert, was eine ungewollte Expression minimiert und gleichzeitig eine gezielte Induktion der T7-RNA-Polymerase und somit auch des jeweiligen Zielgens mittels IPTG ermöglicht. Um die Kontrolle der Expression stringenter zu machen, tragen die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide ein zusätzliches lacI-Gen.

Des Weiteren trägt der Stamm BL21-CodonPlus[®](DE3)-RIPL zwei zusätzliche Plasmide, welche Gene für die seltenen tRNAs *argU* und *proL* bzw. *argU*, *ileY*, und *leuW* tragen. Die über das erstgenannte Plasmid eingebrachte Chloramphenicolresistenz macht diesen Expressionstamm jedoch für die Cotransformation mit den in dieser Arbeit verwendeten Chaperonexpressionsplasmiden ungeeignet. Da diese ebenfalls eine Chloramphenicolresistenz tragen, wäre eine Selektion auf erfolgreiche Cotransformation in BL21-CodonPlus[®](DE3)-RIPL nicht möglich.

2.1.1.3 Plasmide:

pETDuet-1-StrepII, Diplomarbeit Jasmin Jansen 2008

Wie der zugrunde liegende Vektor pETDuet-1 von Novagen besitzt der Vektor pETDuet-1-Strep-II zwei multiple Klonierungsstellen (MCS), wobei 5' der ersten die codierende Sequenz für den His-Tag liegt und 3' der zweiten die codierende Sequenz für den *Strep*-Tag II.

pGEM-T easy – Promega Corporation, Madison, USA

pAT153 – MoBiTec GmbH, Göttingen

pETDuet-1-StrepII-PS, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-StrepII-PS-C, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-StrepII-PS-AtGEN1, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-StrepII-PS-AtGEN1 D163A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-StrepII-PS-AtSEND1, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-StrepII-PS-AtSEND1 D165A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C, in dieser Arbeit kloniert (Vektorkarte in Abbildung 9.2)

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtGEN1, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtGEN1 D75A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtGEN1 E140A/E142A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtGEN1 D163A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtSEND1, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtSEND1 D76A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtSEND1 E142A/E144A, in dieser Arbeit kloniert

pETDuet-1-HisStrepII-PS-C-AtSEND1 D165A, in dieser Arbeit kloniert

Chaperonexpressionsplasmide – Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan

Die verwendeten Chaperonexpressionsplasmide sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Chaperonexpressionsplasmide

Nr.	Name	codierte Chaperone	Promotor	Induktor (verwendete Konzentration)
1	pG-KJE8	dnaK, dnaJ, grpE groES, groEL	araB Pzt-1	L-Arabinose (0,5 mg/ml) Tetracylin (5 ng/ml)
2	pGro7	groES, groEL	araB	L-Arabinose (0,5 mg/ml)
3	pKJE7	dnaK, dnaJ, grpE	araB	L-Arabinose (0,5 mg/ml)
4	pG-Tf2	groES, groEL, tig	Pzt-1	Tetracylin (5 ng/ml)
5	pTf16	tig	araB	L-Arabinose (0,5 mg/ml)

2.1.2 Oligonukleotide

2.1.2.1 Primer für cDNA-Bestimmung und Sequenzierungen

Alle für die Bestimmung der ORF-Grenzen und UTR-Bereiche sowie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Alle Primer wurden vom Hersteller entsalzt bestellt.

Tabelle 2.2: Primer zur cDNA-Bestimmung und Sequenzierungen von AtGEN1 und AtSEND1

* Das Adenin des Start-ATG wurde als Base Nr. 1, die Base der cDNA direkt 5' davon als Nr. -1, definiert. Primer die mit einem „-“, gekennzeichnet sind, binden in der genomischen Sequenz *upstream* des ORFs. Ein + kennzeichnet Primer die in der genomischen DNA *downstream* des Stoppcodons binden.

Primernamen		Sequenz (5' → 3')	nt	T _m	Position im ORF*
MB-GEN fw 1	F	AGATATCATCCGGGCTAAT	19	54 °C	-228
MB-GEN fw 2	F	CTTTAATTTCGCCTTTTGCT	20	54 °C	-85
MB-GEN fw 3	F	ATGGGTGTGGGAGGCAAT	18	54 °C	1-18
MB-GEN fw 4	F	GGTGGATCAAAGTCTGCG	18	54 °C	998-1015
MB-GEN fw 5	F	GCGGAAACACTTGATTGC	18	54 °C	597-614
MB-GEN fw 6	F	TGCTGTCGACCATTATCT	19	54 °C	1202-1220
MB-GEN 1 rv	R	CAAGTACTTGGTCTTCAGA	19	54 °C	703-721
MB-GEN 2 rv	R	CTATCCAAACAAGAGACGA	19	54 °C	1782-1800
MB-GEN 3 rv	R	GCAAAAGGTCTCCAGTTC	18	54 °C	+136
MB-Send fw 1	F	ATGGTAGGTCTGTTGCCG	18	56 °C	-189
MB-Send fw 2	F	TTCAAATATCTTGTCAAATCAT	22	54 °C	-78
MB-Send fw 3	F	CGATCTCGAAGGTGAAGC	18	56 °C	-19
MB-Send fw 4	F	GGGAGTGAAGTATCTTTGG	19	56 °C	3-21
MB-Send fw 5	F	CGCAGATGCCAGAGAAG	17	54 °C	1124-1140
MB-Send fw 6	F	TTGGCAGTGACTACTCT	17	54 °C	635-651
MB-Send fw 7	F	GCATCATAAAAGAGGCGAA	19	54 °C	359-377
MB-Send 1 rv	R	ACATAAGGATTCAGAGTTTA	20	54 °C	449-468
MB-Send 3 rv	R	ATGAAATCCATAAAATTAAGATAAA	24	56 °C	+57
MB-Send 4 rv	R	AACTTGCTTCTTAGACTTTC	20	54 °C	767-786
FW1new	F	GATGCGTCCGGCGTAGA	18	60 °C	Vektor
M13fw	F	GTA AACGACGGCCAGTG	19	56 °C	Vektor
M13rv	R	CACAGGAAACAGCTATGAC	20	54 °C	Vektor
T7-Promotor	F	TAATACGACTCACTATAGG	19	52 °C	Vektor

2.1.2.2 Primer für Klonierungen (inkl. Mutationsprimer)

In Tabelle 2.3 sind alle Primer zusammengefasst, die bei den Klonierungsarbeiten für das Einfügen von Sequenzen in Vektoren, das Anfügen von Restriktionsschnittstellen an die ORFs oder das Einfügen von Basenaustauschen verwendet wurden.

Tabelle 2.3: Klonierungsprimer

* Das Adenin des Start-ATG wurde als Base Nr. 1, die Base der cDNA direkt 5' davon als Nr. -1, definiert. ** T_{m1} ist die Schmelztemperatur der zum Ziel-ORF komplementären Bereiche = Annealingtemperatur für erste Stufe der Klonierungs-PCR. T_{m2} ist die Annealingtemperatur für die zweite Stufe der Klonierungs-PCR. Unterstrichene Sequenzen markieren die Restriktionsschnittstellen, welche im Oligonukleotidnamen genannt sind. Pink markiert ein Adenin, welches zur Erhaltung des Leserasters eingefügt wurde. Überhänge für die Verbesserung der Schnitteffizienz der Restriktionsenzyme sind in Orange eingefärbt. Rote Basen führen zu den gewünschten AS-Austauschen. P- symbolisiert ein 5'-Phosphat.

Primernamen		Sequenz (5' → 3')	nt	T _m bzw. T _{m1} /T _{m2}	Position im ORF*
GEN-BamHI	F	<u>CATGGATCCA</u> ATGGGTGTGGGAGGCAA	27	50/68 °C	
GEN-KpnI	R	CAGTAC <u>CGGTACC</u> TCCAAACAAGAGACGAC	29	50/68 °C	
GEN1-NcoI	F	<u>CAGTACCC</u> ATGGGTGTGGGAGGCAAT	26	56/68 °C	

GEN1 D75A fw	F	TGTGGTTGCGGGAACACCAT	20	62 °C	216-235
GEN1 D75A rv	R	ATGGTGTTCACGCAACCACA	20	62 °C	216-235
GEN1 E140A/E142A fw	F	CTAATGGTGC GGCTGCAGCT	20	64 °C	410-429
GEN1 E140A/E142A rv	R	AGCTGCAGCCGCACCATTAG	20	64 °C	410-429
GEN1 D163A rv	F	CTCCTGATAGTGC GGCTTTC	20	62 °C	476-495
GEN1 D163A rv	R	GGAAAGCCGC CACTATCAGGA	20	62 °C	476-495
SEND-BamHI	F	CATGGATCCAATGGGAGTGAAGTATCTT	28	50/68 °C	
SEND-KpnI	R	CAGTACGGTACC TAGGATAATGTCTTTCC TG	31	52/68 °C	
SEND-NcoI	F	CAGTACCCATGGGAGTGAAGTATCTT	26	50/68 °C	
SEND1 D76A fw	F	CTCAGCGGGTGCAATTCCTG	20	64 °C	222-241
SEND1 D76A rv	R	GAATTGCACCCGCTGAGACTA	21	64 °C	218-238
SEND1 E142A/E144A fw	F	GCGGCTGC GGCGCAATGC	18	64 °C	423-441
SEND1 E142A/E144A rv	R	GCGCCGCAGCCGCCTCAA	18	64 °C	419-436
SEND1 D165A fw	F	GCTTTGATTCCGGCGATCTTCC	21	64 °C	482-502
SEND1 D165A rv	R	GGAAGATCGCCGAATCAAAGC	21	64 °C	482-502
PCS-1s	F	P-gatctGCTAGCgCTGGAAGTGCTGTTT CAGGGCCCG	36		
PCS-1as neu	R	P-gatcCGGGCCCTGAAACAGCACTTCCA Ggcgagca	36		
PCS-2s	F	P-cCTGGAAGTGCTGTTTCAGGGCCCGac cggtagtac	36		
PCS-2as neu	R	P-taccggtCGGGCCCTGAAACAGCACTT CCAGggtac	36		
His-XhoI s	F	P- CCGGTCATCACCATCATCACCACCTCGAG T	30		
His-XhoI as	R	P- CCGGACTCGAGGTGGTGATGATGGTGATG A	30		

2.1.2.3 Substratoligonukleotide und Marker

Alle Oligonukleotide für die Substratherstellung wurden von Biomers.net bezogen und sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Für die Marker zur Größenbestimmung der Nukleaseschnittprodukte wurden 5'-markierte Oligonukleotide definierter Längen benutzt. Dabei entsprach die Sequenz der 5'-Sequenz des jeweiligen ³²P-markierten Substratoligonukleotids. Die Markeroligonukleotide wurden entsalzt von Life Technologies bezogen.

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Substratoligonukleotide

Die unterkringelten Nukleotide (GT) im Oligonukleotid XM3a stellen eine Abweichung von der Sequenz (TG) des Oligonukleotids XM3 aus Gari *et al.*, 2008 dar, da die veröffentlichte Sequenz nicht komplementär zum 5'-Ende des Oligonukleotids X01 ist. Unterstrichene Bereiche stellen den homologen Core der X26-basierenden Substrate dar. P = PAGE-aufgereinigt, H = HPLC-aufgereinigt, K = Kartusche/entsalzt

Name	Sequenz (5' → 3')	nt	Aufr.
pmHJ (partiell mobile Holliday Junction), nach Gari <i>et al.</i>, 2008			
X01	GACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGC AGGTTACCC	61	P
X02	TGGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCATCTGTTGTAATCGTCAAGC TTTATGCCGTT	62	P

XM3a	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAAATGTCTAGCAAGGCACTGGTAGAATT CGGCAGCGTC	61	P
XM4	GAACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATGGACATTTTGGCCACCTG CAGGTTACCC	62	P
X26-basierende Junctions (Junctions mit 26 nt homologem core: X26¹, X26-S¹, nX-30, nX-32, RF1, RF2, RF3) nach ¹Ip et al., 2008			
X26-1 ¹	GCGCTACCAGTGATCACCAATGGATTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCA GGTTCACCC	60	P
X26-2 ¹	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCTAGCAATCCATTGTCTATGAC GTCAAGCTC	60	P
X26-3 ¹	GAGCTTGACGTCATAGACAATGGATTGCTAGGACATCTTTGCCGTCTTGTC AATATCGGC	60	P
X26-4 ¹	GCCGATATTGACAAGACGGCAAAGATGTCTAGCAATCCATTGGTGATCAC TGGTAGCGC	60	P
X26-2S ¹	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCTAGCAATCCATTGTCTATGAC GT	53	P
X26-3S ¹	ACGTCATAGACAATGGATTGCTAGGACATCTTTGCCGTCTTGCAATATCG GC	53	P
X26-3a30	GAGCTTGACGTCATAGACAATGGATTGCTA	30	P
X26-3b30-P	P-GGACATCTTTGCCGTCTTGTC AATATCGGC	30	P
X26-3a32	GAGCTTGACGTCATAGACAATGGATTGCTAGG	32	P
X26-3b28-P	P-ACATCTTTGCCGTCTTGTC AATATCGGC	28	P
X26-4b27-P	P-CAATCCATTGGTGATCACTGGTAGCGC	27	P
X26-4b32-P	P-CCTAGCAATCCATTGGTGATCACTGGTAGCGC	32	P
genickte Duplices (basierend auf X26)			
X26-2-29	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTC	29	H
X26-2-38	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCTAGCAATC	38	H
X26-4-3'31-P	P-CTAGCAATCCATTGGTGATCACTGGTAGCGC	31	H
X26-4-3'22-P	P-CATTGGTGATCACTGGTAGCGC	22	H
X26_1-33	GCGCTACCAGTGATCACCAATGGATTGCTAGGA	33	K
X26_1-32	GCGCTACCAGTGATCACCAATGGATTGCTAGG	32	K
X26_1-31	GCGCTACCAGTGATCACCAATGGATTGCTAG	31	K
X26_1-30	GCGCTACCAGTGATCACCAATGGATTGCTA	30	K
X0-HJ (statische Holliday Junction), nach Ip et al., 2008¹			
X0-1p-1 ¹	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCTTGTAGGACATCTTTGCCACCTGCA GGTTCACCC	60	P
X0-1p-2 ¹	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCATCTGTTGTAATCGTCAAGCT TTATGCCGT	60	P
X0-1p-3 ¹	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATCATGGAGCTGTCTAGAGGATC CGACTATCG	60	P
X0-1p-4 ¹	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATT CGGCAGCGT	60	P
Zusätzliche Oligonukleotide für X0-Flap-Substrate			
X0-1p-1a30	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCTTGTAGGACATCTTTGCCACCTGCA GGTTCACCC	30	P
X0-1p-2a30	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC	30	P
X0-1p-3a30	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGAT	30	P
X0-1p-4a30	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATG	30	P
X0-1p-3b30	CATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG	30	P

Die X26-HJ stammt ursprünglich aus Constantinou *et al.*, 2001, wird hier aber in einer leicht abgewandelten Variante aus Ip *et al.*, 2008, verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendete statische HJ (X0-HJ) entspricht der von Ip *et al.*, 2008 verwendeten Modell-HJ. Die von Blanck *et al.*, 2009 und Geuting *et al.*, 2009 verwendeten, ebenfalls X0 benannten statischen HJs unterscheiden sich sowohl in der Sequenz als auch der Länge der Oligonukleotide und damit auch der Armlänge.

2.1.3 Ausgewählte Chemikalien

Bei im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um Standardchemikalien, welche von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka AG (Buchs), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Niederlande) sowie VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen wurden.

- ➔ [γ -³²P] ATP, 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml – Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
- ➔ ATP – Alpha Aesar, Karlsruhe
- ➔ Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate – Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- ➔ BSA (Rinderserumalbumin) – New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- ➔ BSA-Kalibrierstandard: Protein Assay Standard II – Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- ➔ Desthiobiotin – IBA GmbH, Göttingen
- ➔ DTT (Dithiothreitol) – AppliChem GmbH, Darmstadt
- ➔ GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain – Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
- ➔ Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) – Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande
- ➔ Lumasafe Plus Liquid Scintillation Cocktail – PerkinElmer, Waltham, USA
- ➔ Magnesiumchlorid, 1M Stocklösung – AppliChem GmbH (Darmstadt)
- ➔ Mischbettionenaustauscher TMD-8 – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- ➔ NBT (= Nitroblau Tetrazolium) – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- ➔ Pellet Paint[®] Co-Precipitant – Merck KGaA, Darmstadt
- ➔ PlusOne Bind-Silane – GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- ➔ PlusOne Repel-Silane ES (= Dichlormethylsilan) – GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- ➔ Thioglycerin – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- ➔ Tris-Base – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- ➔ Triton-X-100 – AppliChem GmbH, Darmstadt
- ➔ Tween20 – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.4 Marker, Enzyme, Kits

Restriktionsenzyme:

- ➔ AatII, AgeII-HF, BamHI-HF, XhoI – New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- ➔ EcoRI, HindIII, KpnI, NcoI, NheI – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Polymerasen:

- ➔ Taq DNA Polymerase [5 U/ μ l] - Biomaster GmbH, Windeck
- ➔ DreamTaqTM DNA Polymerase [5 U/ μ l] – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
- ➔ Phusion-DNA-Polymerase [2 U/ μ l] – New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

weitere Enzyme:

- ➔ Antarctic Phosphatase [5 U/ μ l] – New England Biolabs, Frankfurt am Main
- ➔ Lysozym [\sim 20000 U/mg] – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- ➔ Mung Bean Nuklease – New England Biolabs, Frankfurt am Main
- ➔ RNase-Free DNase Set [1500 Kunitz U/mg] – Qiagen GmbH, Hilden

- RevertAid™ Reverse Transcriptase [200 U/μl] – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
- T4 DNA Ligase [10 Weiss-Units/μl] – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
- T4 Polynukleotid Kinase [10 U/μl] – New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- Proteinase K [≥30 U/mg] – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Marker:

- PageRuler Unstained Protein Ladder – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

KITs:

- High Pure PCR Product Purification Kit – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- innuPREP PCRpure Kit – Analytik Jena AG, Jena
- innuPREP Gel Extraction Kit – Analytik Jena AG, Jena
- RNeasy Plant Mini Kit – Qiagen GmbH, Hilden
- RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit – Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Antikörper

- His-Tag® Monoclonal Antibody (aus Maus) (Novagen): 1:1333 in AK-Lösung
- Goat Anti-Mouse Alkaline Phosphatase Conjugate (Novagen): 1:10000 in AK-Lösung
- *Strep*-Tactin® AP Conjugate (IBA GmbH, Göttingen): 1:4000 in AK-Lösung

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Proteinexpression

- L-Arabinose-Stammlösung 250 mg/ml in ddH₂O, Lagerung bei -20 °C
- Carbenicillin-Stammlösung 50 mg/ml in ddH₂O, Lagerung bei -20 °C
- Chloramphenicol-Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei -20 °C
- Tetracyclin-Stammlösung 50 μg/ml in ddH₂O, Lagerung bei -20 °C
- LB-Medium (flüssig): 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
- LB-Medium (fest): 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 17,5 g/l Agar

Proteinaufreinigungen

Alle Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt und durch einen 0,45 μM Cellulose-Acetat Filter filtriert und entgast. Lösungen, welche Thioglycerin, DTT oder Tween20 beinhalten, wurden erst direkt vor Gebrauch mit den entsprechenden Substanzen versetzt.

- P500GF S: 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 % Tween20, pH 8,0
- P500GF SE: P500GF S + 3 mM Desthiobiotin
- P500GF SR: P500GF S + 1 mM 2-(4-Hydroxyphenylazo)Benzoessäure (HABA)
- P500Ni20: 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerin, pH 8,0
- P500Ni400: 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol, 5% Glycerin, pH 8,0
- Stripping Puffer: 20 mM NaH₂PO₄, 50 mM EDTA, pH 7,2

- ➔ P500GF S +G: = Lagerungsbedingung für alle aufgereinigten Proteine
50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,05 % Tween20, 50 % Glycerin, pH 8,0

Polyacrylamidgele zu Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren

- ➔ 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19,0:1) – für Nukleinsäure-Elektrophorese
- ➔ 30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) – für Protein-Elektrophorese
- ➔ 36% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (22,8:1) – für Nukleinsäure-Sequenziergele
Mischung aus 1 Teil 30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) und 1,4 Teilen 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19,0:1)

Die Lösungen wurden vor Gebrauch entgast, anschließend mit Mischbett-Ionenaustauscher TMD-8 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) versetzt und bei 4 °C gelagert.

- ➔ APS (= Ammoniumpersulfat)-Lösung 10 % (w/v)
in ddH₂O, Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C
- ➔ SDS (= Sdiumdodecylsulfat)-Lösung 10 %-ig (w/v)
- ➔ SDS-PAGE Trenngelpuffer (4 x)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, Lagerung bei 4 °C
- ➔ SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4 x)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Lagerung bei 4 °C
- ➔ SDS-PAGE-Laufpuffer (10 x)
250 mM Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3
- ➔ SDS-PAGE Probenpuffer, denaturierend (2 x)
125 mM Tris, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % Thioglycerin, pH 6,8
- ➔ TBE-Puffer (10 x)
890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH nicht einstellen)
- ➔ TBMgCl₂ (10x)
890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 100 mM MgCl₂ (pH nicht einstellen)
- ➔ Kolloidal-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 ml Färbelösung mit 20 ml vergälltem 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

Western Blot

- ➔ Western Blot Anodenpuffer I für PVDF-Membran
0,3 M Tris-HCl, 10 % Ethanol vergällt, pH 9,4
- ➔ Western Blot Anodenpuffer II für PVDF-Membran
0,025 M Tris-HCl, 10 % Ethanol vergällt, pH 9,4
- ➔ Western Blot Kathodenpuffer für PVDF-Membran
0,025 M Tris-HCl, 0,04 M Aminocaproat, 10 % Spiritus, pH 9,4

- TBS (Tris buffered saline)-Puffer (1x), aus 10x Stock
10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0
- TBS-T-Puffer (1x)
TBS-Puffer + 0,1 % Tween20, pH 8,0
- AP Puffer (alkalische Phosphatase Puffer) für NBT/ BCIP (1x)
100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,5
- AK-Lösung (1x)
TBS-Puffer + 0,25 % Tween20, 1 % BSA, 0,02 % Natriumazid
- Färbelösung Western Blot
10 ml AP-Puffer, 30 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml in 100 % DMF) und 40 µl NBT-Lösung (75 mg/ml in 70 % DMF)

Nuklease-Assay

Um die Reaktionsbedingungen der Endonuklease-Assays einzustellen, wurden folgende Puffer/Lösungen verwendet:

- Reaktionspuffer pmHJ (als 5x Stock verwendet)
125mM Tris-HCl pH 7,0
- Reaktionsbedingungen für Endonuklease-Assays an der pmHJ
25 mM Tris-HCl pH 7,0, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1,2 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 0,02 % Tween20, 20 % Glycerin
- Reaktionspuffer GEN1 (als 5x Stock verwendet)
125 mM HEPES-NaOH, pH 8,0
- Reaktionspuffer SEND1 (als 5x Stock verwendet)
125 mM HEPES-NaOH, pH 7,0
- 1M NaCl Stock, steril filtriert
- Standardreaktionsbedingungen für Endonuklease-Assays
25 mM HEPES-KOH, 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 1,05 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 0,005 % Tween20, 5 % Glycerin, pH 8,0
+ zusätzlich 50 mM NaCl für AtGEN1 und AS-Austauschvarianten
+ zusätzlich 100 mM NaCl für AtSEND1 und AS-Austauschvarianten

Weitere Lösungen, die für die Nuklease-Assays verwendet wurden:

- Proteinase K Stock
20 mg/ml Proteinase K in Proteinase K Lagerlösung
- Proteinase K Lagerlösung
89 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, pH 8,0
- Native Stopplösung (3x Stock)
50 mM EDTA, 0,6 % SDS, 20 % Glycerin, 0,1 % Xylenyanol FF, 0,1 % Bromphenolblau
Die native Stopplösung wurde für jeden Assay nach Bedarf mit Proteinase K Stock (20 mg/ml) auf eine Endkonzentration von 0,95 mg/ml ergänzt.
- Denaturierende Stopplösung (2x Stock)
89 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff, 12 % Ficoll, 0,8 % SDS, 0,02 % Xylenyanol FF, 0,01 % Bromphenolblau, 1 mg/ml Proteinase K, pH 8,0
Bei der Herstellung der denaturierenden Stopplösung wurden alle Komponenten für 50 ml Endvolumen eingesetzt, jedoch lediglich bis 47,5 ml mit ddH₂O aufgefüllt. Die

restlichen 5 % (v/v) wurden für jeden Assay nach Bedarf mit frisch aufgetautem Proteinase K Stock (20 mg/ml) vervollständigt.

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Affinitätsmaterial:

- HisTrap FF crude Säulen (1 ml) – GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- Strep-Tactin®-Superflow® Säulenmaterial – IBA GmbH, Göttingen

Gelfiltrationsmaterial:

- Illustra NAP™-5 Säulen – GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- MicroSpin™ G-25 Columns – GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- PD10 Säulen, Sephadex G25-M – GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Weitere:

- Cellulose-Acetat Filter (0,45 µm Porengröße) – Sartorius AG, Göttingen
- Micro Bio-Spin® Chromatography Column – BioRad Laboratories, München
- D-Tube™ Dialyzer Midi, MWCO 3,5 kDa – Merck KGaA, Darmstadt
- Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran (0,45 µm Porengröße) – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Multiply® Pro 0,2 ml PCR Einzelgefäße – SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- PolyPrep® Chromatography Columns (0,8 x 4 cm) – BioRad Laboratories, München
- Roti®-PVDF Membran – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Zellophanmembran, 35 x 45 cm – biostep GmbH, Jahnsdorf
- Zellophanfolie 24 x 24 cm bzw. 14 x 14 cm – Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.7 Ausgewählte Geräte und Software

Geräte:

- Avanti J-30I – Beckman Coulter GmbH, Krefeld
- BAS-Kassetten 2040 – FUJIFILM Japan, Tokyo, Japan
- Chromatographiekühlschrank Forma FRCR5004V – Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA
- CR 35 Bio - raytest Isotopenmessgeraete GmbH, Straubenhardt
- Dark Reader DR46B Transilluminator – Clare Chemical Research, Inc., Dolores, USA
- Gelrockner, Phero-Temp 60 – Biotec-Fischer, Reiskirchen
- Imaging Plates, 20 x 40 cm und 43 x 40 cm – FUJIFILM Japan, Tokyo, Japan
- Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100 TR – Packard Instrument Company, Meriden, USA
- Mikrotek ScanMaker i900 – Microtek, Hsinchu, Taiwan
- Model EP-1 EconoPump – BioRad Laboratories, München
- Niederdruck-Flüssigchromatographie-System BioLogic LP – BioRad Laboratories, München
- PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S – Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Roller Mixer SRT1 Stuart Scientific – Bibby Sterilin Ltd, Staffordshire
- Sequenziergelglasplatten, GIBCO BRL S2, 39,4 cm x 33,3 cm, 41,9 cm x 33,3 cm – Biometra GmbH,

Göttingen

- Sequenziergelkammer GIBCO BRL S2 – Biometra GmbH, Göttingen
- Sequenziergelkamm mit 32 Taschen 0,4 mm – Biometra GmbH, Göttingen
- Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD 2070 – BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
- Spacer-Set 0,4 mm – Biometra GmbH, Göttingen
- Taumelschüttler Rocky – R&S Laborfachhandel, München
- TE77XP Semidry Blotter – Hoefer Inc., Holliston, USA
- Thermo Cooler – Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
- Thermomixer compact – Eppendorf AG, Hamburg
- Thermo Shaker TS-100 – Lab4you GmbH, Berlin
- ThermoStat Plus – Eppendorf AG, Hamburg
- T personal PCR– Biometra GmbH, Göttingen
- UV/VISible Spectrometer Ultrospec 1000 – Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
- Whatman Multigel-Long – Biometra GmbH, Göttingen
- Vortex-Zentrifuge – NeoLab, Heidelberg

Software:

- AIDA Image Analyzer 4.50 – raytest Isotopenmessgeraete GmbH, Straubenhardt
- ImageJ, Version 1.44p – Wayne Rasband, National Institute of Health USA,
Freeware: <http://imagej.nih.gov/ij>
- LP Data View™ Version 1.01, Bio Logic – BioRad Laboratories, München
- pipett, Version 1.0.2009.03.10 – Amerigomedia, Thomas Gottfried

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Genstrukturen und Klonierung

2.2.1.1 Bioinformatische Analysen

Informationen und genomische Sequenzen zu *A. thaliana*-Genen stammen von The Arabidopsis Information Resource (TAIR - www.arabidopsis.org), Sequenzinformationen zu den Homologen in anderen Pflanzen stammen aus der Phytozome-Datenbank (Version 9.1, <http://www.phytozome.net/>) und wurden teilweise manuell korrigiert. BLAST-Analysen (*Basic Local Alignment Search Tool*) wurden auf den Seiten des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und dem DOE Joint Genome Institute (JGI, <http://www.jgi.doe.gov/>) durchgeführt. Für die manuelle Verbesserung der codierenden Sequenzen und die Bestimmung der Homologien wurden paarweise Alignments mit dem Programm MegAlign nach dem Lipman-Pearson-Algorithmus mit den Standardeinstellungen (*Ktuple* = 2, *gap penalty* = 4, *gap length penalty* = 12) durchgeführt.

Multisequenzalignments wurden mit dem MUSCLE-Algorithmus (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, Edgar, 2004) auf <http://www.ebi.ac.uk/> mit den dortigen Standardeinstellungen durchgeführt. Die Berechnung des Stammbaumes aus diesen Alignments erfolgte mit dem Programm

MEGA 5.2 nach der *Minimum Evolution*-Methode mit dem *Close-Neighbor-Interchange*-Algorithmus (*search level 2*). Die Phylogenie wurde über die *Bootstrap*-Methode mit 1000 Replikaten getestet. Für die Domänenanalyse wurden der SMART-Webserver (*Simple Modular Architecture Research Tool*, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) und ScanProsite (<http://www.expasy.org/>) verwendet. Für die Untersuchungen der *chromo-like* Domäne wurden darüber hinaus Modellierungen der dreidimensionalen Struktur mit Phyre2 (Kelley und Sternberg, 2009) und SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der cDNAs

Für die Bestimmung der genauen cDNA-Sequenzen von AtGEN1 (Genlokus: At1g01880) und AtSEND1 (Genlokus: At3g48900) wurden in einem ersten Schritt die genomischen Sequenzen in Hinblick auf benachbarte Gene und auf potentielle alternative ORF-Grenzen untersucht. Daraufhin wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Primer designt und mit diesen Gesamt-cDNA auf das Vorhandensein der jeweiligen Sequenzen hin untersucht. Für diese Gesamt-cDNA wurde Gesamt-RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) aus ca. zwei Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen (Ökotyp Columbia) gewonnen und mit dem RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit und dem OligodT-Primer nach Herstellerangaben in DNA umgeschrieben.

Für die genaue Bestimmung der cDNA-Sequenzen wurden die *full length* cDNAs von AtGEN1 (Primer „MB-GEN fw 2“ und „MB-GEN 4 rv“) und AtSEND1 (Primer „MB-Send fw 2“ und „MB-Send 3 rv“) mittels der Phusion-DNA-Polymerase amplifiziert. Nach einem Zwischenklonierungsschritt in pGEM-T Easy zur Vermehrung wurden die ORFs inklusive Teilen der 5'- und 3'UTRs sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz).

2.2.1.3 Klonierung der Expressionskonstrukte

Rekombinantes AtGEN1 bzw. AtSEND1 und deren AS-Austauschvarianten wurden zunächst mit N-terminalem His-Tag und C-terminalem StrepII-Tag kloniert, wobei beide Tags über einen PreScission Proteaseverdau abtrennbar sein sollten. Hierzu musste der Vektor pETDuet-1-StrepII um die PreScission Protease Erkennungssequenzen (PCS = *PreScission protease cleavage site*) ergänzt werden, welches mit einer zweiteiligen Klonierung erreicht wurde.

Hierfür wurden zwei Linker aus 5'-phosphorilierten Oligonukleotiden (Tabelle 2.3) annealt. In Zusammenarbeit mit Frau Julia Gebhardt wurde der PCS-2-Linker über die KpnI-Schnittstelle in die MCS2 des pETDuet-1-StrepII kloniert (Gebhardt, 2010). Zusätzlich wurde über den Linker die Erkennungssequenz für AgeI direkt 3' der PCS neu hinzugefügt. Das resultierende Plasmid wurde pETDuet-1-StrepII-PS-C benannt und liefert für sich die Möglichkeit, spezifisch nur den C-terminalen StrepII-Tag des rekombinanten Proteins abzuspalten, was beispielsweise für die spezifische Elution im Lauf einer Aufreinigung genutzt werden könnte.

In die MCS1 des pETDuet-1-StrepII-PS-C wurde über die BamHI-Schnittstelle der PCS-1-Linker kloniert, womit gleichzeitig die Schnittstelle für das Restriktionsenzym NheI eingebracht wurde. Der neue Vektor wurde pETDuet-1-StrepII-PS benannt (Vektorkarte in Abbildung 9.1).

Ausgehend von den im pGEM-T Easy-Vektor vorliegenden cDNA-Sequenzen wurden die AtGEN1- und AtSEND1-ORFs über PCR mit Überhängen versehen, welche die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI und KpnI enthielten. Die hierfür und alle weiteren Klonierungsarbeiten

verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Über die angefügten Restriktionsschnittstellen wurden die ZielORFs *in frame* mit beiden PCS und Tags in den Vektor pETDuet-1-StrepII-PS kloniert.

Die AS-Austauschvarianten AtGEN1 D163A (und analog für AtSEND1 D165A) wurden über Overlap-Extension-PCR mit der jeweiligen cDNA in pGEM-T-Easy als Templates erzeugt.

Da sich die rekombinanten Proteine mit N-terminalem Tag im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Herrn Dominik Graf als inaktiv herausstellten (Graf, 2010), wurden neue Expressionskonstrukte kloniert. Diese sollten die in Abbildung 2.1 gezeigte Organisation der rekombinanten Proteine mit natürlichem N-Terminus und C-terminaler PCS+His-Tag+StrepII-Tag aufweisen.

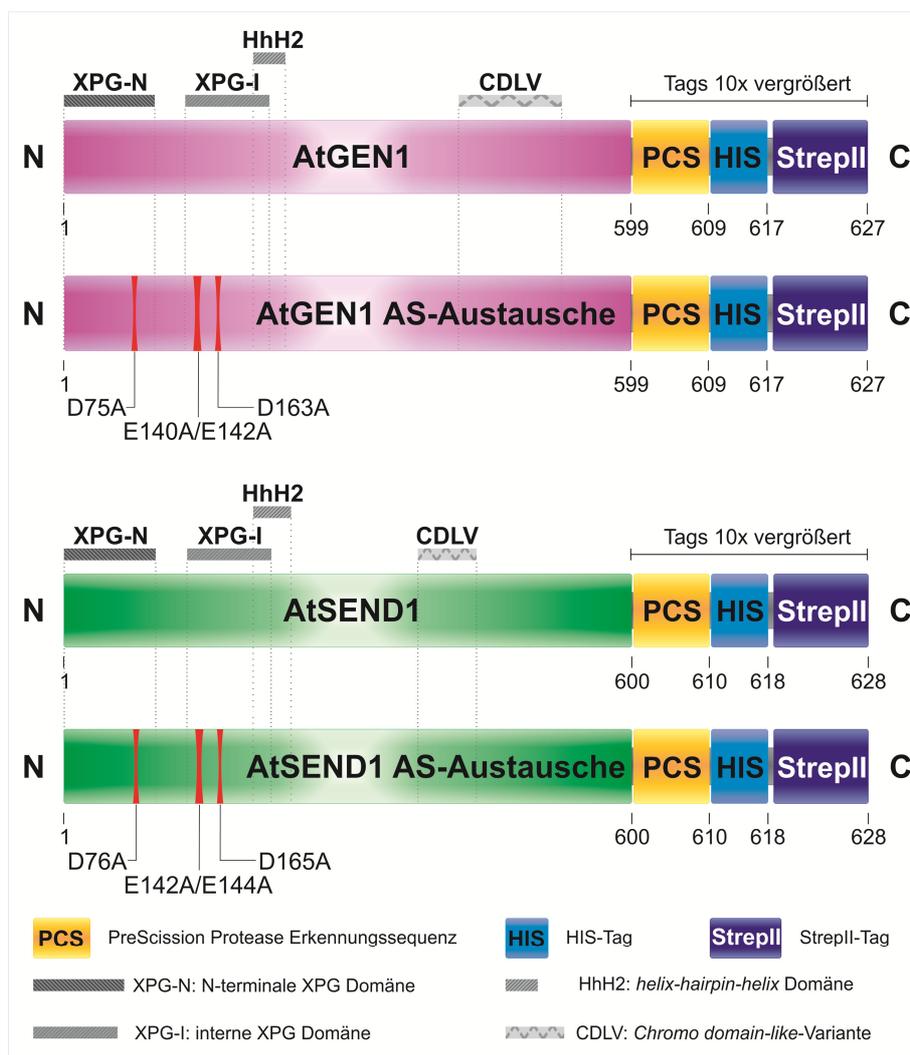


Abbildung 2.1: Übersicht und Aufbau der verwendeten rekombinanten Proteine

Gezeigt ist sowohl die Domänenstruktur von AtGEN1 und AtSEND1 inklusive der neu identifizierten *Chromo domain-like*-Variante (CDLV, siehe Kapitel 3.1.3), als auch der Aufbau der für die Charakterisierung verwendeten rekombinanten Proteine. Die Proteine beginnen mit ihrem natürlichen Methionin und sind am N-Terminus unverändert. C-Terminus wurden für die Aufreinigung über Ni-IMAC und Streptactin-Affinitätschromatographie je ein His- und StrepII-Tag angehängt, welche über die Erkennungssequenz der PreScission Protease (PCS = *PreScission protease cleavage site*) abspaltbar sind. Tags und PCS sind im Gegensatz zu AtGEN1, AtSEND1 und ihren Domänen zur besseren Sichtbarkeit zehnfach vergrößert dargestellt. D75A, E140A/E142A, D163A, D76A, E142A/E144A und D165A markieren die Position der vorgenommenen Aminosäure Austausch in AtGEN1 bzw. AtSEND1.

Dafür wurde ein, die für den His-Tag codierende Sequenz tragender, Linker über die Agel-Schnittstelle in den Vektor pETDuet-1-StrepII-PS-C inkloniert. Der resultierende Vektor pETDuet-1-HisStrepII-PS-C (Vektorkarte in Abbildung 9.2) bildete die Basis aller für die Charakterisierung verwendeten Konstrukte in dieser Arbeit.

AtGEN1 D75A, AtGEN1 E140A/E142A, AtSEND1 D76A und AtSEND1 E142A/E144A wurden mit den anfänglich klonierten Expressionskonstrukten ohne AS-Austausch als Template über Overlap-Extension-PCR erzeugt. Alle ORFs würden über NcoI und KpnI in den Vektor pETDuet-1-HisStrepII-PS-C kloniert.

2.2.2 Herstellung der rekombinanten Proteine für die Charakterisierung

2.2.2.1 Expression

Für die heterogene Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* wurden je 100 µl hitzeschockkompetente ER2566 Zellen mit je 1 µl Expressionskonstrukt-Miniprep und 1 µl des Chaperonplasmids pTf16 (Takara) cotransformiert und auf LB-Ampicillin/Chloramphenicol-Platten (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Chloramphenicol) ausplattiert. Von den über Nacht bei 37 °C gewachsenen Kolonien wurden je 10 Kolonien/ml verwendet, um die Vorkulturen (LB-Medium plus 75 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) anzuimpfen. Diese wurden wiederum über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Vor Animpfen der Hauptkulturen mit 1/10 Volumen Vorkultur (Endvolumen der Hauptkultur 550 ml), wurde das Hauptkulturmedium mit 0,5 mg/ml L-Arabinose zur Induktion der Chaperonexpression versetzt. Auf eine Zugabe von Antibiotika zu den Hauptkulturen wurde verzichtet.

Nach Animpfen der Hauptkulturen wurden diese bei 28 °C und 200 rpm inkubiert und die OD₆₀₀ überwacht, bis diese einen Wert von ca. 0,7 erreicht hatte. Dann wurde die Temperatur über einen Zeitraum von 30 min auf 16 °C gesenkt. Anschließend erfolgte die Expressionsinduktion der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 0,2 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 3 h bei 16 °C und 200 rpm.

Nach Ablauf der Expressionszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 g und 4 °C geerntet. Dabei wurden alle Hauptkulturen eines Proteins gleichmäßig auf die Pellets verteilt, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Pellets zu gewährleisten. Je 1100 ml Kultur ergaben dabei ein Pellet mit den folgenden Nassgewichten: 3,2 g (AtGEN1), 3,5 g (AtGEN1 D75A), 2,6 g (AtSEND1) und 3,1 g (AtSEND1 D76A).

2.2.2.2 Aufreinigung und Lagerung

Die Aufreinigung des rekombinanten AtGEN1, AtSEND1 und der AS-Austauschvarianten erfolgte über eine Doppelaufreinigung aus Streptactin-Affinitätschromatographie und Nickel Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Ni-IMAC).

Alle Schritte wurden entweder auf Eis oder bei 4–10°C im Chromatographiekühlschrank durchgeführt.

1. Aufreinigung: Streptactin-Affinitätschromatographie

Für die Streptactin-Aufreinigung wurden je Konstrukt drei Gravitationssäulen verwendet, die um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, nur für die gleichen Konstrukte wiederverwendet wurden. Das Säulenbettvolumen betrug je 1 ml (= 2 ml 50 %-Suspension).

Zellaufschluss und Vorbereitung der Ladefraktion

1. Für jede Aufreinigung wurden je zwei Pellets auf Eis aufgetaut, in einem Gesamtvolumen von 75 ml P500GF S resuspendiert und gleichmäßig auf drei Ansätze verteilt.
2. Je Ansatz wurden 250 µl Lysozym Stock (10 mg/ml, frisch angesetzt in P500GF S) zugegeben.
3. Es folgten 30 min Inkubation in Eis auf dem Taumelschüttler
4. Die Zellen wurden über Ultraschall aufgeschlossen: 6 Zyklen (Leistung 53 %, Duty Cycle 5,0 %, 10 sec) mit jeweils 1 min Abkühlphase auf Eis
5. Lösliche und unlösliche Fraktion wurden über Zentrifugation für 30 min bei 40.000 g, 4 °C getrennt.
6. Der Überstand wurde durch Einmal-Spritzenfilter GF/PET-Membran filtriert und mit 1 µg/ml Avidin (1 mg/ml Stock) versetzt.

Säulenvorbereitung

Währenddessen wurden die Säulen mit jeweils 20 ml P500GF S äquilibriert. Dabei wurde über einen Silikonschlauch (Innendurchmesser 1,6 mm) und eine Schlauchklemme die Flussrate auf 15 – 17 Tropfen/min eingestellt. (= ca. 1 ml/min)

Chromatographie und Säulenregeneration

1. Die fertigen Ladefraktion wurden auf die äquilibrierten Säulen geladen und der Durchfluss aufgefangen.
2. Es wurde drei Mal mit je 4,6 ml P500GF S gewaschen.
3. Die Elution erfolgte nach folgendem Schema:
 - 1x 780 µl P500GF SE (entspricht dem Totvolumen von Säule und Schlauch) → E_{Strep1}
 - 1x 3 ml P500GF SE → E_{Strep2}
 - 1x 1 ml P500GF SE → E_{Strep3}
4. Die Säulen wurden mit je 12 ml P500GF SE nachgespült.
5. Die Säulenregeneration und -konservierung erfolgte mit je 25 ml P500GF SR.

Ladefraktion für Ni-IMAC

1. Die Elutionsfraktionen E_{Strep2} aller drei Säulen wurden vereint.
2. Für die Ni-IMAC wurde der Pool auf 20 mM Imidazol (mit 2 M Stock) eingestellt.

2. Aufreinigung: Nickel Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Ni-IMAC)

Für jedes rekombinante Protein wurde eine eigene HisTrap FF crude Säule verwendet, wiederum um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Säulenvorbereitung:

Die Proteine mit AS-Austausch wurden an der Biologic LP Anlage, AtGEN1 und AtSEND1 wurden

dazu parallel bis einschließlich des Waschens an der Peristaltikpumpe prozessiert. Die Elution erfolgte dann an der Biologic LP Anlage. Sofern nicht anders angegeben, lag die Flussrate bei 1 ml/min.

1. Spülen der Säulen mit 20 ml ddH₂O
2. Entfernen der Nickel-Ionen von der Säule mit 10 ml Stripping Puffer
3. Spülen der Säulen mit ddH₂O bis die Leitfähigkeit Null erreicht hatte
4. Beladung der Säulen mit 0,5 ml 0,1 M NiSO₄
5. Spülen der Säulen mit ddH₂O bis die Leitfähigkeit Null erreicht hatte
6. Spülen der Säulen mit 10 ml P500Ni20
7. Spülen der Säulen mit 10 ml P500Ni400
8. Äquilibrieren der Säulen mit 10 ml P500Ni20

Chromatographie:

1. Laden der Ni-IMAC-Ladefraktion mit einer Flussrate von 0,25 ml/min, Auffangen des Durchflusses
2. Waschen:
 - 1x 45 ml P500Ni20 + 0,1 % Triton
 - 1x 15 ml P500Ni20
3. Elution:
 - 15 ml 47 % P500Ni400/53 % P500Ni20 (= 198,6 mM Imidazol), Auffangen in 1 ml-Fraktionen
 - 10 ml P500Ni400, Auffangen in 1 ml-Fraktionen
4. Säulenregeneration und -konservierung:
 - 1x 20 ml P500Ni400
 - 1x 20 ml ddH₂O
 - 1x 20 ml 20 % EtOH

Umpuffern und Lagerung

Der Proteingehalt der Ni-IMAC-Elutionsfraktionen Nr. 2 bis 8 wurden über den Bradford-Assay im Mikromaßstab (45 µl Elutionsfraktion + 955 µl Bradford-Mastermix (= 200 µl Bradford-Reagenz + 755 µl ddH₂O)) bestimmt. Die vier Elutionsfraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereint und über eine PD-10 Säule umgepuffert in P500GF S.

1. Äquilibrieren der Säule mit 20 ml P500GF S
2. Laden von 2,5 ml vereinte Elutionsfraktionen
3. Elution mit 3,5 ml P500GF S

Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden nach dem Umpuffern mit dem gleichen Volumen 100 % Glycerin gemischt (daraus resultierende Lagerbedingung: 50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 50 % Glycerin, 0,5 mM DTT, 0,05 % Tween20, pH 8,0) und bis zur Aliquotierung bei -20 °C gelagert.

Die fertigen Proteinpräparationen wurden in Multiply® Pro 0,2 ml PCR Einzelgefäßen zu Volumina von 10, 20 und 40 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Von jeder Aufreinigung wurde P500GF S +G für spätere Enzymverdünnungen aliquotiert.

2.2.2.3 Proteindetektion: SDS-PAGE und Western Blots

Die Auftrennung der Proteine in dieser Arbeit erfolgte über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli, 1970. Dabei wurden 10 % Acrylamid-Gele verwendet, zu deren Sammelgelen (5 % Acrylamid) eine geringe Menge Bromphenolblau gegeben wurde, um die Taschen besser sichtbar zu

machen. Die Gelläufe der 1,5 mm dicken Gele erfolgten im PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S von Peqlab Biotechnologie GmbH. Es wurde standardmäßig ein Kamm mit 36 Taschen verwendet. Das Standardladevolumen betrug 30 µl fertige Probe (15 µl 2x Laemmli-Ladepuffer plus 15 µl zu analysierende Probe). Die Proben wurden direkt vor dem Gellauf für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Coomassie-Brilliant-Blue-Kolloidalfärbung

Zur Kolloidalfärbung nach Neuhoff *et al.*, 1988 wurden die Polyacrylamidgele in der Coomassie-Färbelösung (siehe Abschnitt 2.1.5) über Nacht auf dem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurde bis zum gewünschten Entfärbungsgrad des Hintergrunds mit dH₂O gewaschen und die Gelbilder mittels eines Microtek ScanMaker i900 dokumentiert.

Semi-Dry-Western Blot und Immunodetektion

Es wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Carl Roth GmbH + Co. KG) verwendet, welche vor der Benutzung zur Überwindung ihrer Hydrophobizität mit vergälltem Ethanol inkubiert wurde. Anschließend wurde sie kurz mit ddH₂O gewaschen und für fünf Minuten in Anodenpuffer II äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde unmittelbar nach Beendigung des Gellaufs mindestens 10 min in Kathodenpuffer für PVDF-Membran inkubiert. Anschließend wurde der Blotstapel gemäß Abbildung 2.2 aufgebaut. Geblottet wurde für 2 h bei einer Stromstärke (in mA), die dem 0,8-fachen der Membranfläche (in cm²) entsprach. Zur Fixierung der Proteine auf der Membran wurde diese über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Immunodetektion wurde die Membran zuerst mit vergälltem Ethanol benetzt, dreimal 5 min auf dem Rollenschüttler mit 40 ml 1xTBS gewaschen, für 10 min mit Avidin (1 µg/ml in 1xTBS) blockiert und anschließend für 1 h mit Blockierlösung inkubiert. Danach wurde dreimal mit je 40 ml 1xTBS-T* gewaschen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit Primärantikörperlösung, welche im Falle der Entwicklung nach dem His-Tag den His-Tag[®] Monoclonal Antibody in einer 1:1333 Verdünnung enthielt, bzw. im Falle der Entwicklung nach dem Strep-Tag II das Strep-Tactin[®] AP Conjugate (1:4000 verdünnt).

In letzterem Fall wurde die restliche Antikörperlösung durch zweimaliges Waschen mit 20 ml 1xTBS-T* und weiterem zweimaligem Waschen mit je 20 ml 1xTBS entfernt.

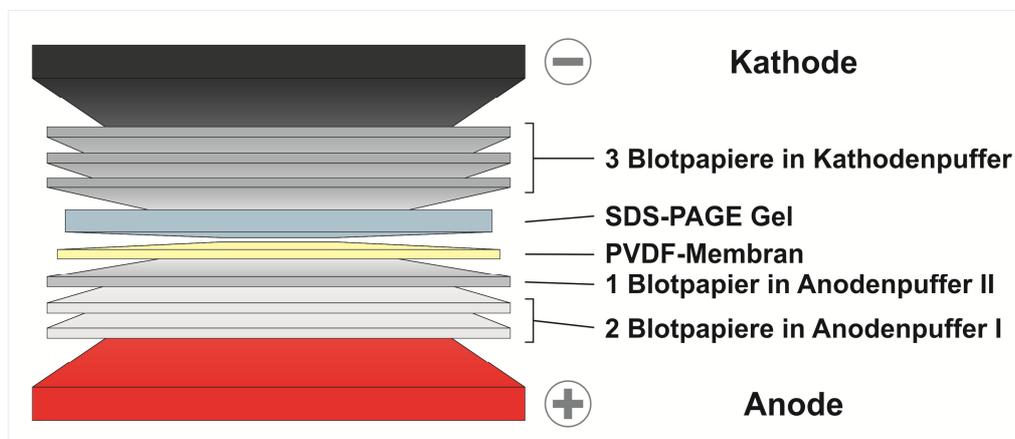


Abbildung 2.2: Aufbau des Semi-Dry-Western Blot-Stapels

Die Blotpapiere wurden im jeweiligen Puffer getränkt, das Gel wurde mindestens 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert.

Im Falle der Entwicklung nach dem His-Tag folgte auf den Primärantikörper erneutes dreimaliges Waschen mit je 40 ml 1x TBS-T* und eine 45minütige Inkubation mit Sekundärantikörperlösung (Goat Anti-Mouse Alkaline Phosphatase Conjugate (1:10000)). Erst danach wurde wie bereits beschrieben je zwei Mal mit 1xTBS-T* und 1xTBS gewaschen.

Die Färbereaktion wurde im Dunkeln durch einfaches Übergießen der Membran mit frisch angesetzter Färbelösung gestartet. Zum Abstoppen wurde die Membran ausgiebig mit ddH₂O gespült. Nach Trocknung bei RT wurden die Blots zur Dokumentation eingescannt und dunkel gelagert.

2.2.2.4 Proteinquantifizierung

Die Aliquots der umgepufferten und mit Glycerin gemischten Elutionsfraktionen der Proteinaufreinigung wurden für die Quantifizierung der Proteinmenge/-konzentration über eine BSA-Eichreihe verwendet. Dazu wurden auf einem 10 % SDS-PAGE-Gel verschiedene Mengen BSA-Eichstandard sowie Proteinproben nebeneinander aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade aus den Integralen der Graustufeneinheiten (bestimmt mit dem Freeware-Programm ImageJ) erstellt und anhand dieser die Proteinkonzentration für die aufgereinigten rekombinanten Proteine errechnet.

2.2.3 Endonuklease-Assays

Die Charakterisierung von AtGEN1 und AtSEND1 beruhte hauptsächlich auf Endonuklease-Assays mit oligonukleotidbasierenden Modellsubstraten, welche *in vivo* Strukturen im *in vitro*-System nachahmen. Dabei wird ein bestimmtes Substrat, welches eine radioaktive Markierung an einem der Oligonukleotide trägt, unter definierten Bedingungen mit der entsprechenden Nuklease inkubiert und die Reaktion nach einer definierten Zeit abgestoppt. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgt autoradiographisch nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte.

2.2.3.1 Herstellung ³²P-markierter Substrate und Quantifizierung

Eine vollständige Modell-HJ setzte sich aus vier Oligonukleotiden zusammen, von denen jeweils nur eines mit ³²P radioaktiv markiert wurde. Von jeder HJ wurden 4 Varianten hergestellt, die sich darin unterschieden, welcher Strang das 5'-³²P trug (1* bis 4*). Die einzige Ausnahme hiervon stellte die pmHJ dar, da diese lediglich als Substrat für das Screening auf Aktivität verwendet wurde. Hier wurden nur jeweils die Stränge 1 und 2 markiert.

Für die Replikationsgabelsubstrate wurden die parentalen Stränge radioaktiv markiert: entweder Strang 1 (1*) oder Strang 2 (2*).

Die vier 5'-Flapssubstrate wurden so aufgebaut, dass die Anordnung der einzelnen (Teil-)Stränge der Anordnung in der X0-HJ entsprach (Tabelle 2.5).

Bei den getesteten genickten Duplices entsprach das 60 nt Oligonukleotid Strang 4 der X26-HJ. Nähere Details zur Zusammensetzung Modell-DNA-Substrate sind Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.5: Herstellung der oligonukleotidbasierenden Modellstrukturen

Fett gedruckte Oligonukleotidnamen zeigen die Oligonukleotide an, von welchen immer jeweils eines am 5'-Ende durch ein radioaktives ^{32}P markiert wurde. Die Verhältnisse sind molare Verhältnisse. Alle mit "Gelextr." gekennzeichneten Substrate wurden über Gelextraktion aufgereinigt.

Holliday Junctions (HJ)				
X26-HJ	Annealing A: X26-1 + X26-4 (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	Gelextr.
	Annealing B: X26-2 + X26-3 (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
X26-S-HJ	Annealing A: X26-1 + X26-4 (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	-
	Annealing B: X26-2S + X26-3S (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
X0-HJ	Annealing A: X0-lp-1 + X0-lp-4 (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	Gelextr.
	Annealing B: X0-lp-2 + X0-lp-3 (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
nX-30	X26-1 + X26-2 + X26-3a30 + X26-3b30-P + X26-4	➤	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT	Gelextr.
	markiertes Oligonukleotid 1 : 4 unmarkierte Oligonukleotide			
nX-32	X26-1 + X26-2 + X26-3a32 + X26-3b28-P + X26-4	➤	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT	Gelextr.
	markiertes Oligonukleotid 1 : 4 unmarkierte Oligonukleotide			
pmHJ	Annealing A: X0-1 + X02 (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	-
	Annealing B: XM3a + XM4 (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
Replikationsgabeln (RF)				
RF1 32/32	Annealing A: X26-1 + X26-4b32-P (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	Gelextr.
	Annealing B: X26-2 + X26-3a32 (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
RF2 31/32	Annealing A: X26-1 + X26-4-3'31-P (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	Gelextr.
	Annealing B: X26-2 + X26-3a32 (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
RF3 27/30	Annealing A: X26-1 + X26-4b27-P (1 : 1)	➤	Annealing A und Annealing B vereint, 30 min Inkubation bei 37 °C, 30 min Inkubation bei RT	Gelextr.
	Annealing B: X26-2 + X26-3a30 (1 : 1)			
	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT			
X0-5'-Flaps und X0-3'-Flap				
5'-Flap1	X0-lp-1 + X0-lp-2 + X0-lp-3a30 (1 : 4 : 4)	➤	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT	Gelextr.
5'-Flap2	X0-lp-2 + X0-lp-3 + X0-lp-4a30 (1 : 4 : 4)			
5'-Flap3	X0-lp-3 + X0-lp-4 + X0-lp-1a30 (1 : 4 : 4)			
5'-Flap4	X0-lp-4 + X0-lp-1 + X0-lp-2a30 (1 : 4 : 4)			
3'-Flap1	X0-lp-1 + X0-lp-4 + X0-lp-3b30 (1 : 4 : 4)	➤	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT	Gelextr.
Genickte Duplices				
nD30/30	X26__1-30 + X26-3b30-P + X26-4 (1 : 1 : 1)	➤	5 min 95 °C, Abkühlen auf RT	-
nD31/30	X26__1-31 + X26-3b30-P + X26-4 (1 : 1 : 1)			
nD32/28	X26__1-32 + X26-3b28-P + X26-4 (1 : 1 : 1)			
nD33/28	X26__1-33 + X26-3b28-P + X26-4 (1 : 1 : 1)			

Radioaktive Markierung

Für die radioaktive Markierung der einzelnen Oligonukleotide wurde [γ - ^{32}P] ATP mit 6000 Ci/mmol, was 66 % Markierungsrate entspricht, verwendet. Zu einem pmol zu markierendem Oligonukleotid wurden 0,2 – 0,6 pmol radioaktives [γ - ^{32}P] ATP zugesetzt. Der Markierungsansatz wurde für 60 min bei 37 °C mit 0,4 U/ μl T4 Polynukleotid Kinase inkubiert. In dieser Zeit katalysiert die T4 Polynukleotid Kinase die Übertragungsreaktion des γ -Phosphats des [γ - ^{32}P] ATP auf den 5'-Hydroxylterminus des Oligonukleotids. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 67 °C für 25 min abgestoppt.

Um die Oligonukleotide (markierte und unmarkierte) vom Reaktionsprodukt ADP und überschüssigem, nicht umgesetztem [γ - ^{32}P] ATP abzutrennen, wurden alle Markierungsansätze über zwei aufeinanderfolgende MicroSpin™ G-25 Gelfiltrationssäulen (Vorbereitung nach Herstellerangaben, Elution jeweils 2 min bei 4000 rpm in einer Neolab Tischzentrifuge mit Vortexer) aufgereinigt. Für die Berechnung der Markierungsrate und die weitere Substratherstellung wurde eine Elutionseffizienz von 90% je G25-Säule angenommen. Somit war eine Gesamtwiederfindungsrate von 81 % anzunehmen. Zudem wurde die Volumenzunahme durch die Gelfiltration für die Weiterprozessierung berücksichtigt. Die Aktivität in Zerfällen pro Minute (DPM) wurde im Liquid Scintillation Counter (LSC) gemessen (1 μl Eluat auf 4 ml LSC-Cocktail).

Für das Annealing der vollständigen Substrate in einem Ein-Annealing-Protokoll oder von Teilstrukturen im Zwei-Schritt-Protokoll wurden markierte und unmarkierte Oligonukleotide (Verhältnisse siehe Tabelle 2.5) in 1x PNK-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert und über 2 – 3 h auf Raumtemperatur abgekühlt. Beim Zwei-Schritt-Protokoll wurden die Teilstrukturen aus dem ersten Annealing zu einem zweiten Annealing vereint und zuerst für 30 min bei 37 °C inkubiert, gefolgt von 30 min bei Raumtemperatur (Gari *et al.*, 2008). Von Substraten, die keiner Gelextraktion unterzogen wurden (siehe Tabelle 2.5), wurde anschließend in Triplikaten die DPM/ μl im LSC gemessen.

Gelextraktion

Alle Substrate, deren genaues Schnittmuster bestimmt werden sollte, und alle Modelljunctions, bei deren Herstellung ein Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden eingesetzt wurde, wurden über Extraktion aus 10 % TBE-Polyacrylamidgelen aufgereinigt. Die Elution aus den ausgestanzten Gelstücken erfolgte in gekühltem 0,5 x TBMgCl₂ mit D-Tube™ Dialyzern für 4h bei 100 V. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Polarität der Laufkammer umgekehrt und für 2 min 200 V angelegt, um die eluierte DNA von der Dialysemembran zu lösen. Anschließend wurde das Eluat durch Auf- und Abpipettieren gemischt und dabei insbesondere auch die Membran abgespült, um Verluste weiter zu minimieren. Nach Überführung in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß wurde die Aktivität in DPM von je 1 μl im LSC gemessen.

Quantifizierung der fertigen DNA-Substrate

Für die Bestimmung der Substratkonzentration werden folgende Größen verwendet:

- Die Aktivität A [Ci oder Becquerel] von z.B. 1 μl des fertigen (aufgereinigten) DNA-Substrats. Dabei ist 1 Bq = 1 Zerfall/Sekunde = $2,7027 \cdot 10^{-11}$ Ci. Somit beschreibt die Aktivität die mittlere Anzahl an Atomkernen, die pro Sekunde zerfällt.
- Die spezifische Aktivität A_{spez} [Ci/mmol] des markierten und von überschüssigem [γ - ^{32}P] ATP befreiten Oligonukleotids. Dabei beschreibt A_{spez} die Anzahl an Zerfällen pro Zeiteinheit, bezogen auf die Stoffmenge.

Die spezifische Aktivität des Oligonukleotids ist der Quotient der Aktivität A und der Stoffmenge N und kann berechnet werden über die allgemeine Formel:

$$A_{\text{spez}} = \frac{A}{N} \quad (\text{I})$$

Zum Zeitpunkt t_0 (mit t_0 in Tagen), nach Markierung und Aufreinigung über zwei MicroSpin™ G-25 Columns, entspricht dies mit der oben beschriebenen Elutionseffizienz der Gelfiltration:

$$A_{\text{spez}}(t_0) = \frac{A_1(t_0)}{N(t_0)} \quad \text{Beispiel 1}$$

(mit $A_1(t_0)$ = Aktivität pro $1\mu\text{l}$ * Volumen nach 2x G25, $N(t_0) = 0,81$ * Stoffmenge des eingesetzten Oligonukleotids)

Wird das markierte Oligonukleotid noch am gleichen Tag nur über Schritte, bei denen die Wiederfindungsrate bzw. die Verdünnung bekannt sind, weiterprozessiert, kann die Konzentration einfach errechnet werden (Konzentration = berechnete Stoffmenge / berechnetes bzw. bestimmtes Volumen). Kann man die Stoffmenge nicht einfach berechnen, z.B. weil man eine Gelextraktion angeschlossen hat und die Wiederfindungsrate nicht kennt, kann die Konzentration des Substrats $c(t_0)$ nach Messung der Aktivität in der Probe nach z.B. dem Aufreinigungsschritt ($A_2(t_0)$) entsprechend Formel (II) berechnet werden:

$$c(t_0) = \frac{A_2(t_0)/V}{A_{\text{spez}}(t_0)} \quad (\text{mit } V = \text{für die LSC-Messung eingesetztes Volumen}) \quad (\text{II})$$

Da weitere Prozessierungsschritte nicht immer am gleichen Tag erfolgen und mit den jeweiligen Substraten Versuche über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, muss man die Substratkonzentration für jeden Zeitpunkt neu berechnen können. Nur so lässt sich gewährleisten, dass die einzelnen Versuche vergleichbar ablaufen.

Zur Bestimmung der Substratkonzentration zu einem späteren Zeitpunkt t_1 bestimmt man die spezifische Aktivität zu diesem Zeitpunkt $A_{\text{spez}}(t_1)$. Um diese zu errechnen, braucht man zuerst die Markierungsrate, welche für den Tag der Markierung (also zum Zeitpunkt t_0) ausgehend von der spezifischen Aktivität am Tag der Markierung $A_{\text{spez}}(t_0)$ berechnet wird.

Berechnung der Markierungsrate ausgehend von der spezifischen Aktivität

Die Formel

$$A = \lambda \cdot N^* \quad \text{bzw.} \quad A(t) = \lambda \cdot N^*(t) \quad (\text{III})$$

beschreibt die Proportionalität der gemessenen Aktivität A zur Menge an radioaktiver Materie N^* (hier: radioaktives ATP) mit dem Proportionalitätsfaktor λ . Dieser berechnet sich aus der Halbwertszeit $T_{1/2}$ ($= \ln 2 / \lambda$), welche für ^{32}P 14,3 Tage bzw. $1,23 \cdot 10^6$ Sekunden beträgt.

$$\lambda = (\ln 2) / 14,3 \text{ d} = 0,0485 \quad (\text{IV})$$

$$\text{bzw.} \quad \lambda = (\ln 2) / T_{1/2}(^{32}\text{P}) = (\ln 2) / (1,23 \cdot 10^6 \text{ sec}) \quad (\text{IV.I})$$

Als Beispiel für die Berechnung der Markierungsrate soll 1 mmol des für die Markierungen verwendeten [γ - ^{32}P] ATP dienen. Zum Kalibrierdatum besaß dieses eine spezifische Aktivität von 6000 Ci/mmol. Demnach hatte ein mmol dieses γ - ^{32}P zum Kalibrierdatum eine Aktivität A von 6000 Ci.

Setzt man dies zusammen mit (IV.I) in (III) ein, erhält man:

$$\begin{aligned}
 6000 \text{ Ci} &= (\ln 2) / 1,23 \cdot 10^6 \text{ sec} \cdot N^* && \text{wobei } 1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq} \\
 N^* &= (6000 \text{ Ci} \cdot 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq/Ci}) / (\ln 2 / 1,23 \cdot 10^6 \text{ sec}) \\
 N^* &= 3,939 \cdot 10^{20} && \text{Beispiel 2}
 \end{aligned}$$

Das heißt, zum Kalibrierdatum t_{kal} waren $3,939 \cdot 10^{20}$ Moleküle ATP radioaktiv. Die Gesamtmenge an ATP betrug 1 mmol, also $N_0 = 10^{-3} \cdot (6,022 \cdot 10^{23}) = 6,022 \cdot 10^{20}$. Daraus ergibt sich eine Markierungsrate M von:

$$M = N^* / N_0 = 3,939 \cdot 10^{20} / (6,022 \cdot 10^{20}) = 0,654 \quad \text{(VI)}$$

Dies bedeutet, dass zum Kalibrierdatum 65,4 % der ATP-Moleküle ein radioaktives ^{32}P an der γ -Position tragen und die restlichen 34,6 % nicht radioaktiv sind. Deshalb kann bei einer Markierung mit diesem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP zum Kalibrierdatum selbst unter Optimalbedingungen die maximale Markierungsrate 65,4 % nicht überschreiten.

Berechnung der spezifischen Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt t

Im Falle eines markierten Oligonukleotids für die Substratherstellung erhält man die Markierungsrate am Tag der Markierung $M(t_0)$ über Umformen der (III) und Einsetzen in (VI).

$$M(t_0) = \frac{N^*(t_0)}{N_0} = \frac{A(t_0)/\lambda}{N_0} \quad \text{(VII)}$$

Über (VI) lässt sich damit $N^*(t_0)$ berechnen. Unter der Annahme, dass der radioaktive Zerfall der $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP-Moleküle diese zwar zerstört, aber keine benachbarten Moleküle beeinflusst, also die Zahl der unmarkierten ATP-Moleküle $N(t_0)$ in der Lösung über die Zeit konstant bleibt, ist es wiederum möglich, $N(t)$ (die Gesamtmenge an ATP zum Zeitpunkt t) zu berechnen über:

$$N(t) = N(t_0) - N^*(t_0) + N^*(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t)} \quad \text{(VIII)}$$

Die Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt t erhält man über das Zerfallsgesetz

$$A(t) = A(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t)} \quad \text{(IX)}$$

Setzt man (VIII) und (IX) in (I) ein, erhält man die spezifische Aktivität zum Zeitpunkt t:

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

Dies kann am Beispiel des $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP mit 6000 Ci/mmol und einer Markierungsrate von 65,7 % (also 0,654 mmol markiertes und 0,346 mmol unmarkiertes ATP) zum Kalibrierdatum veranschaulicht werden. Nach einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen ergibt sich eine spezifische Aktivität von:

$$\begin{aligned}
 A_{\text{spez}}(14,3) &= \frac{6000 \text{ Ci} \cdot e^{(-0,0485 \cdot 14,3)}}{1 \text{ mmol} - 0,654 \text{ mmol} + 0,654 \text{ mmol} \cdot e^{(-0,0485 \cdot 14,3)}} \\
 &= \frac{2999 \text{ Ci}}{0,673 \text{ mmol}} = 4457 \text{ Ci/mmol} && \text{Beispiel 3}
 \end{aligned}$$

Analog können diese Berechnungen auf ein beliebiges ^{32}P -markiertes Oligonukleotid angewandt werden. Sie ermöglichen es, die Substratkonzentration auch dann zu berechnen, wenn der Tag der Markierung (t_0) und der Tag der endgültigen Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung im LSC (t_1) nicht identisch sind. Dies war der Fall für alle in dieser Arbeit über Gelextraktion aufgereinigten DNA-Substrate. Statt (II) gilt dann

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

mit $A(t_1)$ = gemessene Aktivität und $V(t_1)$ = für die LSC-Messung eingesetztes Volumen

wobei $A_{\text{spez}}(t_1)$ über (X) neu berechnet werden muss:

$$A_{\text{spez}}(t_1) = \frac{A(t_1)}{N(t_1)} = \frac{A(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t_1)}}{N(t_0) - N^*(t_0) + N^*(t_0) \cdot e^{(-\lambda \cdot t_1)}} \quad \text{Beispiel 4}$$

Letztendlich kann somit die Substratkonzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt t_2 berechnet werden. Dafür wird (II) verwendet, falls Markierung und Fertigstellung des Substrats am gleichen Tag abgeschlossen waren. (XI) findet Anwendung, falls Markierung und Aufreinigung des Substrats an verschiedenen Tagen stattfanden.

In beiden Fällen muss die Volumenaktivität $A(t_2)/V$ nach dem Zerfallsgesetz,

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

sowie die spezifische Aktivität zum beliebigen Zeitpunkt t_2 $A_{\text{spez}}(t_2)$ nach (X) neu berechnet werden.

2.2.3.2 Durchführung der Endonuklease-Assays

Die Endonuklease-Assays zur Charakterisierung von AtGEN1 und AtSEND1 wurden in PCR-Platten unter an die jeweiligen Enzyme angepassten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei unterschied sich die NaCl-Konzentration zwischen AtGEN1 (50 mM) und AtSEND1 (100 mM). Die restlichen Komponenten waren für beide Enzyme identisch: 25 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl_2 , 1,05 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 0,005 % Tween20 und 5 % Glycerin. Das Tris-HCl und das Tween20 stammen aus dem Eintrag durch den Enzymlagerpuffer. Die Einträge von MgCl_2 und DTT über die Substratlösung und NaCl über den Enzymlagerpuffer konnten mit den Reaktionspufferkomponenten verrechnet werden. Assayansätze mit über Gelextraktion aufgereinigten Substraten enthielten zusätzlich noch 5,56-8,9 mM Borsäure aus der Gelextraktion. Standardmäßig wurden alle Substrate in der Endkonzentration 1,5 nM und Enzym in einer Endkonzentration von 30 nM eingesetzt. Ein Assayansatz (20 μl Gesamtvolumen) bestand in der Regel aus 10 % (v/v) = 2 μl Enzymlösung und 18 μl Mastermix, über welchen die oben beschriebenen Reaktionsbedingungen eingestellt wurden. Enzymverdünnungen und Pufferkontrollen wurden grundsätzlich mit P500GF S+G angesetzt, welcher aus derselben Aufreinigung stammte, wie die verwendeten Proteinaliquots. Für die Zeitkinetikexperimente wurde ein Assayansatz auf die Anzahl der Zeitwerte plus eins hochskaliert, zu den jeweiligen Zeitpunkten ein Reaktionsvolumen entnommen und zu vorgelegter Stopplösung gegeben.

Die Proben wurden unter Kühlung in PCR-Platten vorgelegt, der vorgekühlte Mastermix zugegeben und die Reaktion durch Überführung auf den vorgeheizten Heizblock gestartet. Standardmäßig wurden die Assays für 30 min bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Dabei wurden die Gefäße mit Silikonmatten oder PCR-Deckelketten verschlossen, um die Verdunstung zu minimieren.

Die Termination der Reaktion wurde durch proteolytischen Abbau der Enzyme durch 0,5 mg/ml Proteinase K erreicht. Dabei wurde die Proteinase K als 20 mg/ml Stocklösung entweder zu nativer oder denaturierender Stopplösung gegeben, welche gleichzeitig als Ladepuffer für die Gelelektrophorese fungierten. Nach 15minütiger Inkubation bei 37 °C wurden Proben für die native TBE-PAGE entweder sofort auf die Gele geladen oder bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Denaturierende Proben wurden direkt nach dem Proteinase K-Verdau auf einen vorgeheizten Heizblock mit 95 °C überführt und dort für 10 min hitzedenaturiert. Anschließend wurden die Proben auf einem -20 °C gekühlten Plexiglasblock für 1 – 2 min abgekühlt und dann kurz anzentrifugiert, um das Kondenswasser aus den Deckeln nicht zu verlieren und so die Volumina gleich zu halten. Um der hohen Viskosität der denaturierten Proben durch den hohen Ficoll- und Ureagehalt entgegenzuwirken, wurden die Proben vor dem Laden für einige Sekunden auf 50 – 60 °C erhitzt.

Alle Proben wurden direkt vor dem Laden auf die Gele mit der Mehrkanalpipette noch einmal gründlich gemischt.

Für die Religationsexperimente mit der X26-2S wurden die Assays wie beschrieben bis zur Termination der Reaktion durchgeführt. Anstatt die Reaktion jedoch durch Zugabe von Proteinase K in nativer oder denaturierender Stopplösung zu stoppen, wurden 20 µl-Aliquots von jedem Reaktionsansatz zu vorgelegter T4 DNA Ligase (1000 U/µl, Endkonzentration 40 U/µl) gegeben, gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Ligasereaktion (und auch die Resolvasereaktion) durch Zugabe des gleichen Volumens denaturierender Stopplösung mit Proteinase K (Endkonzentration in der Stopplösung: 1 mg/ml) und 15minütiger Inkubation bei 37°C terminiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem Standardvorgehen der Endonuklease-Assays.

2.2.3.3 Gelextraktion nativer Produktstrukturen und Schnittlängenbestimmung

Zur Bestimmung, welche Schnitte in Strang 1 der genickten HJs welche nativen Produkte (genickter Duplex oder kurzer Duplex) erzeugen, wurden Reaktionsansätze mit einem Reaktionsvolumen von 80 µl (von 20 µl hochskaliert) unter Standardreaktionsbedingungen inkubiert, mit Proteinase K in nativer Stopplösung abgestoppt und vollständig auf vorgekühlte native 12 % TBE-PAGE-Gele geladen. Nach Elektrophorese für 80 min bei 250 V und 4 °C wurden die Gele ausgebaut, für 1,5 h auf *Imaging Plates* exponiert und anschließend die den genickten und kurzen Duplices entsprechenden Banden mit einer Fläche von 0,5 x 2 cm ausgestanzt.

Die Gelstücke wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100 µl ddH₂O mit Eppipistillen gemörsert. Anschließend wurden weitere 100 µl ddH₂O zugegeben (Endvolumen 200 µl/1 cm²) und die DNA unter nicht mehr nativen Bedingungen bei 72 °C auf dem Schüttler (600 rpm) für 2x 30 min und 1x 45 min inkubiert. Nach den beiden 30 min-Intervallen wurden die Proben scharf anzentrifugiert (20.000g, 2 min), die Überstände in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und die Gelmasse mit 200 µl frischem ddH₂O gemischt. Nach den abschließenden 45 min Inkubation wurden Flüssigkeit und gemörsertes Gel mit einer Zellkulturspitze in eine Micro Bio-Spin® Chromatography Column überführt und dort mit den Überständen der ersten beiden Inkubationszeiten vereint.

Durch Zentrifugation (30 – 60 sek, 500 rpm, Hettich Universal 30 RF, Rotor 1412) in einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde die gelöste DNA von den Geltrümmern getrennt. Zur Aufkonzentrierung der extrahierten DNA wurde diese mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurde 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) auf die Endkonzentration 0,3 M zugegeben und kurz gevortext. Nach Zugabe von 1 µl Fällungszusatz PelletPaint wurde erneut kurz gevortext und dann mit 1,75 Volumina eiskaltem 100 % EtOH_{reinst} aufgefüllt. Nach erneutem Mischen wurde die Fällung über Nacht für ca. 18 h bei -20°C durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Fällungsansätze für 15 min bei 15.000g, 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 70 % EtOH_{reinst} gewaschen. Der Alkohol wurde sorgfältig abgenommen und die Pellets für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie in je 10 µl denaturierendem Ladepuffer (1x) aufgenommen wurden. Vor der Beladung des Sequenziergels wurden die Proben 20 min bei 97°C denaturiert. Die Abweichung vom Standardvorgehen begründet sich in der schlechten Passform der 2 ml Reaktionsgefäße im verwendeten Heizblock.

2.2.3.4 TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), TBE-Urea-PAGE

Die Aufreinigung und Qualitätskontrolle der hergestellten DNA-Substrate, sowie die Auftrennung der Assayproben erfolgte über native bzw. denaturierende TBE-Polyacrylamidgele und anschließender Autoradiographie mittels *Imaging Plates* und dem CR 35 Bio. Typische Gelkompositionen und deren Elektrophoresebedingungen sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Für die Schnittpositionsbestimmungen wurde die Sequenziergelkammer GIBCO BRL S2 mit 0,4 mm dicken Spacern und einem 32er Rechteckkamm verwendet. Für alle anderen Elektrophoresen wurde das Whatman Multigel-Long System von Biometra verwendet. Für die Sequenziergele wurden die langen Glasplatten mit Bindsilan beschichtet, um das Abrutschen des dünnen Gels zu verhindern, während die kurzen Glasplatten mit Repelsilan behandelt wurden, damit sich die Glasplatte nach dem Gellauf ablösen ließ, ohne das Gel zu beschädigen. Das Gel wurde mit Zellophanfolie abgedeckt und dann für 70 min bei 80 °C und 300 mbar Unterdruck getrocknet, bevor die *Imaging Plate* aufgelegt wurde.

Tabelle 2.6: Typische Elektrophoresebedingungen

¹ Während die Whatman-Elektrophoresekammern aktiv gekühlt oder beheizt wurden, verfügt die GIBCO BRL S2-Sequenziergelapparatur über keine aktive Temperaturregulation, weshalb die Temperatur ausschließlich über die Abwärme der angelegten Leistung erzeugt wurde und somit stark von der Umgebungstemperatur abhing.

Gelzusammensetzung	Gelformat	Laufzeit	konstante Spannung bzw. maximale Leistung	Temperatur
12 % TBE-PAGE	Whatman	70 min	250 V	4 °C
12 %-7 M-Urea-TBE-PAGE	Whatman	50 min	250 V	55 °C
20 %-7 M-Urea-TBE-PAGE	Whatman	95 min	350 V	55 °C
13 %-7 M Urea-TBE-PAGE	Sequenziergel	2-3h	2500 W	40 – 55 °C ¹

2.2.3.4.1 Analyse von Nukleaseprodukten über native und denaturierende PAGE

Die Detektion von Substrat und nukleolytischen Reaktionsprodukten über Gelelektrophorese und Autoradiographie bietet zwei grundlegend unterschiedliche Möglichkeiten. Über native Gele bleiben höhere Strukturen wie das Substrat selbst, aber auch Nukleaseprodukte, erhalten und werden anhand ihrer strukturellen Eigenschaften aufgetrennt. Denaturierende Gele dagegen lösen

vorhandene Strukturen, nicht nur die höheren Strukturen der aus mehreren Oligonukleotiden bestehenden Substrate und Nukleaseprodukte, sondern auch sequenzbedingte Sekundärstrukturen der Oligonukleotide auf. Darum ist bei der denaturierenden PAGE für die elektrophoretische Mobilität die Länge des Oligonukleotids das entscheidende Kriterium.

Im Folgenden wird am Beispiel einer HJ näher erläutert, welche Aussagen native und denaturierende Gelelektrophorese jeweils ermöglichen und warum jede Methode für sich nur ein unvollständiges Bild liefert. Abbildung 2.3A zeigt schematisch, dass eine Unterbrechung im Zucker-Phosphat-Rückgrat (= Einzelstrangbruch oder Nick) eines Stranges allein nicht ausreicht um das Laufverhalten so weit zu ändern, dass sich eine genickte HJ in den verwendeten Gelsystemen von der intakten, ungeschnittenen HJ trennen ließe. Demnach müssen mindestens zwei Stränge geschnitten werden, wodurch ein Teil der HJ abgetrennt wird, damit man auflösbare Strukturen erhält.

Schnitte in zwei von vier Strängen können entweder in gegenüberliegenden oder in benachbarten Strängen positioniert sein. Für eine HJ-Resolvase gilt, dass die Schnitte symmetrisch orientiert sein müssen, d.h. unter anderem in gegenüberliegenden Strängen liegen. Dabei sind, wie in Abbildung 2.3A ersichtlich, zwei Schnittrichtungen an der Modell-HJ denkbar: Strang 1 und Strang 3 (1 / 3) oder Strang 2 und Strang 4 (2 / 4). Für die Auflösung einer HJ zu Resolvaseprodukten (= genickten Duplices) ist es egal, welcher Strang markiert ist. Die Produkte beider Schnittrichtungen lassen sich mit nur einer einzigen Markierung im nativen Gel erkennen, jedoch nicht voneinander unterscheiden. Setzt eine Nuklease eine HJ durch Schnitte in exakt zwei benachbarten Strängen um, entstehen Replikationsgabel-ähnliche Strukturen und kurze Duplices. Für diesen Fall lässt sich genau bestimmen, welche Stränge geschnitten werden, wenn man die vier möglichen Substratvarianten mit jeweils einem anderen markierten Oligonukleotid vergleicht. In Abbildung 2.3A ist dies exemplarisch für zwei der vier möglichen Kombinationen dargestellt. Es zeigt sich in diesem Beispiel, dass der kurze Duplex spezifisch für den 5'-markierten Strang ist, während die Replikationsgabel-Struktur über die anderen drei Markierungen detektierbar ist.

Enzyme, die eine HJ in drei der vier Stränge schneiden, erzeugen einen genickten und zwei kurze Duplices als Produkte. Über die verschiedenen Markierungen lässt sich jedoch immer nur ein Produkt detektieren. Abbildung 2.3A unten zeigt diesen Fall exemplarisch für Schnitte in den Strängen 1, 3 und 4. Die 5'-Markierungen der Oligonukleotide 1 und 4 zeigen jeweils einen der kurzen Duplices, während die Markierungen der Stränge 2 und 3 den gleichen genickten Duplex sichtbar machen.

Über native Elektrophorese ist es selbst im Idealfall nur schwer möglich, verlässliche Aussagen über die Schnitthäufigkeit in einem Strang zu erhalten. Hierfür eignen sich denaturierende Gele besser. Sie ermöglichen es, einzelne Stränge für sich zu betrachten, unabhängig davon, ob die anderen Stränge umgesetzt wurden (Abbildung 2.3B). Darüber hinaus ist es nur mit denaturierenden (Sequenzier-) Gelen möglich, die genaue Schnittposition innerhalb der Oligonukleotidsequenz anhand der längenbasierenden, basengenauen Auftrennung zu bestimmen. Über die parallele Betrachtung der gleichen HJ mit jeweils einem markierten Strang lässt sich ein komplettes Schnittmuster erstellen. Im Falle z.B. einer HJ-Resolvase-Aktivität sollte dies in Bezug auf Schnittpositionen, Häufigkeit der einzelnen Schnitte und damit auch Gesamtschnitteffizienz eines Stranges immer symmetrisch zum Junction-Mittelpunkt sein.

Denaturierende Gele allein lassen jedoch keine verlässlichen Aussagen über die Art und Weise zu, wie das Schnittmuster zustande kommt. Selbst ein absolut punktsymmetrisches Schnittmuster bedeutet nicht zwangsläufig eine (alleinige) HJ-Resolvase-Aktivität, da die Verteilung der Schnitte nichts über die zeitliche Beziehung aussagt, in der sie entstehen. Es ist z.B. denkbar, dass zwar die Schnittpositionen in den gegenüberliegenden Strängen identisch sind, aber auf den ersten Schnitt

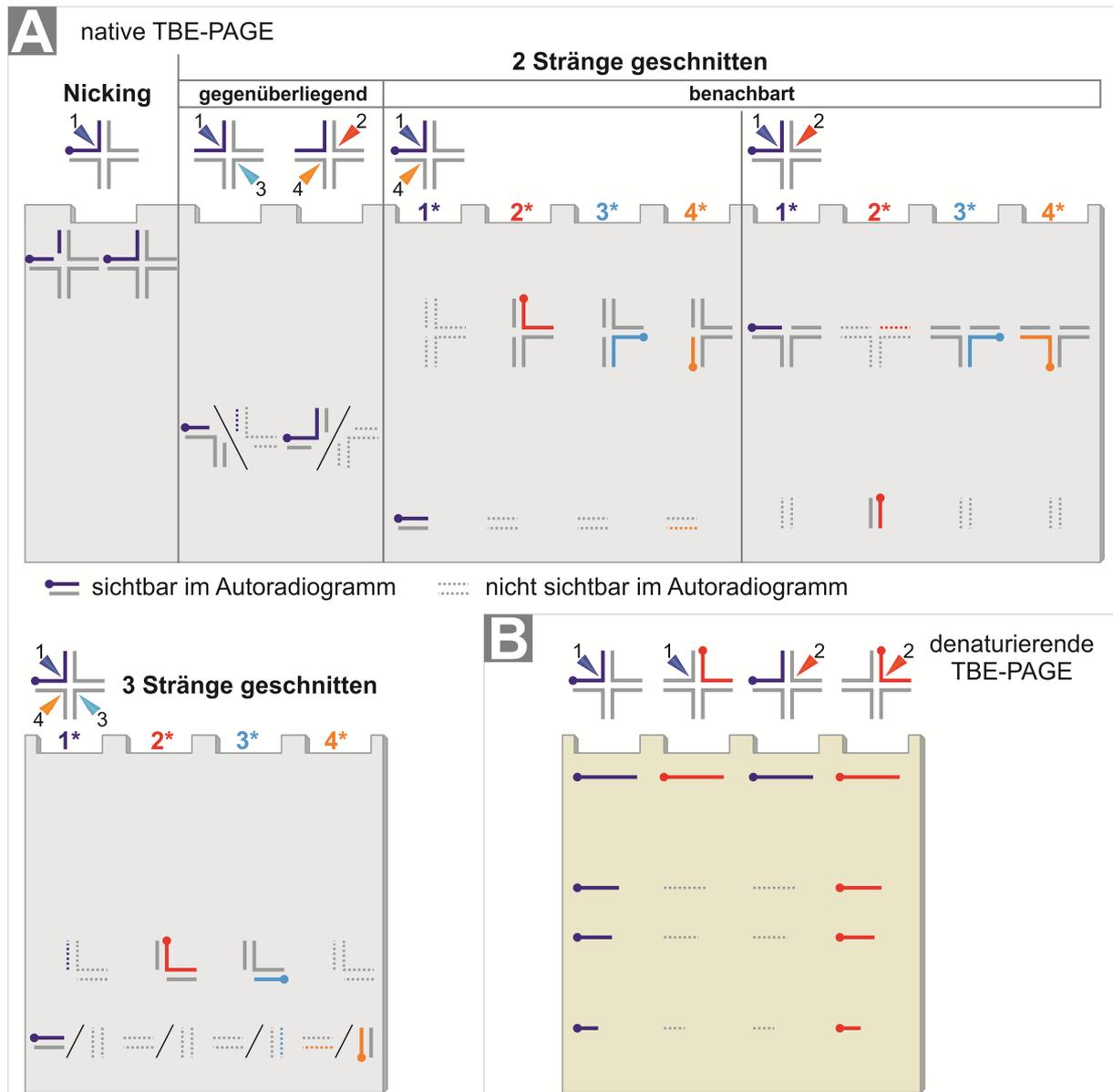


Abbildung 2.3: Prinzip von nativer gegenüber denaturierender PAGE – mögliche Aussagen

Punkte am Ende eines DNA-Einzelstrangs (Linie) markieren das radioaktive $5'-^{32}\text{P}$. gestrichelte Linien symbolisieren Produktstrukturen, welche keine radioaktive Markierung tragen und darum im Autoradiogramm nicht sichtbar sind. Dennoch sind sie im Reaktionsansatz und in der Gelspur vorhanden, weshalb sie hier der Vollständigkeit halber gezeigt werden. **A:** Gezeigt ist eine Übersicht über Schnittprodukte von einem bis drei Schnitten in einem Substratmolekül, das Laufverhalten im PAGE-Gel und ihre Detektierbarkeit im Autoradiogramm. Es wird zur Vereinfachung angenommen, dass jeder der Schnitte in 100 % der angezeigten Oligonukleotide erfolgt. Während Schnitte in einem Strang der HJ zu einer nicht unterscheidbaren genickten HJ führt, erzeugen zwei gegenüberliegende Schnitte genickte Duplices, welche unabhängig von der Schnittrichtung im Gel erkennbar sind. Der Fall von Schnitten in zwei benachbarten Strängen ist hier exemplarisch für zwei der 4 möglichen Kombinationen dargestellt. Es entstehen kurze Duplex- und replikationsgabel-ähnliche Produkte, wobei über den kurzen Duplex die Position der Schnitte bestimmt werden kann. Für Schnitte in drei Strängen ist exemplarisch eine von vier Möglichkeiten gezeigt. Es entstehen zwei kurze und ein genickter Duplex. Die Verteilung der Produkte im Autoradiogramm lässt eine Bestimmung der geschnittenen Stränge zu, wenn alle vier möglichen 5'-Markierungen verglichen werden. **B:** Im denaturierenden TBE-Urea-Gel sind nur Schnitte im markierten Strang selbst detektierbar und es liefert für sich genommen keine Aussage, aus welcher (Teil-)Struktur die Schnittprodukte stammen. Mit denaturierenden Sequenziegeln und Größenmarkern lässt sich aber die genaue Länge der Schnittprodukte bestimmen.

nicht der zweite im gegenüberliegenden Strang folgt, sondern in einem der beiden benachbarten Stränge. Dies würde zur Abspaltung eines Arms der HJ führen. Kurzer Duplex und eine replikationsgabelartige Rest-Junction würden entstehen, während eine HJ-Resolvase-Aktivität ausschließlich genickte Duplices erzeugen würde.

An diesem Beispiel ist ersichtlich, dass für die detaillierte Analyse des Schnittverhaltens von Nukleasen an komplexen Substraten die gemeinsame Betrachtung von nativen und denaturierenden Gelen sinnvoll und notwendig ist.

2.2.3.5 Auswertung der Autoradiogramme

Nach Exposition der Imaging Plates für unterschiedliche Zeiten (abhängig von der spezifischen Markierungsrate der Substrate, der eingesetzten Konzentration und dem Umsatz durch die Nukleasen) wurden diese mit dem CR 35 Bio ausgelesen.

Alle Autoradiogramme wurden mit der AIDA Image Analyzer Software in der Version 4.50 quantifiziert. Dafür wurde die Methode „1D Densitometrie“ verwendet. Bei dieser wurde in einem ersten Schritt eine Laufspur (*lane*) des Autoradiogramms definiert, für welche von der Software die Verteilung der Signalintensität in Quantum level (QL, Graustufeneinheiten) bestimmt wurde. Die Breite der *lane* wurde abhängig von der Breite der Signale in der jeweiligen Laufspur gewählt, so dass die Signale vollständig erfasst wurden. Innerhalb der *lane* wurden dann *peaks* definiert, welche den distinkten Banden im Autoradiogramm entsprachen. Jedes eindeutig als Bande erkennbare Signal wurde als eigener *peak* definiert, wobei keine Überlappungen zugelassen wurden.

Um den Hintergrund zu minimieren, welcher sich unweigerlich während der Exposition durch die Hintergrundstrahlung akkumuliert, wurde eine Nulllinie definiert. Diese wurde soweit möglich anhand der Signalintensität ober- und unterhalb der Gelspur festgelegt. Auf eine dynamische Anpassung der Nulllinie wurde verzichtet, da dies auf Grund der Verteilung der Radioaktivität innerhalb der Gelspur zu starken Verzerrungen der Verhältnisse geführt und deutlich stärkere Umsätze vorgetäuscht hätte.

Die quantifizierten Daten wurden als Tabellen exportiert und in Microsoft Excel weiter verarbeitet. Zuerst erfolgte eine Normierung aller Signale auf die Gesamtsignalstärke (Ttl) in QL einer Pufferkontrolle des entsprechenden Substrats. Danach wurden für jeweils alle Produktpeaks die QL der Pufferkontrolle von den QL der Enzymproben subtrahiert. Falls es dabei zu negativen Werten kam, wurden diese gleich Null gesetzt. Gleichzeitig wurde die Summe aller Produktpeaks der Pufferkontrolle von der (normierten) Gesamtsignalintensität (Ttl) und der Summe aller Produktpeaks jeder *lane* abgezogen. Ausgehend von diesen normierten und pufferkorrigierten Werten wurden dann die einzelnen *peaks* als Prozent Summe aus Substratpeak und aller Produktpeaks (% Sum of Regions) dargestellt. Dabei wird der Hintergrund zwischen den DNA-Banden nicht berücksichtigt.

Somit ließ sich für jedes Produkt bzw. für jede Produktklasse (= mehrere nicht im gewählten Gelsystem aufzutrennende Produkte) der Anteil an der Gesamt-DNA-Menge bestimmen, also wie viel des Substrats von der Nuklease zu dem jeweiligen Produkt umgesetzt wurde.

Für die Identifikation schwacher Banden wurde eine gammaverstärkte, also logarithmische, Ansicht verwendet, bei welcher schwache Signale stärker hervorgehoben werden als starke Signale. Dies führte dazu, dass in den Diagrammen der Quantifizierungen auch Signale gezeigt sind, welche in den linearen Abbildungen der Autoradiogramme nicht sichtbar sind. Bei allen gezeigten Autoradiogrammen handelt es sich um die lineare Darstellung. Abweichungen werden explizit deklariert.

3. Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analysen der pflanzlichen HJ-Resolvasen

3.1.1 Zwei Homologe der HJ-Resolvasen in höheren Pflanzen

Wie in anderen Organismen wurden in der Vergangenheit auch in *A. thaliana* neben AtUVH3, AtFEN1 und AtEXO1, den Vertretern der Klassen 1-3, Homologe der Klasse 4 der Rad2/XPG-Familie gefunden (Furukawa *et al.*, 2003; Moritoh *et al.*, 2005). AtGEN1 (At1g01880) teilt mit der Einzelstrang-Endonuklease OsSEND-1, dem Begründer der Klasse 4, eine Ähnlichkeit von 33 % im N-terminalen Bereich. Zu OsGEN-L, einem zweiten Vertreter der Klasse 4 in Reis, weist AtGEN1 47 % Ähnlichkeit über die gesamte Länge auf und ist auf Sequenzebene näher verwandt als dessen Paralog OsSEND-1 (vgl. Abbildung 3.1A). Ausgehend von diesen drei Proteinsequenzen wurde mittels der TAIR-Datenbank und TBLASTP-Analysen ein weiteres putatives Rad2/XPG-Klasse 4-Mitglied in *A. thaliana* bestätigt, dessen N-Terminus in der Vergangenheit bereits als Klasse 4 Homolog zu OsSEND-1 vorgeschlagen worden war (Furukawa *et al.*, 2003). Das vorhergesagte Genprodukt des identifizierten Locus At3g48900 wurde auf Grund der deutlich höheren Homologie zu OsSEND-1 (51 % Ähnlichkeit) als zu AtGEN1 (34 % Ähnlichkeit) AtSEND1 benannt. Damit sind die Orthologe beider Arten jeweils deutlich ähnlicher, als ihre jeweiligen Paraloge (Abbildung 3.1A).

Durch Untersuchung der in der Phytozome-Datenbank hinterlegten Proteinfamilien und manuelle BLAST-Suchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Orthologe zu sowohl AtGEN1/OsGEN-L, als auch AtSEND1/OsSEND-1 von 32 untersuchten Pflanzen zugeordnet, während fünf Pflanzengenome lediglich ein Homolog zu AtGEN1/OsGEN-L aufwiesen. In Abbildung 3.1B ist ein Stammbaum mit exemplarisch ausgewählten Arten dargestellt, zusammen mit den bereits charakterisierten Klasse 4-Proteinen aus Mensch, Bäckerhefe, Fruchtfliege und Fadenwurm. Zur genaueren Einordnung der Verwandtschaftsverhältnisse sind auch die Rad2/XPG-Klassen 1 bis 3 mit jeweils drei Vertretern abgebildet. Sowohl GEN1 bildet einen eigenen separaten Ast im Stammbaum, als auch SEND1, welche sich beide von den Klassen 2 und 3 abgrenzen. Die SEND1-Orthologe sind homologer zu den Vertretern der Klasse 1, als zu den GEN1-Homologen. Auffällig ist, dass sowohl DmGEN1 und HsGEN1 in einem gemeinsamen Unterzweig neben dem der pflanzlichen GEN1-Orthologen gruppieren, während ScYen1 und CeGEN-1 nur wenig Sequenzhomologie zu den übrigen Rad2/XPG-Nukleasen besitzen. Der Vergleich der GEN1- mit den SEND1-Homologen der Pflanzen zeigt, dass im Blasenmützenmoss *Physcomitrella patens* und im Moosfarn *Selaginella moellendorffii*

wie bei den Tieren und Pilzen ein GEN1-Ortholog gefunden wurde, jedoch keine Homolog zu AtSEND1. Demnach besitzen die höheren Pflanzen der *Tracheophyta* je zwei Paraloge der Klasse 4, während die Tiere und Pilze ähnlich den Prokaryoten, Phagen und Archaeobakterien (in der Regel) nur je eine HJ-Resolvase codieren. Dies spricht für ein frühes Duplikationsereignis in der Evolution der höheren Pflanzen, kurz nach der Abspaltung der Moose und Farne, wonach die beiden duplizierten Gene stärker divergierten als die Orthologe zwischen den Arten.

Die Assoziation der charakterisierten HJ-Resolvase HsGEN1 im Stammbaum mit den AtGEN1-Orthologen, legt nahe, dass es sich auch bei den pflanzlichen Proteinen um Resolvasen handeln könnte, auch wenn für das am nächsten mit HsGEN1 verwandte Protein, DmGEN, an einer Modell-HJ keine HJ-Resolvaseaktivität gezeigt wurde. Um zu bestimmen, ob zum einen At1g01880 (*AtGEN1*) eine pflanzliche HJ-Resolvase codiert und zum anderen zu klären, welche Funktion das nahe verwandte AtSEND1 spielt, wurden beide Proteine für die biochemische Charakterisierung ausgewählt.

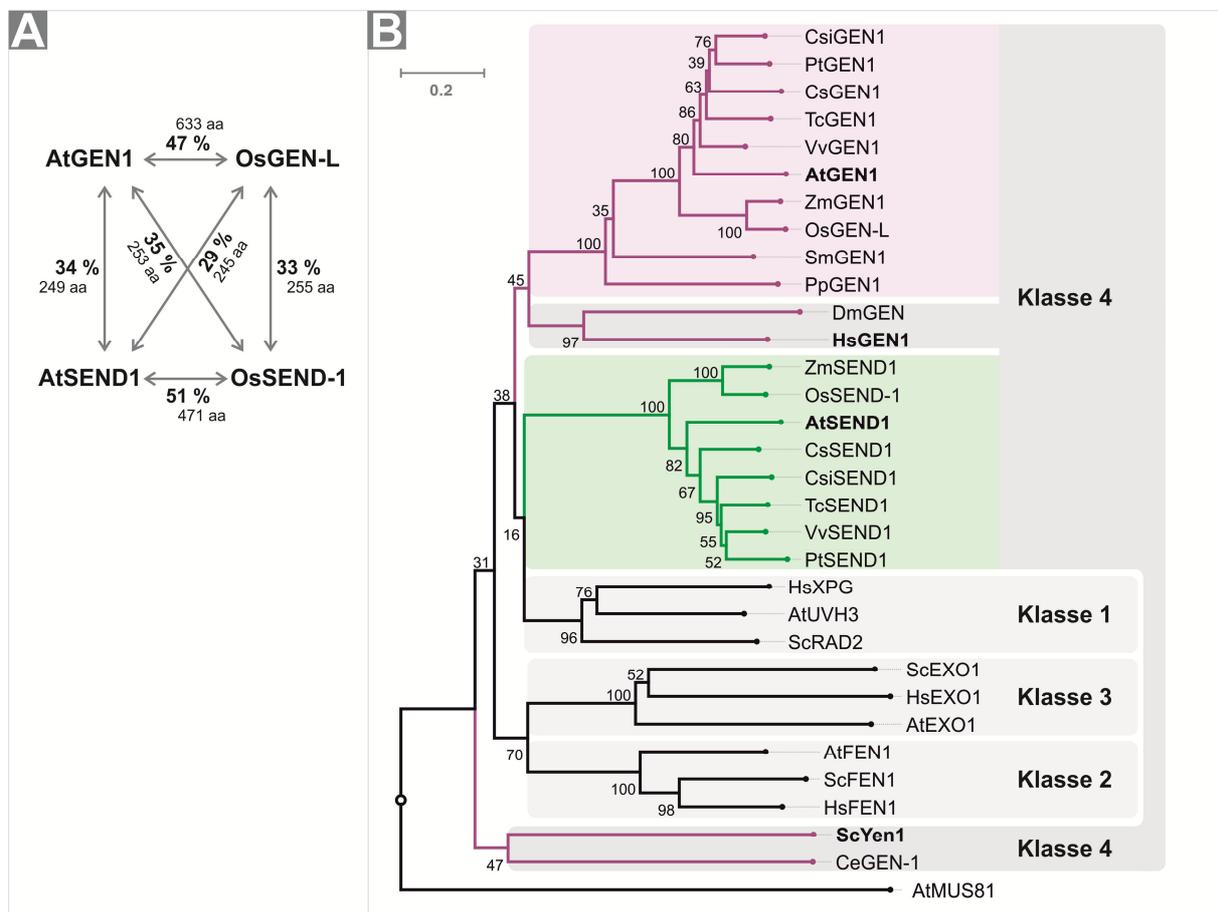


Abbildung 3.1: Bioinformatische Analysen zur Sequenzhomologie

A: Sequenzhomologie zwischen AtGEN1, AtSEND1, OsGEN-L und OsSEND-1. Angegeben sind jeweils die Prozent Ähnlichkeit in paarweisen Alignments. Die Längen der alinierten N-terminalen Bereiche sind angegeben. **B:** Stammbaum exemplarischer Vertreter aller vier Klassen der Rad2/XPG-Familie (errechnet nach der *Minimum Evolution*-Methode). Lila markiert die GEN1-Orthologe, grün markiert die SEND1-Orthologe. Die lila bzw. grün hinterlegten Bereiche markieren die pflanzlichen Proteine. AtMUS81 wurde als *outgroup* definiert. Die Zahlen an den Verzweigungspunkten entsprechend dem Ergebnis der *Bootstrap*-Analyse. At = *Arabidopsis thaliana*, Csi = *Citrus sinensis*, Cs = *Cucumis sativus*, Hs = *Homo sapiens*, Os = *Oryza sativa*, Pp = *Physcomitrella patens*, Pt = *Populus trichocarpa*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Sm = *Selaginella moellendorffii*, Tc = *Theobroma cacao*, Vv = *Vitis vinifera*, Zm = *Zea mays*

3.1.2 Verifizierung der cDNA-Sequenzen von AtGEN1 und AtSEND1

Da der genomische Kontext mit dem vollständig sequenzierten *A. thaliana*-Genom in der TAIR-Datenbank (Version 10) hinterlegt war, wurden die cDNAs von AtGEN1 und AtSEND1 zunächst bioinformatisch eingegrenzt.

Im Fall von At1g01880 (*AtGEN1*) befindet sich 284 bp *upstream* des putativen Start-ATG ein weiterer ORF (At1g01890), welcher für eine tRNA (Anticodon CTT = Lysin) codiert. Das Triplet *in frame* direkt vor dem putativen Start-ATG ist zudem ein Stoppcodon. In den 284 bp zwischen At1g01880 und At1g01890 sind drei weitere Methionine codiert, jedoch existieren keine möglichen Intron/Exon-Grenzen, was über PCR bestätigt wurde (Abbildung 3.2). Demnach ist davon auszugehen, dass es sich bei dem auf TAIR annotierten ORF-Beginn um das reale Start-ATG handelt. Das von TAIR vorgeschlagene ORF-Ende ist aus analogen Argumenten der wahrscheinlichste Kandidat: 100 bp bzw. 275 bp *downstream* liegen die codierenden Bereiche für eine weitere tRNA (At1g01870) und eine Dimethyladenosin-Transferase (At1g01860). Im intergenischen Bereich sind keine weiteren potentiellen Stoppcodons und Intron/Exon-Grenzen vorhanden.

Für At3g48900 (*AtSEND1*) sind die ORF-Grenzen aus bioinformatische Sicht weniger klar. Ein 189 bp *upstream* lokalisiertes ATG könnte als alternativer ORF-Start zum annotierten ATG dienen: Es liegt weit genug vom nächsten Gen (At3g48890) entfernt und könnte Teil eines 25 bp Exons sein, für dessen Splicing passende Intron/Exon-Grenzen vorhanden wären.

Über die in Abbildung 3.2 schematisch zusammengefassten PCR-Reaktionen mit OligodT-Gesamt cDNA als Template und gDNA als Kontrolle wurde bestätigt, dass die auf TAIR annotierten Start- und Stoppcodons tatsächlich den Grenzen der ORFs von *AtGEN1* und *AtSEND1* entsprechen. Die anschließende Klonierung und Sequenzierung zeigte, dass die cDNA-Sequenzen von *AtGEN1* und *AtSEND1* mit den ORF-Vorhersagen der TAIR-Datenbank identisch sind.

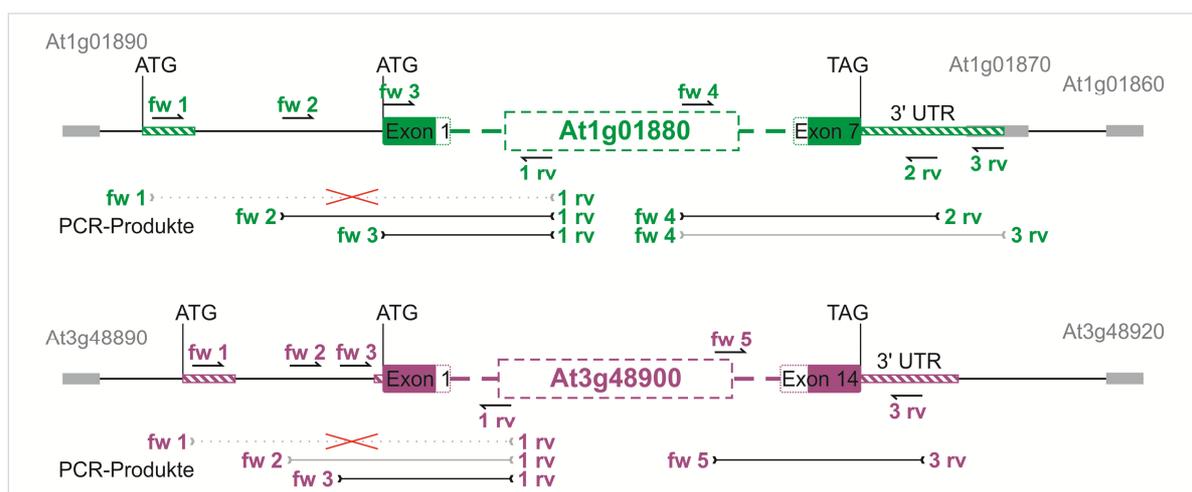


Abbildung 3.2: Bestimmung der ORF-Grenzen

Gezeigt ist eine schematische, nicht maßstabgetreue Darstellung der Gengrenzen von *AtGEN1* (At1g01880, grün) und *AtSEND1* (At3g48900, lila) mit den Bindestellen der verschiedenen benutzten Primer (Sequenzen in Tabelle 2.2). Jeweils unterhalb sind die verschiedenen Primerkombinationen und ihre PCR-Produkte an cDNA dargestellt: gepunktete Linie = kein PCR-Produkt, hellgraue Linie = wenig PCR-Produkt, schwarze Linie = deutliches PCR-Produkt, fw = Vorwärtsprimer, rv = Rückwärtsprimer. Dabei steht ein grünes fw 1 für den Primer MB-GEN1 fw 1, ein lilanes fw1 für den Primer MB-Send fw 1.

3.1.3 Die *Chromo domain-like*-Variante ist in beiden Orthologen konserviert

Für AtSEND1 sind in der TAIR-Datenbank zwei Einträge einer *Chromo domain-like* (InterPro:IPRO16197) bzw. *Chromo domain* (InterPro:IPRO00953) hinterlegt, während dies für AtGEN1 nicht der Fall ist. Die Analysen aller näher charakterisierten Mitglieder der Klasse 4 der Rad2/XPG-Familie (Übersicht in Abbildung 3.4) mit dem SMART-Webserver ergaben keine weiteren Treffer. Über ScanProsite konnte in OsSEND-1 der gleiche Treffer wie für AtSEND1 (CHROMO_2, PS50013; *Chromo and chromo shadow domain*) identifiziert werden, jedoch mit niedriger Konfidenz. Für die

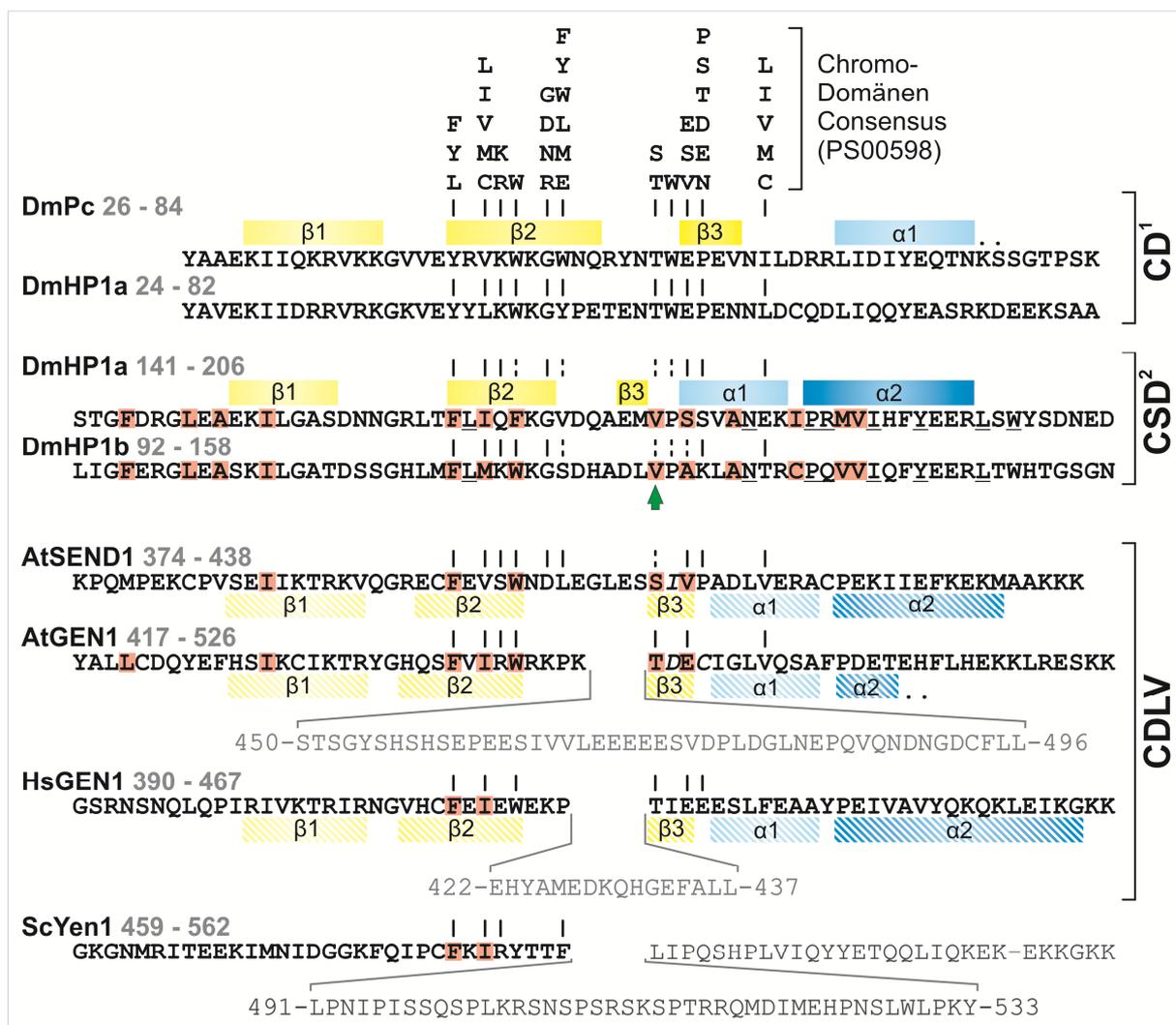


Abbildung 3.3: Die *Chromo domain-like*-Variante (CDLV)

Manuelles Alignment der Chromo-Domänen von DmPc und DmHP1a (CD, ¹Eisenberg, 2001), Chromo Shadow Domänen (CSD) von DmHP1a und DmHP1b und entsprechender Sequenzabschnitte von AtSEND1, AtGEN1, HsGEN1 und ScYen1. Vertikale Striche zeigen dem Consensus entsprechende AS-Positionen an, geteilte vertikale Striche symbolisieren der CSD entsprechende AS an dieser Position. Orange hinterlegte AS stellen konservierte, für die Faltung der Domäne wichtige AS dar (²Mendez et al., 2011). Der grüne Pfeil markiert das für die CSD charakteristische V44 (Aasland und Stewart, 1995), welches in den Klasse 4-Homologen nicht konserviert ist. Ausgefüllte Balken über der Sequenz symbolisieren bekannte Sekundärstrukturen, schraffierte Balken unterhalb stellen auf Sequenzhomologie basierende Vorhersagen der Sekundärstruktur dar (α = α-Helix, β = β-Faltblatt). Die grauen, geklammerten Sequenzabschnitte entsprechen Insertionen in der *Chromo domain-like*-Variante (CDLV), die nur in den GEN1-Homologen vorkommen.

Chromo-Domäne ist unter PS00598 eine Consensus-Sequenz hinterlegt, welche in Abbildung 3.3 dargestellt ist. Anhand dieser und der ursprünglich charakterisierten Chromo- (CD) und Chromo shadow-Domänen (CSD) aus *D. melanogaster* (Eissenberg, 2001; Mendez *et al.*, 2011) wurden AtGEN1, HsGEN1, ScYen1 und die restlichen Vertreter der Klasse 4 über manuelle Alignments und Sekundärstrukturvorhersagen, die sich aus Modellierungen der dreidimensionalen Struktur ableiten, auf das Vorhandensein ähnlicher Sequenzabschnitte hin untersucht. Dies ist exemplarisch in Abbildung 3.3 dargestellt.

Wie gezeigt, bestehen bereits deutliche Unterschiede zwischen den CDs und CSDs der Drosophila-Proteine. Dennoch lassen sich die meisten konservierten Positionen mit dem Consensus in Einklang bringen. Selbiges ist für AtSEND1 und OsSEND-1 (nicht gezeigt) möglich, welche die größte Anzahl an Consensus-konformen AS-Positionen aufweisen. Die GEN1-Homologe der Tiere und Pflanzen zeigen weniger Consensus-konforme AS-Positionen, die dreidimensionale Modellierung lässt aber wie für AtSEND1 und OsSEND-1 auf eine Sekundärstruktur aus β -Faltblättern gefolgt von zwei α -Helices entsprechend der CSD schließen. Dagegen ist das CSD-spezifische Valin an Position 44 (grüner Pfeil in Abbildung 3.3, Aasland und Stewart, 1995) weder in den SEND1- noch den GEN1-Homologen vorhanden. In den GEN1-Homologen sind dagegen T44 und E46, die charakteristisch für die Sequenz der CD sind, konserviert. Zusätzlich weisen die GEN1-Homologe eine, je nach Organismus unterschiedlich lange, Insertion in der Mitte der Domäne auf, welche laut den Modellierungen keinen Einfluss auf die vorhergesagte Sekundärstruktur ausübt. Auf Grund dieser Abweichungen der Primärstruktur von sowohl der CD- als auch CSD-Sequenzen aus *Drosophila* ist keine Zuordnung zu CD oder CSD möglich. Stattdessen wurde von mir die Bezeichnung *Chromo domain-like-Variante* (CDLV) gewählt.

Für ScYen1 konnten vier Consensus-konforme AS identifiziert werden, welche, wie in den übrigen GEN1-Homologen, kurz vor der ebenfalls vorhandenen Insertion im Bereich des zweiten β -Faltblatts lokalisiert sind. Darüber hinaus können keine weiteren Ähnlichkeiten festgestellt werden, weshalb

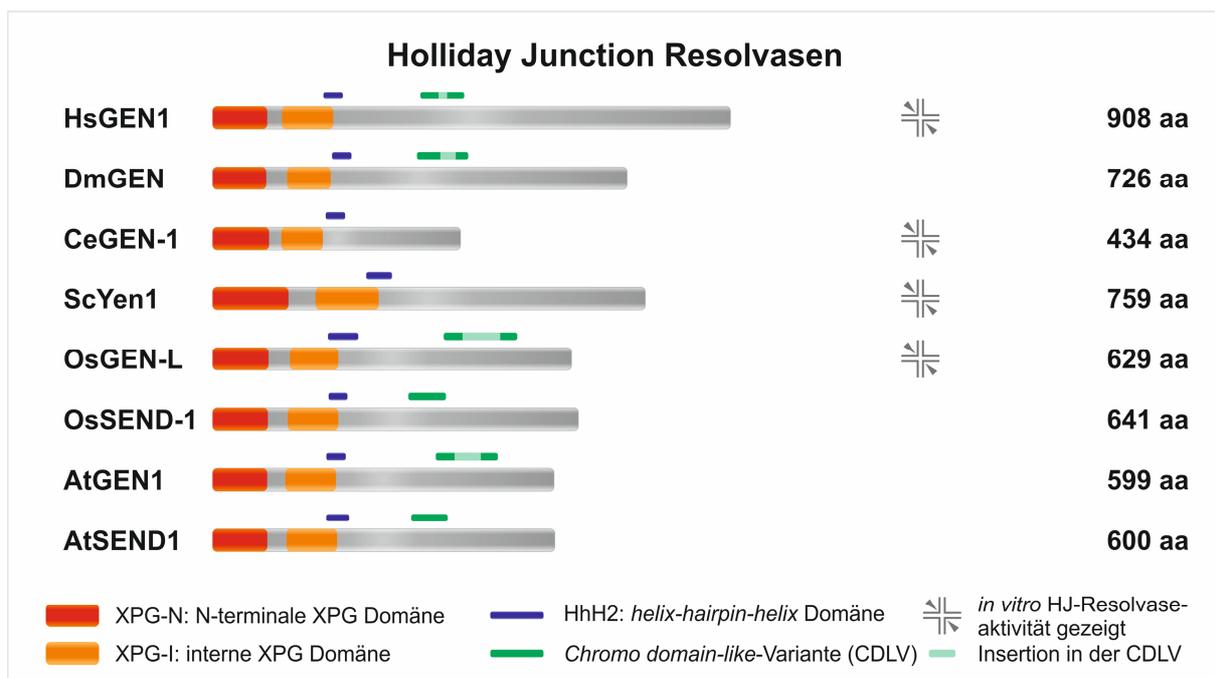


Abbildung 3.4: Die *Chromo domain-like-Variante* der Klasse 4 (Resolvasen)

Übersicht über die Domänenstruktur der charakterisierten Vertreter der Rad2/XPG-Klasse 4

anzunehmen ist, dass ScYen1 keine CDLV besitzt. Im Fall von CeGEN1 begründet sich das Fehlen der Domäne aller Wahrscheinlichkeit nach durch die verkürzte AS-Sequenz des *C. elegans* Proteins, welche in dem Bereich endet, wo die CDLV anhand der Homologie zu erwarten wäre.

Für die übrigen Klasse 4-Vertreter konnte gezeigt werden, dass sowohl die SEND1-, als auch die GEN1-Homologe eine, wenn auch unterschiedliche, CDLV besitzen, was in Abbildung 3.4 zusammengefasst ist. Alignments von GEN1- und SEND1-Homologen der in der Phytozome-Datenbank hinterlegten Pflanzen zeigen darüber hinaus, dass die betreffenden Sequenzabschnitte in allen Pflanzen gut konserviert sind.

3.2 Klonierte Konstrukte, Expression, Aufreinigung

Für die *in vitro* Charakterisierung wurden Expressionskonstrukte für rekombinante Proteine von *full length* AtGEN1 und AtSEND1 kloniert, die dem in Abbildung 2.1 abgebildeten Schema entsprechen. Zur Expression der Konstrukte wurde der Bakterienstamm ER2566 ausgewählt, welcher eine Coexpression von Chaperonen als Faltungshelfer ermöglicht. Es wurden fünf verschiedene Chaperonkombinationen (Tabelle 2.1) unter verschiedenen Bedingungen getestet. Dabei stellte sich die Coexpression des Chaperons *Trigger factor* (Tif) mit dem in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Protokoll als die Variante mit der höchsten Ausbeute an *full length* Protein in der löslichen Fraktion heraus (nicht gezeigt).

Die über Streptactin-Affinitätschromatographie und Ni-IMAC doppelt aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden über kolloidal Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele (Abbildung 3.5) und Western Blots gegen die C-terminalen His- bzw. StrepII-Tags (nicht gezeigt) auf ihre Reinheit und Identität überprüft und im Vergleich mit einer BSA-Eichgerade quantifiziert.

Anhand der lila markierten Laufspuren in Abbildung 3.5 ist ersichtlich, dass rekombinantes AtGEN1 und seine AS-Austauschvarianten im 10% SDS-PAGE-Gel langsamer migrieren als zu erwarten. Die

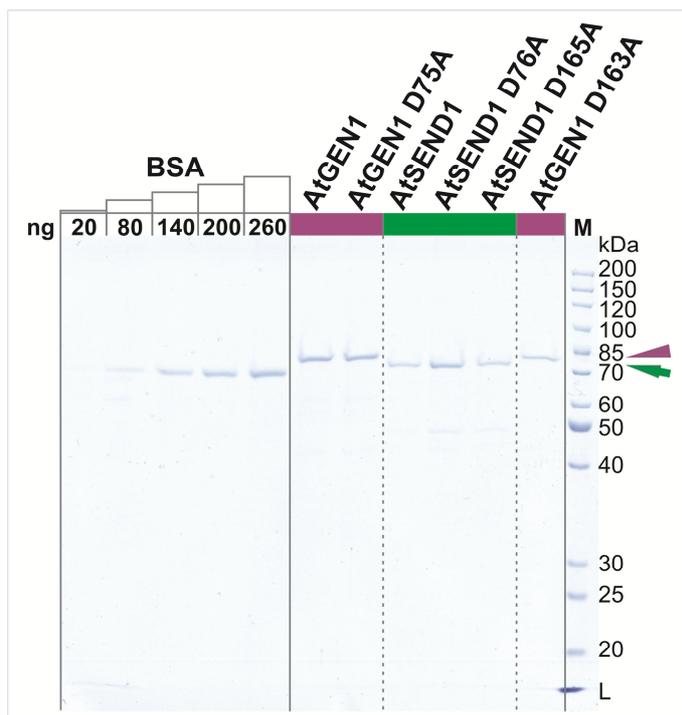


Abbildung 3.5: Aufgereinigte rekombinante Proteine

Gezeigt ist der Aufreinigungserfolg für AtGEN1, AtSEND1, und je zwei AS-Austauschvarianten. Rekombinantes AtSEND1 (72 kDa, grüner Pfeil) läuft im 10 %-SDS-PAGE-Gel (hier kolloidal Coomassie-gefärbt gezeigt) knapp oberhalb der 70 kDa Markerbande, während rekombinantes AtGEN1 (71 kDa, lila Pfeil) deutlich oberhalb der 70 kDa- und AtSEND1-Bande läuft. Links ist eine Eichgerade von BSA bekannter Mengen aufgetragen. M = PageRuler Unstained Protein Ladder

theoretische Molekülmasse von rekombinantem AtGEN1, im Folgenden nur noch AtGEN1 genannt, beträgt 70,98 kDa (inklusive der PCS und der Tags), wohingegen die apparente Molekülmasse sich im Bereich von 75 bis 80 kDa bewegt. Damit migriert AtGEN1 langsamer als rekombinantes AtSEND1, welches in guter Entsprechung zu seiner theoretischen Molekülmasse von 71,97 kDa knapp oberhalb der 70 kDa-Bande des Markers liegt.

3.2.1 Aktivitätsnachweise und Negativkontrollen

AtGEN1 und AtSEND1 zeigen nukleolytische Umsätze einer Modell-HJ

Um die hergestellten rekombinanten Proteine nach Expression und Aufreinigung auf ihre Aktivität zu überprüfen, wurden Aliquots der jeweiligen Hauptelutionsfraktionen nach der Streptactin-Affinitätschromatographie mit der partiell mobilen Holliday Junction (pmHJ) unter den in Kapitel 2.1.5 angegebenen Reaktionsbedingungen für die pmHJ inkubiert. Sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 zeigen eine konzentrationsabhängige nukleolytische Aktivität, welche in einem charakteristischen Spektrum an Produkten resultiert, welches sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den beiden Proteinen aufweist. Beide Proteine erzeugen an Strang 1 bevorzugt Nebenschnittprodukte, die länger sind als die Hauptschnittprodukte, während es an Strang 2 umgekehrt ist. Im Gegensatz zu AtSEND1 ist für AtGEN1 eine deutliche Präferenz für die Spaltung von Strang 1 zu erkennen, während AtSEND1 bevorzugt an Strang 2 aktiv ist.

Nicht alle Austausch konservierter AS führen zum vollständigen Aktivitätsverlust

Um für die Aktivitäts-Assays eine bessere Negativkontrolle zu haben, als die in Abbildung 3.6 ebenfalls gezeigte Mock-Kontrolle, wurden verschiedene AS-Austauschvarianten von AtGEN1 und AtSEND1 hergestellt und an der pmHJ auf Aktivität getestet. Dazu wurde eine Auswahl der in Tabelle 4.1 aufgeführten, innerhalb der Rad2/XPG-Familie konservierten Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Sowohl AtGEN1 D163A als auch AtSEND1 D165A (D181A in HsFEN1) zeigen eine, im Fall von AtSEND1 D165A deutliche, Restaktivität an der pmHJ mit den gleichen Bevorzugungen für einen der beiden Stränge wie die unveränderten Proteine. Um diese Restaktivität näher zu charakterisieren, wurden beide AS-Austauschvarianten in den weiteren Experimenten an HJs parallel zu den WT-Proteinen getestet. In den Abbildungen 3.22, 9.5 und 9.9 ist ersichtlich, dass die schwache Restaktivität an zwei weiteren Modell-HJs und den XO-basierenden 5'-Flaps die gleichen Hauptschnittpositionen in den jeweiligen Strängen aufweist wie AtGEN1 bzw. AtSEND1. Die Spezifität der Nebenschnitte wird teilweise durch den AS-Austausch verändert, wie an der konzentrierteren Produktverteilung von AtSEND1 D165A an der pmHJ zu erkennen (Abbildung 3.6). Daraus kann gefolgert werden, dass sowohl Schnitteffizienz als auch die Spezifität der Schnitte beeinflusst werden kann.

Die AS-Austausche D75A und E140A/E142A in AtGEN1 und ihre Entsprechungen in AtSEND1 (D76A, E142A/E144A) zeigen keine detektierbare Aktivität an der pmHJ. Somit führen diese Austausche zu einem Verlust der Nukleaseaktivität. AtGEN1 D75A und AtSEND1 D76A wurden für die folgenden Experimente als Negativkontrolle ausgewählt, da für die entsprechenden AS in HsFEN1 gezeigt wurde, dass dieser Austausch die Fähigkeit zur Substratbindung nur um den Faktor 2 beeinträchtigt, während der E158A-Austausch in HsFEN1 zum völligen Verlust der Substratbindung führt (Shen *et al.*, 1997). Demnach genügten die Proteinvarianten AtGEN1 E140A/E142A und AtSEND1 E142A/E144A

nicht den Ansprüchen an eine möglichst vergleichbare Negativkontrolle für eventuelle nach der Aufreinigung noch vorhandene *E. coli*-Kontaminationen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Negativkontrollen bei jedem einzelnen Versuch verzichtet. Stattdessen sind die Kontrollen in Abbildung 9.3 und Abbildung 9.4 als Übersicht aller getesteten Substrate zusammengefasst.

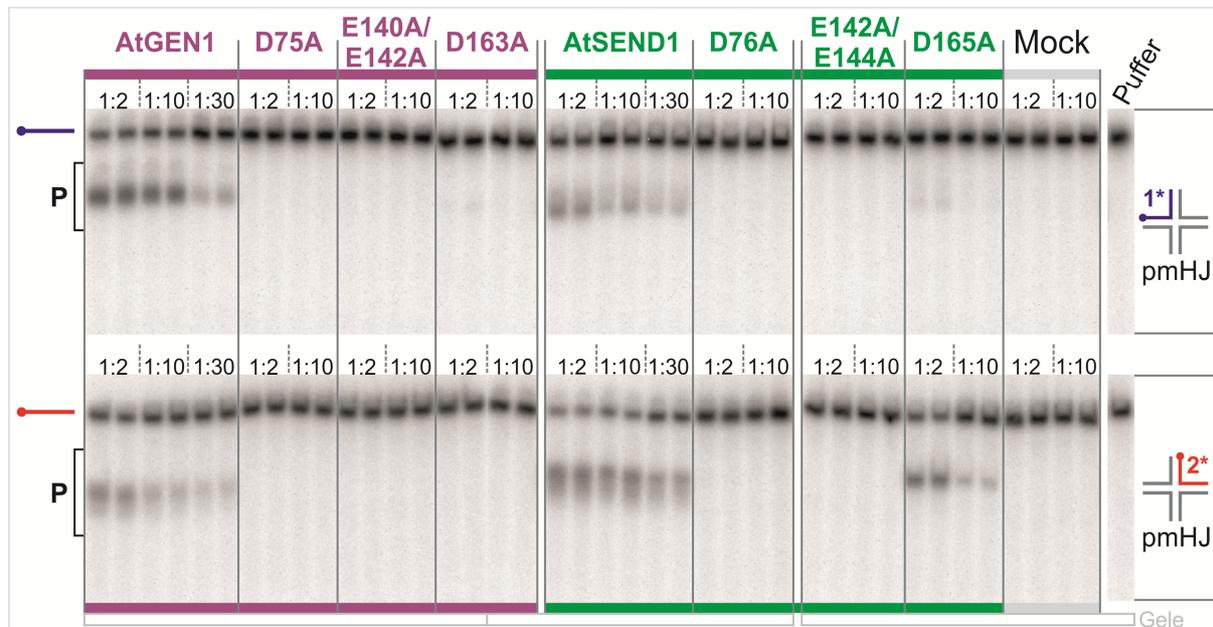


Abbildung 3.6: Aktivitätsnachweis von AtGEN1 und AtSEND1 an der pmHJ

Nachweis der Aktivität von AtGEN1 und AtSEND1 bzw. der Test auf Aktivitätsverlust durch die vorgenommenen AS-Austausche an der partiell mobilen Modell HJ (pmHJ). Getestet wurden je 8 µl Elutionsfraktion $E_{\text{Strep}2}$ nach der Streptactin-Affinitätschromatographie in den angegebenen Verdünnungen (ausgehend von vergleichbaren Konzentrationen). Es zeigen sich für AtGEN1 und AtSEND1 konzentrationsabhängige Aktivitäten an beiden Armen der pmHJ, wobei AtGEN1 bevorzugt den markierten Strang 1 schneidet (1*), AtSEND1 ist dagegen an Strang 2 (2*) aktiver. Deutlich erkennbar ist die Aktivität von AtSEND1 D165A an Strang 2 der pmHJ und schwächer an Strang 1. AtGEN1 D163A zeigt eine sehr schwache Restaktivität an Strang 1. Die AS-Austauschvarianten AtGEN1 D75A, E140A/E142A und ihre Entsprechungen in AtSEND1 zeigen keinerlei Aktivität an der pmHJ. Für die Mock-Proben wurden ER2566-Zellen mit dem Leervektor pETDuet1-HisStreptII-PS-C und pTf16 cotransformiert und während Expression und Aufreinigung identisch zu den restlichen Ansätzen behandelt. Gezeigt ist das Autoradiogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der Signale durch denaturierende 12 % 7 M-Urea-TBE-PAGE. P = spezifische Nukleaseprodukte

3.3 Substratspezifität von AtGEN1 und AtSEND1

Genickte Duplices und 3'-Flaps sind keine Substrate für AtGEN1 und AtSEND1

Resolvasen prozessieren Modell-HJs durch symmetrische Schnitte zu genickten Duplices (nD). Weder AtGEN1 noch AtSEND1 können Duplices mit einem Nick in der Mitte eines Stranges oder zwei Nukleotide 3' davon umsetzen (Abbildung 3.7). Auch nD-Substrate mit einem überstehenden 3'-Nukleotid stimulieren keine nukleolytische Spaltung des vollständigen, komplementären Stranges. Das gleiche gilt für den teilweise ungepaarten Strang eines 3'-Flap-Substrates. Auch dieses wird weder von AtGEN1 noch AtSEND1 im markierten Strang geschnitten (siehe Abbildung 3.9).

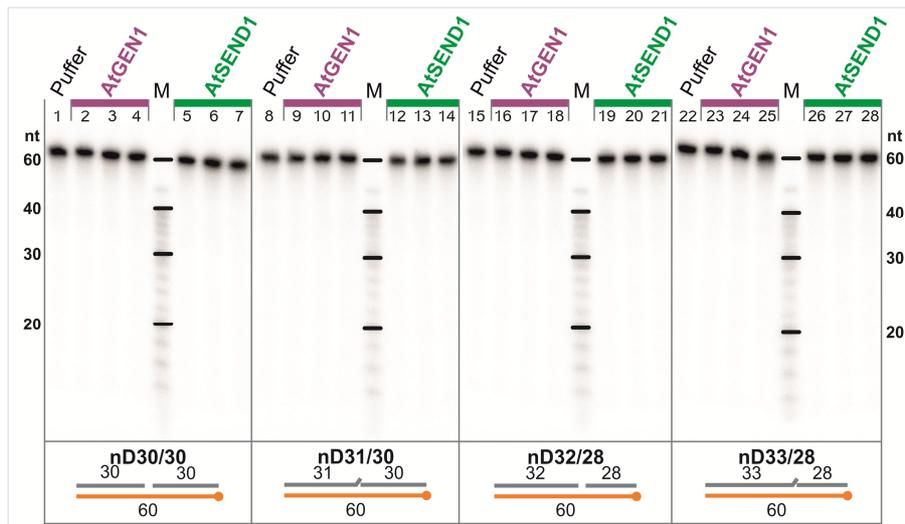


Abbildung 3.7: Genickte Duplices (nD) sind keine Substrate für AtGEN1 und AtSEND1

Gezeigt ist das Autoradiogramm einer denaturierenden 20 %-7 M-Urea-TBE-PAGE von Triplikaten von AtGEN1 bzw. AtSEND1 an vier verschiedenen genickten Duplices. Weder AtGEN1 noch AtSEND1 zeigen detektierbaren Umsatz und unterscheiden sich nicht von der Pufferkontrolle. Das markierte Oligonukleotid (orange, Punkt am Ende markiert das 5'-³²P) ist in allen Substraten das gleiche. M = Marker aus markierten Oligonukleotiden definierter Länge in 2 nt-Schritten unterhalb von 40 nt.

AtGEN1 und AtSEND1 schneiden komplexere Strukturen mit leicht unterschiedlicher Präferenz

Sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 zeigen an einem Spektrum verzweigter DNA-Strukturen nukleolytische Aktivität, jedoch mit unterschiedlichen Präferenzen bezüglich der am besten umgesetzten Struktur(en) (Abbildung 3.8). Es wurden eine HJ mit 26 bp Homologiebereich im Zentrum der Junction (X26), auf den gleichen Sequenzen basierende genickte HJs (nX-30 und nX-32), eine Replikationsgabel (RF1) und genickte Duplices getestet. Weitere getestete Substrate waren eine statische HJ (X0) und ein 5'-Flap auf Basis der X0.

Die statische X0-HJ wird im Gegensatz zu genickten Duplices und dem 3'-Flap mit einem Maximalumsatz nach 60 min von 86 % (AtGEN1) bzw. 72 % (AtSEND1) aufgelöst, wobei im Fall von AtSEND1 noch kein Plateau erreicht ist. Das gleiche gilt bei AtSEND1 auch für die weiteren getesteten Substrate, von denen lediglich die Replikationsgabel (RF1) keinen deutlichen Umsatzanstieg zwischen 30 und 60 min verzeichnet. Nach der X0 ist die X26-HJ mit homologem Kernbereich das am zweitschwächsten umgesetzte verzweigte Substrat. Im Fall von 30 nM AtGEN1 bleibt der Maximalumsatz ca. 6 % hinter dem der restlichen Strukturen zurück und die Kurve steigt wie bei AtSEND1 deutlich langsamer an.

AtGEN1 zeigt an den anderen Substraten unter den getesteten Bedingungen keine weiteren Unterschiede. Sowohl die genickten HJs nX-30 und nX-32, als auch die Replikationsgabel RF1 und der 5'-Flap sind bereits nach 7,5 min in Anwesenheit von 30 nM AtGEN1 komplett umgesetzt. Das rechte Diagramm in Abbildung 3.8A zeigt die Zeitkinetik für diese vier Strukturen im Vergleich mit der X26 noch einmal mit 1,5 nM AtGEN1. Auch hier zeigen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen nHJs, RF1 und 5'-Flap, wohingegen deren Bevorzugung gegenüber der X26 deutlich ist.

AtSEND1 dagegen zeigt eine feinere Abstufung. Beide nHJs werden gleich schnell und im gleichen Umfang aufgelöst, wobei die Steigung der Kurven es möglich erscheinen lässt, dass die intakte X26 bei längerer Inkubation zum gleichen Umfang umgesetzt werden könnte. Der 5'-Flap wird dagegen zu

Beginn langsamer umgesetzt, nach 60 min ist aber der gleiche Maximalumsatz erreicht, wie die RF1 (Abbildung 3.8B), welche das bevorzugte Substrat von AtSEND1 unter den verwendeten Reaktionsbedingungen darstellt.

Beide Proteine besitzen somit die Fähigkeit ein relativ breites Spektrum verzweigter DNA-Strukturen zu schneiden. Ihre jeweiligen, leicht unterschiedlichen Präferenzen lassen sich zusammenfassen zu:

AtGEN1 5'-Flap = genickte mobile HJ = Replikationsgabel > mobile HJ > statische HJ

AtSEND1 Replikationsgabel > 5'-Flap > genickte mobile HJ > mobile HJ > statische HJ

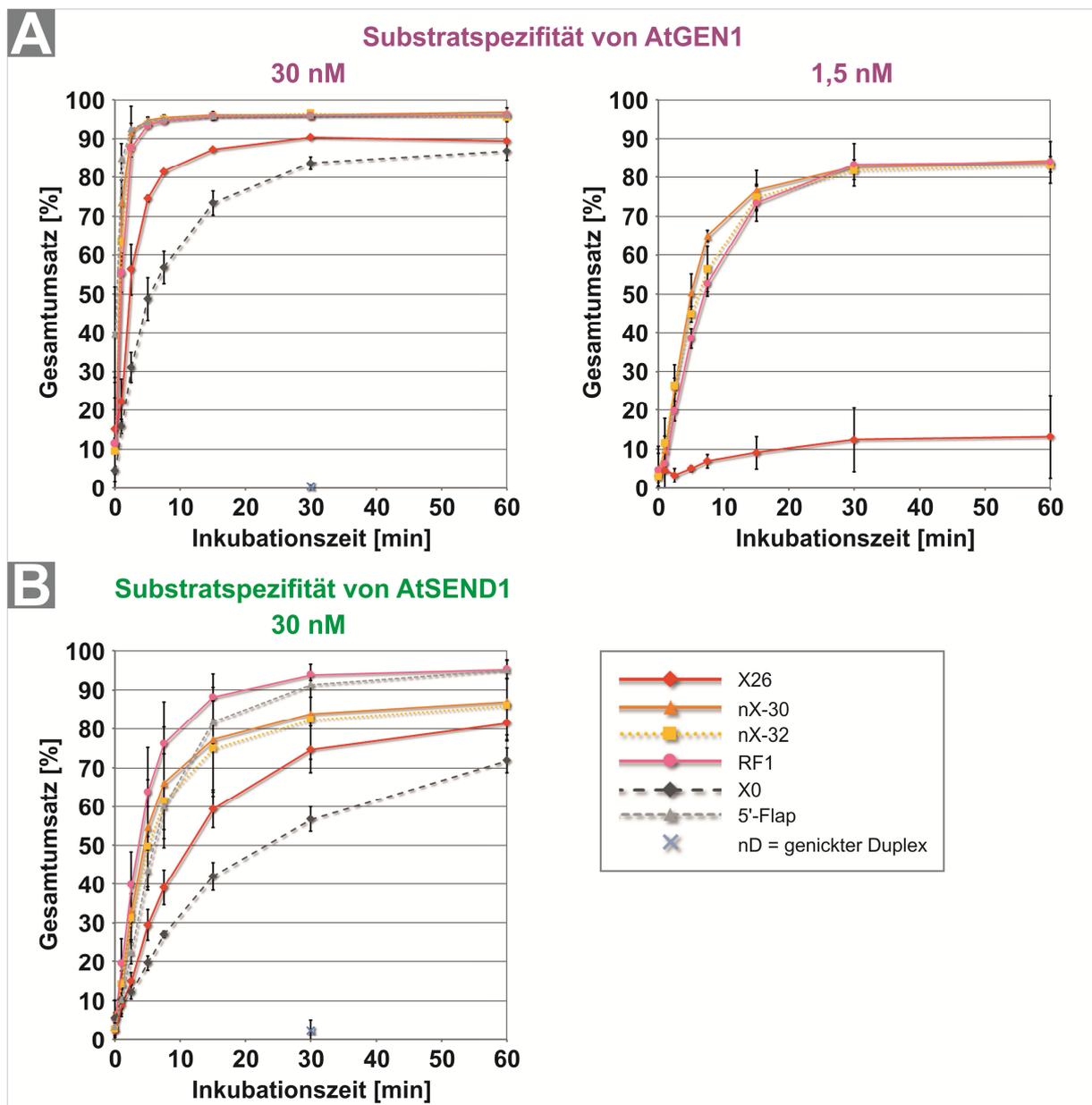


Abbildung 3.8: Umsatz verschiedener verzweigter DNA-Strukturen über Zeit

A, links: Gesamtumsatz (Quantifizierung über native Gele) verschiedener DNA-Junctions durch 30 nM AtGEN1. Der Umsatz an den genickten HJs (nX-30 und nX-32), dem 5'-Flap und der RF erreichen bereits nach 5 min Vollumsatz,

während die X26 und X0 hinter diesem zurückbleiben. Der einzelne Zeitwert für den nD bei 30 min zeigt keinen Umsatz durch AtGEN1 an. **A, rechts:** Um eine Aussage über mögliche Unterschiede zwischen nHJs, 5'-Flap und RF machen zu können, wurden diese Substrate mit der X26 als Vergleich mit 1,5 nM AtGEN1 erneut getestet. Es zeigt sich, dass alle vier Strukturen gleich effizient von AtGEN1 umgesetzt werden. **B:** Analog zu A mit 30 nM AtSEND1. Es zeigen sich deutlichere Unterschiede im Umsatz als für AtGEN1. Die RF stellt das bevorzugte Substrat dar, dicht gefolgt vom 5'-Flap. Die nHJs werden besser umgesetzt als die X26, während die X0 am langsamsten aufgelöst wird.

3.4 Einfach verzweigte Junctions: 5'- und 3'-Flap

Der Vergleich mit anderen verzweigten DNA-Strukturen im vorangegangenen Kapitel ergab, dass 5'-Flaps auf Basis der statischen X0-HJ ein bevorzugtes Substrat sowohl für AtGEN1 als auch AtSEND1 darstellen. Zur genaueren Charakterisierung der nukleolytischen Aktivität beider Enzyme wurden diese an vier verschiedenen 5'- und einem 3'-Flapsubstrat im Hinblick auf ihre Schnittmuster und -effizienzen untersucht. Dabei wurde für jeden 5'-Flap ein anderer Strang der X0-HJ als 5'-Überhang verwendet um den Sequenzkontext entsprechend der vier Stränge der HJ zu variieren. Die Schnittmusterbestimmung erfolgte über Sequenziergele (Abbildung 9.5) und ist schematisch in (Abbildung 3.9A) zusammengefasst.

AtGEN1 und AtSEND1 zeigen an allen 5'-Flap-Substraten eine eindeutige Präferenz für die Schnittposition ein Nukleotid 3' des ss/dsDNA-Übergangs. AtSEND1 erzeugt am 5'-Flap2 einen zusätzlichen Schnitt zwei Nukleotide 3' des JP (Abbildung 3.9A rechts, rote Pfeile). Dieser kommt jedoch nur 0,13x so häufig vor wie der Hauptschnitt 1 nt 3' des JP. Somit zeigen AtGEN1 und AtSEND1 eine Aktivität an 5'-Flap-Substraten, die den FEN1-Flapendonukleasen entspricht.

Der Vergleich der vier, aus unterschiedlichen Oligonukleotiden zusammengesetzten, 5'-Flaps zeigt, dass AtGEN1 den 5'-Flap3 mit 45 % Gesamtumsatz (bestimmt über native Gele) deutlich schlechter umsetzt als die übrigen drei Substrate, die zwischen 87,4 % und 92,4 % Gesamtumsatz aufweisen (Abbildung 3.9B). AtSEND1 zeigt geringere Unterschiede in den Gesamtumsätzen (minimal 84,7 % bis maximal 93,6 %) jedoch ist der 5'-Flap2, an welchem AtSEND1 die zusätzliche Schnittposition 2 nt 3' des JP aufweist, das am schlechtesten umgesetzte Substrat. Betrachtet man die Schnitthäufigkeiten nur für den Hauptschnitt 1 nt 3' des JP (anhand der Pfeilgröße in Abbildung 3.9A) wird der Unterschied auch für AtSEND1 deutlicher, jedoch nicht so ausgeprägt wie für AtGEN1. Abbildung 3.9B zeigt den Sequenzkontext für je sechs Positionen 5' und 3' des JP, die Hauptschnittposition liegt genau rechts neben den fett gedruckten Basen. Es lässt sich keine offensichtliche Korrelation zwischen Sequenzkontext und Schnitthäufigkeit erkennen, dennoch ist der Einfluss der Oligonukleotidsequenz ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Aktivitäten an den strukturell gleichen Substraten.

Dass die Struktur einen übergeordneten Einfluss auf die Aktivität beider Proteine ausübt, ist am 3'-Flap-Substrat ersichtlich. Obwohl es die gleiche Sequenz am ss/dsDNA-Übergang des markierten Oligonukleotids aufweist, wie der 5'-Flap1, wird es von AtGEN1 und AtSEND1 nicht geschnitten (Abbildung 3.9C).

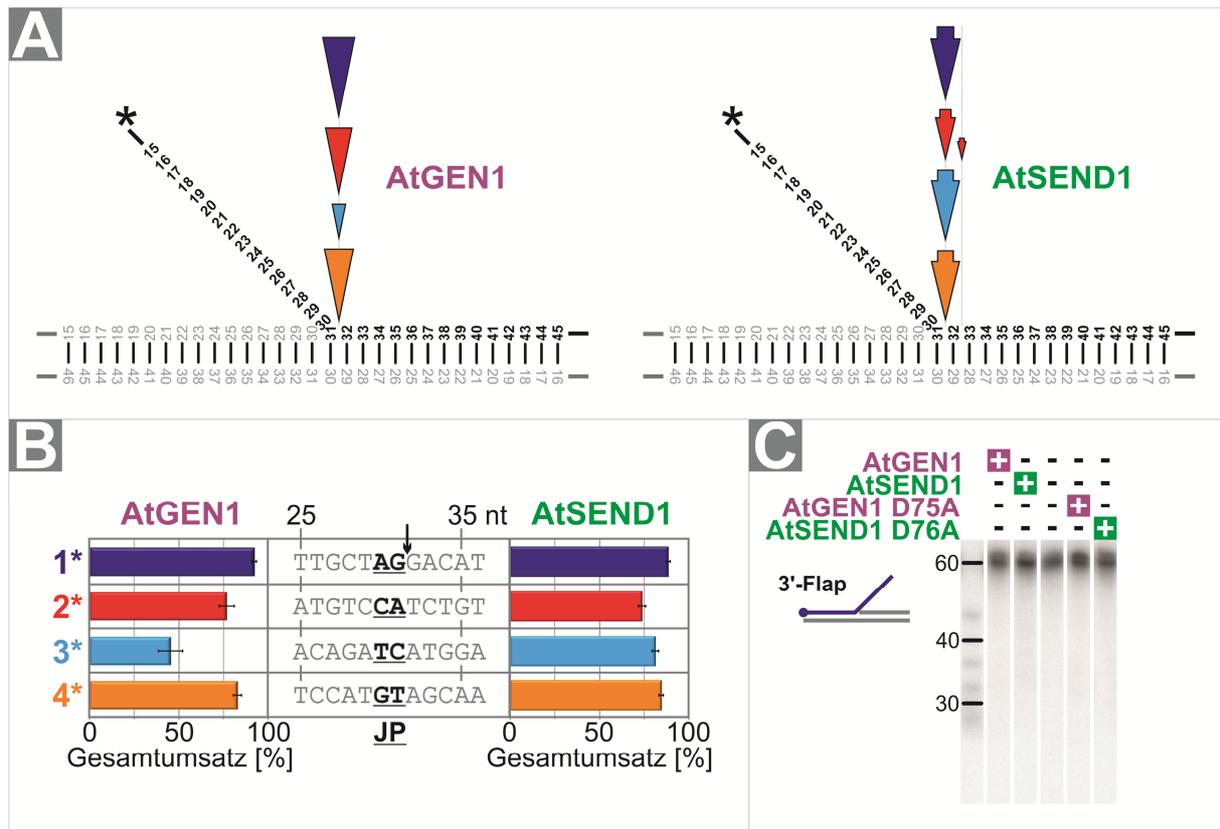


Abbildung 3.9: Aktivität an 5'- und 3'-Flap-Substraten

A: schematische Zusammenfassung des Schnittmusters von AtGEN1 (links) und AtSEND1 (rechts) an vier verschiedenen 5'-Flap-Substraten (dunkelblau: 5'-Flap1, rot: 5'-Flap2, hellblau: 5'-Flap3, orange: 5'-Flap4). Die Größen der Pfeile sind proportional zum Anteil des jeweiligen Schnittprodukts am Gesamtsubstrat. Gezeigt ist der Bereich 15 Nukleotide um den JP, die Striche an den Enden symbolisieren weitere 14 Nukleotide. Alle Substrate wurden am 5'-Ende des Überhangs mit 32P markiert, symbolisiert durch *. **B:** Gesamtumsatz der 5'-Flaps durch AtGEN1 und AtSEND1 im Vergleich. Die Quantifizierung erfolgte an Autoradiogrammen nativer Gele. In der Mitte ist der Sequenzkontext in 5'-3'-Richtung von 12 Positionen um den ss/dsDNA-Übergang (JP) für die jeweiligen 5'-Flaps1 – 4 gezeigt. Der Pfeil markiert die Hauptschnittposition 1 nt 3' des JP **C:** AtGEN1 und AtSEND1 zeigen keine Aktivität an 3'-Flap1, welcher den gleichen markierten Strang trägt wie der 5'-Flap1. Gezeigt sind Ausschnitte aus dem Autoradiogramm einer denaturierenden 20 %-7 M-Urea-TBE-PAGE. 60, 40 und 30 geben die Länge der Markeroligonukleotide in nt an.

3.5 Zweifach verzweigte Junctions: X26-RFs

Da AtGEN1 und AtSEND1 Replikationsgabeln nachahmende Strukturen zu ihren bevorzugten Substraten zählen, stellt sich die Frage nach den genauen Eigenschaften dieser Aktivität. Zu diesem Zweck wurden drei oligonukleotidbasierende Replikationsgabel RF1 – RF3, basierend auf der Sequenz der X26-HJ, mit unterschiedlich positioniertem JP und verschiedenen Einzelstranglücken in der Entsprechung des Folgestrangs getestet. Die Unterschiede werden an der schematischen Darstellung in Abbildung 3.10 deutlich. Die genaue Komposition der RFs wurde dabei durch Ergebnisse an den genickten X26-HJs, welche in Kapitel 3.6 dargestellt werden, bestimmt. Zudem trägt das Oligonukleotid, dessen 5'-Ende am JP liegt, ein endständiges Phosphat, um eine natürliche Topologie des JP nachzuahmen.

Auffällig ist die Tatsache, dass beide Proteine nur Strang 1 (blau) aller drei RFs mit einer Häufigkeit von ca. 80 % schneiden, aber keinerlei Aktivität an Strang 2 (rot) aufweisen (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Dies lässt vermuten, dass entweder nur die Folgestrangmatrize einer RF als

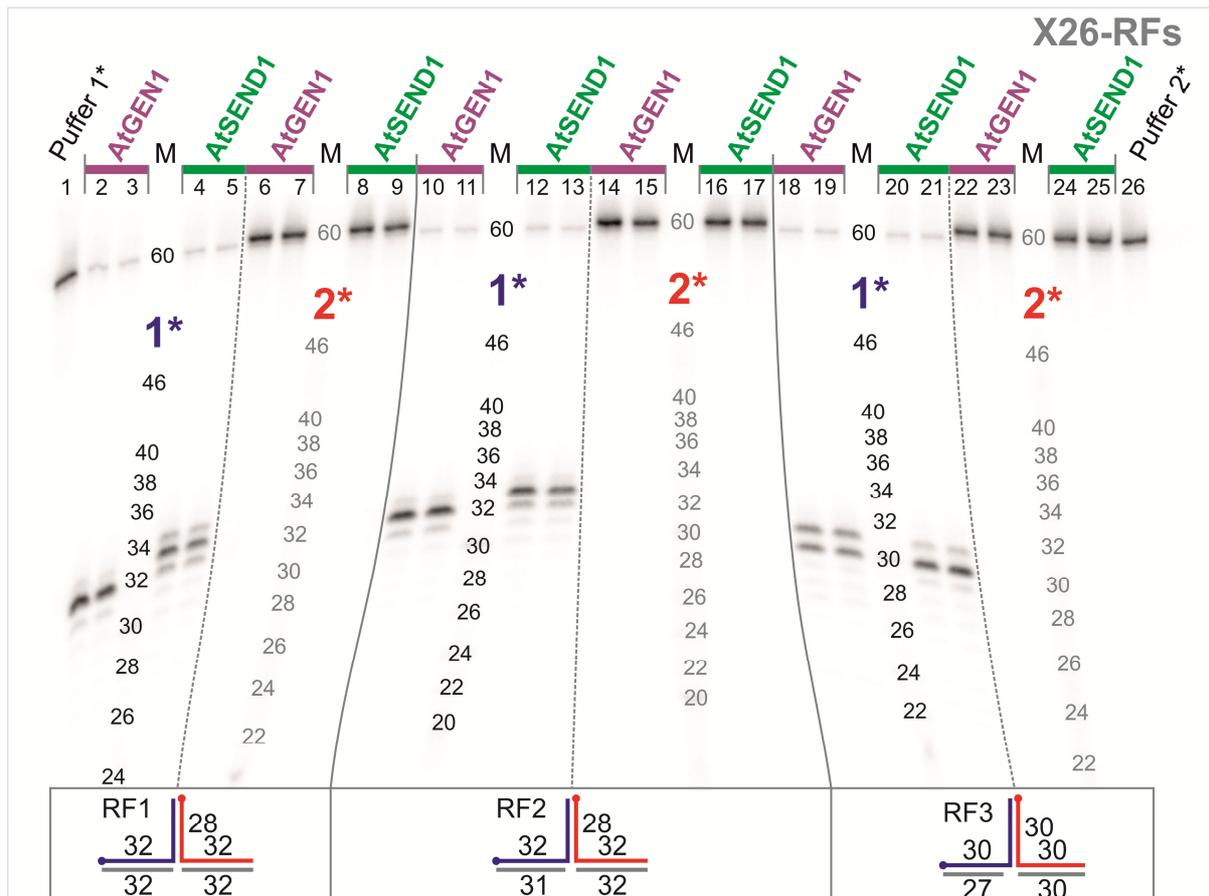


Abbildung 3.10: Schnittmusterbestimmung an X26-RFs, Sequenziergel

Autoradiogramm des Sequenziergels zur Schnittmusterbestimmung von AtGEN1 und AtSEND1 an 3 verschiedenen X26-basierenden RF-Substraten. Es wurde immer jeweils ein Strang pro RF am 5'-Ende radioaktiv markiert (symbolisiert durch die Punkte; 1* = Strang 1 \triangleq Matrizenstrang der Folgestrangsynthese, 2* = Strang 2 \triangleq Matrizenstrang der Leitstrangsynthese). Alle Proteinproben wurden als Duplikate geladen. M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge. Die Markerbanden selbst sind in der hier gezeigten linearen Darstellung auf Grund ihrer schwachen Markierung nicht sichtbar.

Nukleasesubstrat von AtGEN1 und AtSEND1 dient oder der Strang 2 keine für eine Schnittaktivität günstige Sequenz beinhaltet. Gegen letzteres spricht jedoch, dass die intakte X26-HJ, die auf dem gleichen Sequenzkontext basiert, in Strang 2 gespalten wird (siehe Abbildung 3.22).

Für alle drei RFs wird angenommen, dass der Verzweigungspunkt durch vollständige Hybridisierung der beiden kürzeren Oligonukleotide mit ihrem 60 nt Gegenoligonukleotid bestimmt wird und somit RF1 und RF2 einen einzelnen 28 bp Arm und zwei gespreizte 32 bp Arme aufweisen, obwohl sie einen zentralen homologen Kernbereich von 26 nt besitzen. Analog sollte die RF3 drei gleich lange Arme von je 30 bp aufweisen, wie in der schematischen Strichgrafik in Abbildung 3.10 gezeigt. Unter dieser Annahme besitzt die RF2 eine Einzelstranglücke direkt am JP von einem Nukleotid im Folgestrang, die RF3 eine Gap von 3 nt im Folgestrang.

AtGEN1 erzeugt an RF1 und RF2 ein identisches Schnittmuster mit einem Hauptschnittprodukt von 32 nt Länge und je zwei schwachen Nebenschnitten an Position 31 und 33 (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11A). Der 1 nt Gap scheint demnach keinen Einfluss auf die Aktivität von AtGEN1 an dieser RF zu nehmen. Die RF3 mit 30 bp Armen wird zu gleichen Teilen zwischen den Nukleotiden 29

und 30 sowie 30 und 31 gespalten (Schnittprodukte von 30 nt und 31 nt). Somit spaltet AtGEN1 alle drei RFs exakt im JP mit einem zusätzlichen Schnitt in der RF3 ein Nukleotid 3' des JP.

Wie AtGEN1 zeigt AtSEND1 unter den Assaybedingungen einen Gesamtumsatz aller drei RFs von knapp über 80 % (Abbildung 3.11B). AtSEND1 erzeugt an allen drei Substraten drei Schnittprodukte mit einem zentralen Hauptschnitt und zwei Nebenschnitten (1 nt länger bzw. kürzer), vergleichbar mit der Aktivität von AtGEN1 an den RFs 1 und 2. Dabei zeigt das Hauptprodukt von 33 nt an RF1 und RF2 eine bevorzugte Schnittstelle ein Nukleotid 3' des JP an, während an der RF3 der Hauptschnitt exakt im JP selbst gesetzt wird.

Eine schematische Zusammenfassung der Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 ist in Abbildung 9.6 dargestellt und die hier präsentierten Ergebnisse werden in den Kapiteln 3.6.3 und 4.4 mit denen der genickten HJs in Zusammenhang gebracht.

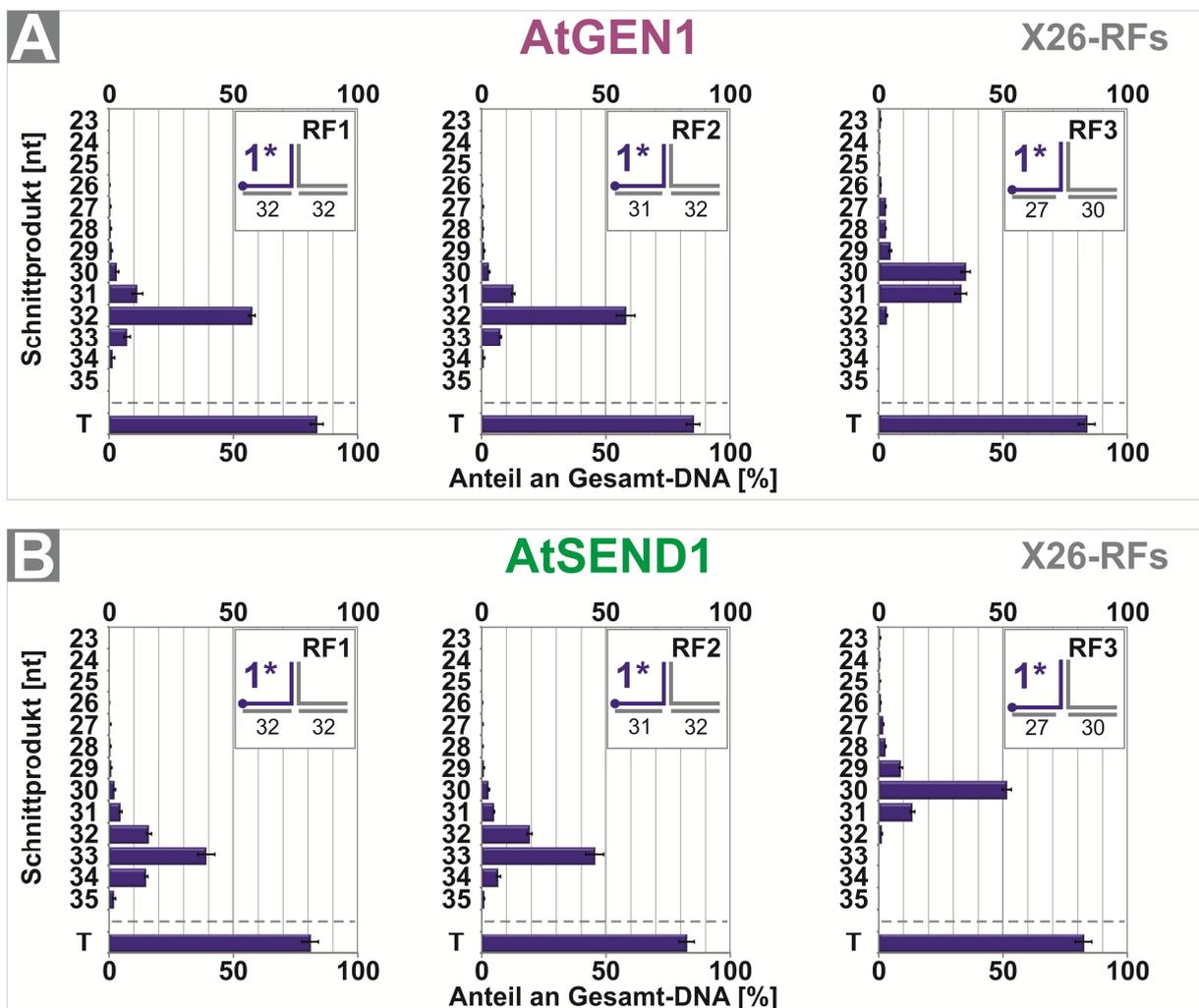


Abbildung 3.11: Schnittmusterbestimmung an X26-RFs, Quantifizierung

Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte von AtGEN1 (A) und AtSEND1 (B) an den X26-RF-Substraten. Schwache Signale, die in den Diagrammen sichtbar sind, nicht jedoch in Abbildung 3.10, liegen unterhalb der Detektionsgrenze der linearen Darstellung und sind nur durch Gammaverstärkung zu identifizieren. T = Summe der Anteile aller Produkte am Gesamtsignal [%]

3.6 AtGEN1 und AtSEND1 an genickten Holliday Junctions

Genickte HJs sind neben den bereits beschriebenen 5'-Flaps und Replikationsgabeln bevorzugte Substrate von AtGEN1 und AtSEND1. Zudem stellen sie, nachdem zuerst einfach verzweigte Substrate (Flaps und RFs) getestet wurden, einen weiteren Schritt in Richtung der komplexeren, vollständigen 4-Wege-Kreuzungen dar. Die Aktivität an nHJs im Vergleich zur intakten HJ ermöglicht zudem Aussagen über den Schnittmechanismus der potentiellen Resolvasen (vgl. Kapitel 1.3.1.4.1).

In dieser Arbeit wurden zwei nHJs getestet. Beide basieren auf der teilweise migrierbaren X26-HJ und unterscheiden sich von dieser lediglich durch den unterschiedlich positionierten Nick in Strang 3. Um die genickten Modell-HJs möglichst gut den natürlichen Gegebenheiten anzunähern, trugen die Oligonukleotide, welche die zweite Hälfte des Stranges 3 bildeten (Oligonukleotide „3b“), ein 5'-Phosphat. Somit konnte die natürliche Topologie des Nicks mit einem 3'-OH und 5'-Phosphat, wie nach dem Nicking durch eine Endonuklease vorhanden, nachgeahmt werden. Die Auswahl der Positionen der Nicks basiert auf Ergebnissen an der intakten X26 (Kapitel 3.8) und wird in Kapitel 3.6.3 näher erläutert werden.

3.6.1 Die nX-30: eine nHJ mit zentralem Nick

Aktivität von AtGEN1 und AtSEND1 an Strang 1 der nX-30

AtGEN1 und AtSEND1 prozessieren die nX-30-HJ mit einem Nick in der Mitte des Strangs 3 über nukleolytische Spaltung der Stränge 1 und 4, wobei Strang 1 der gegenüberliegende, antiparallele Strang zu Strang 3 ist. Die Schnitthäufigkeit ist für beide Proteine jeweils in Strang 1 höher (85 % bzw. 75 %) als in Strang 4, welcher von AtGEN1 zu 50 % gespalten wird und von AtSEND1 zu 25 % (Abbildung 3.12B). Diese Bevorzugung passt zu den Erwartungen an eine Resolvase, welche die nHJ durch einen symmetrisch orientierten Schnitt gegenüber dem Nick auflösen sollte, erfüllt dieses Kriterium jedoch nicht vollständig. Die Bestimmung der Produktlängen zeichnet ein widersprüchliches Bild. AtGEN1 setzt zwei Hauptschnitte nach Nukleotid 30 und 31 in Strang 1 (Abbildung 3.12A, Spuren 2 und 3), wobei das 31 nt-Produkt mit 51,4 % des Gesamtprodukts das häufigere ist und das 30 nt-Produkt noch 28,2 % des Gesamtprodukts ausmacht (Abbildung 3.12B, links). Somit liegt der Hauptschnitt durch AtGEN1 genau 1 Nukleotid in 3'-Richtung versetzt zum Nick in Strang 3, während die Position exakt gegenüber auch, aber schwächer gespalten wird.

Im Fall von AtSEND1 ist die Situation eine andere. AtSEND1 zeigt eine deutliche Präferenz für den Schnitt exakt gegenüber dem Nick und erzeugt mit 60,4 % an der Summe der Produkte bevorzugt ein 30 nt-Schnittprodukt von Strang 1 (Abbildung 3.12A, Spuren 4 und 5, Abbildung 3.12B, rechts). Die von AtGEN1 bevorzugte Position ein Nukleotid 3' davon wird auch von AtSEND1 gespalten, jedoch mit 23,4 % des Gesamtprodukts nur ca. ein Drittel so häufig. Somit lässt sich für AtSEND1 eine Aktivität festhalten, die in der Wahl der Schnittposition einer HJ-Resolvase entspricht.

Die Spaltung von Strang 4 der nX-30 führt zu Nicht-Resolvaseprodukten

Die Aktivität beider Enzyme an Strang 4 gibt Grund zur genaueren Betrachtung des Schnittmusters, welches in Abbildung 3.13 zusammengefasst ist. Im Vergleich von AtGEN1 zu AtSEND1 fällt auf, dass zwar die Schnitteffizienz in Strang 4 deutlich unterschiedlich ist, jedoch die Positionen der nukleolytischen Spaltung die gleichen sind, ebenso wie die Präferenz für Position 33. Die Aktivitäten von AtGEN1 und AtSEND1 im Strang 4 führt zur Bildung von Produkten, die nicht einer

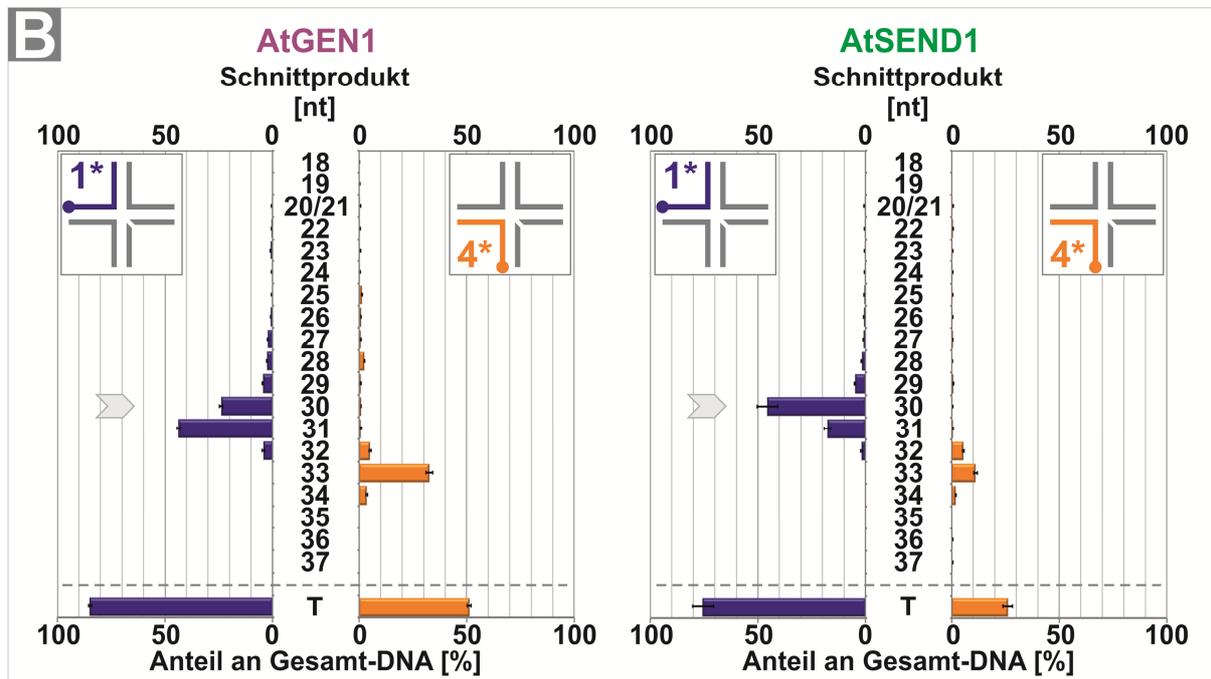
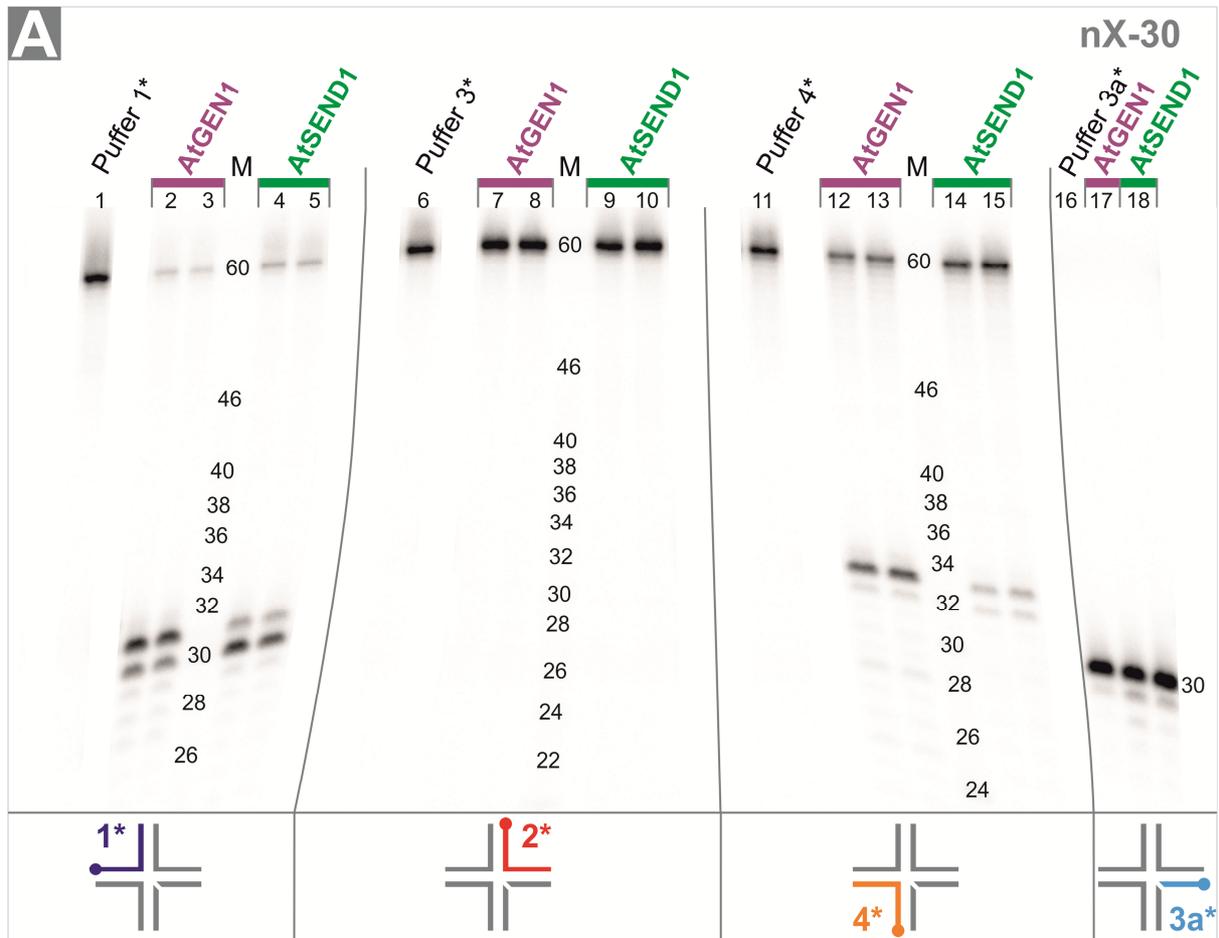


Abbildung 3.12: Schnittmusterbestimmung an der nX-30

A: Autoradiogramm des Sequenziergels zur Schnittmusterbestimmung von AtGEN1 und AtSEND1 an der nX-30. Es wurde immer jeweils ein Strang pro RF am 5'-Ende radioaktiv markiert (symbolisiert durch die Punkte). M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge. Die Markerbanden selbst sind in der hier gezeigten linearen Darstellung auf Grund ihrer schwachen Markierung nicht sichtbar. **B:** Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte von AtGEN1 und AtSEND1 an den Strängen 1 und 4 der nX-30. Es werden nur die Schnittprodukte zwischen 18 und 37 nt gezeigt. Der vollständige Datensatz inklusive der Stränge 2 und 4 ist in Abbildung 9.7 zu

finden. Der hellgraue Pfeil in den Diagrammen zeigt die Position gegenüber dem Nick an. T = Summe aller Produkte am Gesamtsignal [%].

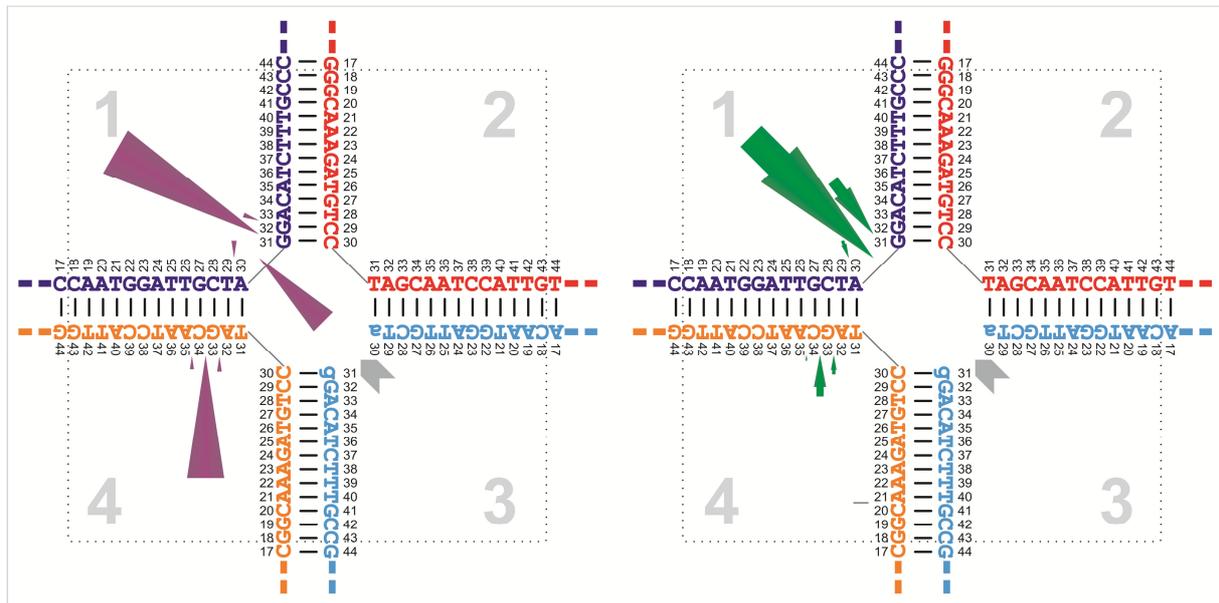


Abbildung 3.13: Schnittmuster der nX-30

Gezeigt ist der migrierbare Kernbereich der nX-30 plus ein Nucleotid des heterologen Bereichs. Lila Pfeile symbolisieren die Schnittpositionen von AtGEN1, grüne Pfeile die von AtSEND1. Die Größe der Pfeile entspricht dem Anteil des Produkts am Gesamtsignal, also der Gesamtmenge an DNA (Substrat und Produkte, Werte in den Diagrammen in Abbildung 3.12B). Es werden nur Schnittpositionen gezeigt, die mehr als 5 % am Gesamtprodukt des jeweiligen Stranges ausmachen. Die Position des Nicks im JP wird durch den grauen Pfeil angezeigt und die angrenzenden Basen sind klein geschrieben.

HJ-Resolvaseaktivität entsprechen, namentlich kurzen Duplices und RF-Zwischenstrukturen. Die Analyse der Schnittprodukte im nativen Gel (Abbildung 3.14) zeigt, dass beide Enzyme an den 1*- und 4*-markierten nX-30-HJs sowohl Resolvaseprodukte (nD) als auch Nicht-Resolvaseprodukte (kD = ein vollständiger abgespaltener dsDNA-Arm der HJ) erzeugen. Dabei erzeugt AtGEN1 nD und kD ungefähr im Verhältnis 1:1, während AtSEND1 ein Verhältnis von 3/4 zu 1/4 zeigt. Über die 2*-Markierung lassen sich für beide Proteine nur Produkte detektieren, die dem nD entsprechen. Mit der 3*-Markierung erzeugt AtSEND1 ebenfalls nur nD-Produkte, während mit AtGEN1 zusätzlich eine minimale Menge an RF-Intermediat detektierbar ist.

Anhand dieser Daten stellen sich zwei Fragen:

1. Ist diese Aktivität an der nX-30 ein Einzelfall oder lässt es sich mit anderen HJs reproduzieren?
2. Wie hängen Schnittmuster und native Produktstrukturen zusammen?

Für die Antwort auf Frage 1 sei auf die Kapitel 3.6.2 und 3.7 verwiesen, in denen die Aktivität von AtGEN1 und AtSEND1 an der nX-32 und der statischen X0 analysiert wird.

Um zu klären, welche Schnittprodukte von Strang 1 der nX-30 in welcher nativen Produktstruktur wiederzufinden sind, wurde das in Abbildung 3.15A schematisch zusammengefasste Experiment durchgeführt. Die Spuren 7 – 12 in Abbildung 3.15B zeigen, dass im Fall von AtSEND1 die Verteilung der Schnittprodukte für Resolvaseprodukte (nD) und Nicht-Resolvaseprodukte (kD) identisch sind. Sowohl bei der Auflösung zu nD als auch zu kD durch AtSEND1 erfolgen die Schnitte hauptsächlich an Position 30 (ersichtlich am starken Signal der 30 nt-Produktbande) und nur untergeordnet an

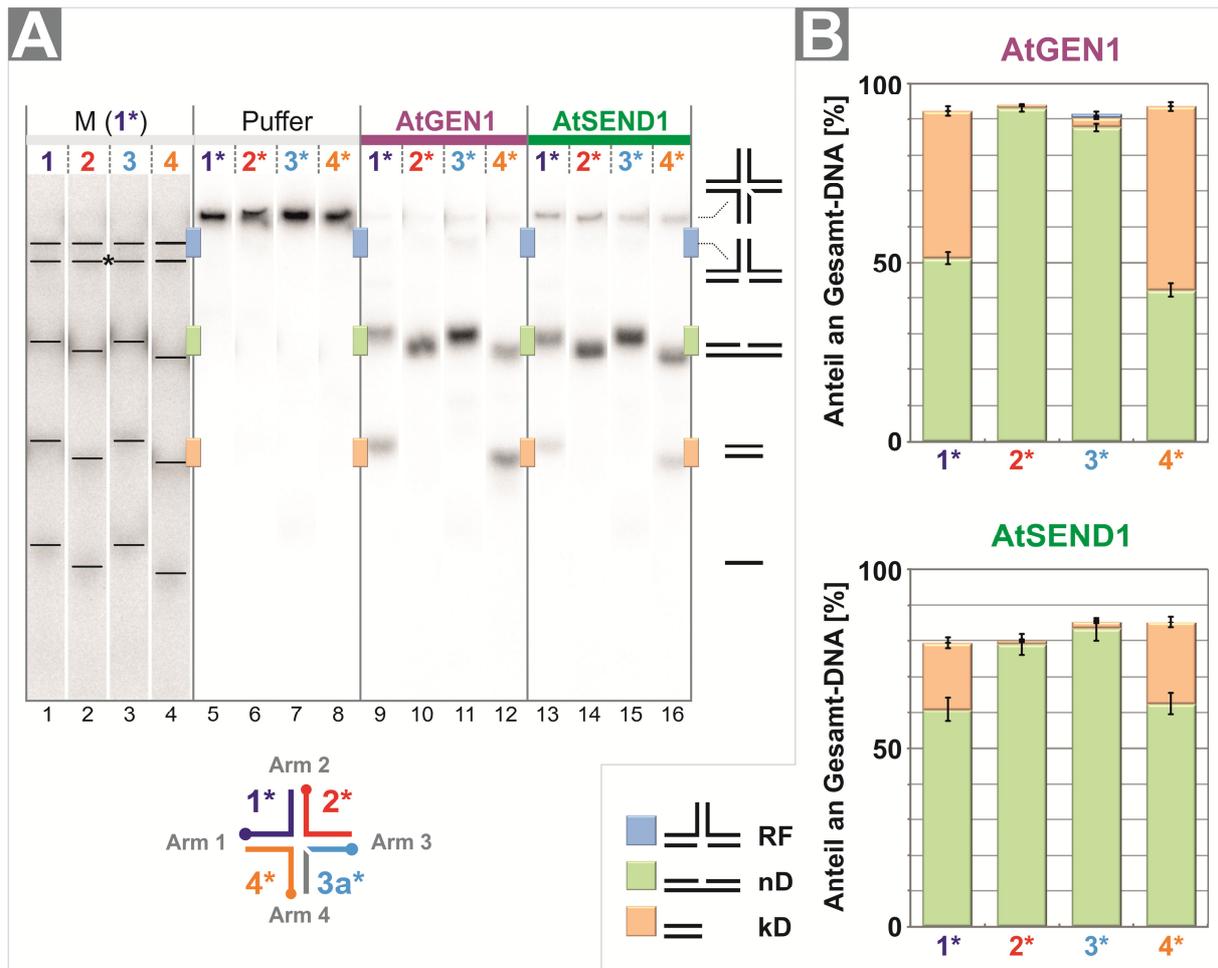


Abbildung 3.14: AtGEN1 und AtSEND1 an nX-30 – native Produktstrukturen

A: Gezeigt sind exemplarische Spuren von Reaktionsprodukten von AtGEN1 und AtSEND1 an der nX-30, jeweils an einem der vier Stränge markiert (symbolisiert durch die Punkte). Native 12 % TBE-PAGE, M = native Markerstrukturen. Horizontale Linien zeigen die Laufhöhe der rechts dargestellten Strukturen an (von oben nach unten: RF, nD, kD, 30 nt ssDNA). Die mit * markierten horizontalen Linien zeigen die Laufhöhe von 5'-Flap-Strukturen an. Die Markerspuren sind gammaverstärkt dargestellt (Faktor 2,3 in AIDA), da die sehr schwachen Signale anders nicht sichtbar sind. Alle anderen Spuren sind linear dargestellt. **B:** Quantifizierung der nativen Produktstrukturen nach Umsatz der vier verschiedenen markierten nX-30-HJs durch AtGEN1 (oben) bzw. AtSEND1 (unten). Die Gesamthöhe der Säulen entspricht dem Anteil der Summe aller Produkte an der Gesamt-DNA je Ansatz [%].

Position 31. Dies entspricht der in Abbildung 3.12B gezeigten Verteilung. Für AtGEN1 zeigt sich dagegen ein differenziertes Bild. Während die genickten Duplices nahezu ausschließlich über Schnitte durch AtGEN1 an Position 31 im Strang 1 (31 nt-Produkt) entstehen (Abbildung 3.15B, Spuren 1 – 6), finden sich sowohl Produkte von 31 nt als auch 30 nt Länge beim kurzen Duplex. Das bedeutet, dass der Schnitt exakt gegenüber dem Nick nicht wie erwartet mit einer Resolvaseaktivität korreliert, sondern stattdessen ausschließlich zu einem Produkt führt, welches einem einzelnen Arm der HJ entspricht. Damit ein solches Produkt entstehen kann, muss entweder der erste Schnitt in Strang 1 erfolgen, was zu einem nD-Produkt führt, und dieses dann durch einen weiteren Schnitt in Strang 4 in zwei kurze Duplices zerteilt werden. Alternativ kann der erste Schnitt in Strang 4 erfolgen, was in der Bildung eines RF-Intermediats resultiert, von dem dann durch den zweiten Schnitt in Strang 1 ein zweiter kurzer Duplex abgespalten wird. In jedem Fall müssen zwei Schnitte in benachbarten Strängen erfolgen. Die Tatsache, dass, wie in Kapitel 3.3 gezeigt, genickte Duplices nicht als Substrat

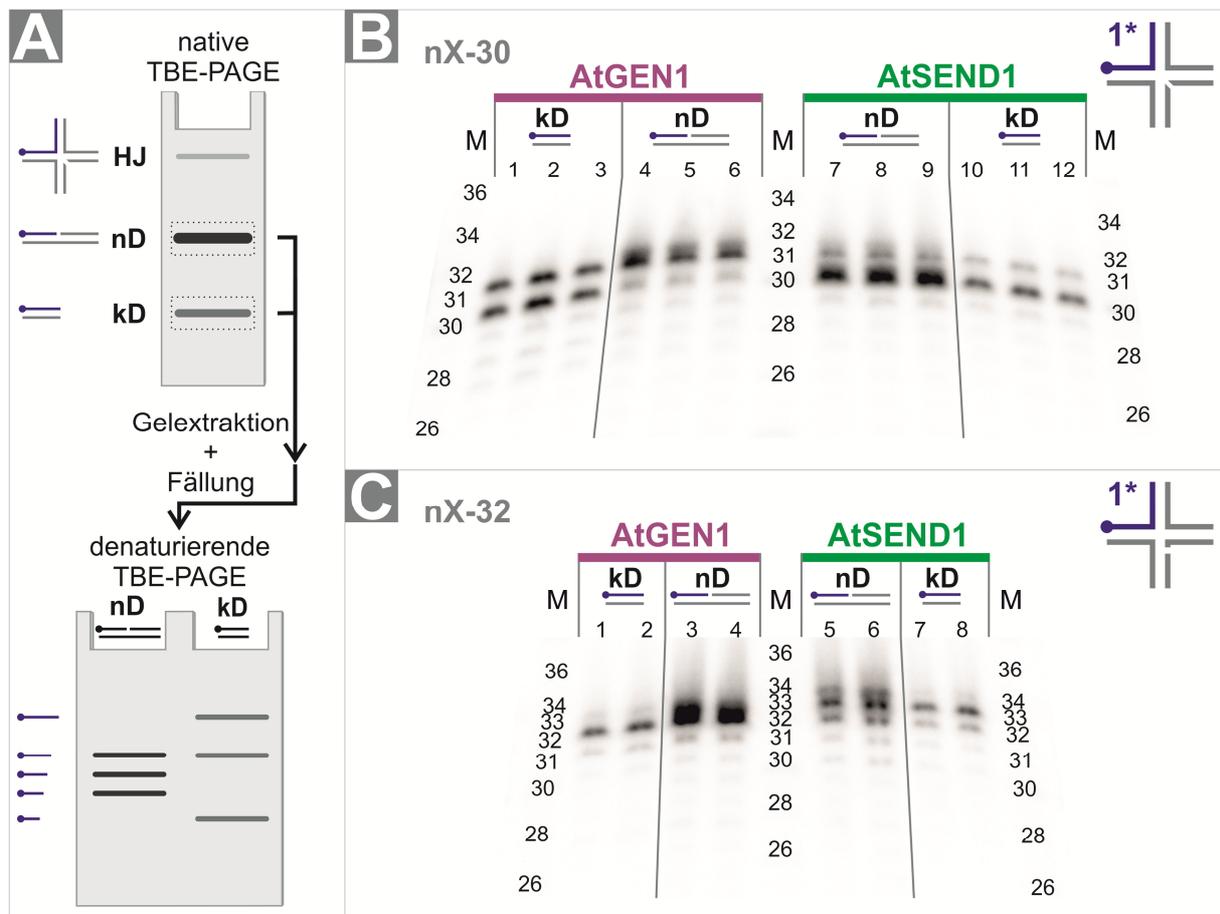


Abbildung 3.15: Identität des 30 nt-Schnittprodukts

A: schematischer Ablauf des Experiments: Nach Inkubation der HJ mit Enzym wurden die Produkte (nD und kD) vom Substrat über native TBE-PAGE getrennt. Die Banden der Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und getrennt durch Mörsern und Inkubation bei 72°C unter Schütteln in ddH₂O eluiert. Die eluierte DNA wurde gefällt, in denaturierendem Ladepuffer aufgenommen und über ein Sequenziergel nach der Größe der Schnittprodukte des markierten Strangs aufgetrennt. Somit ließ sich bestimmen, welche Schnitte in Strang 1 der jeweiligen nHJ zu welcher nativen Struktur führten. **B:** Ausschnitt des Sequenziergels zur Größenbestimmung der Schnittprodukte in Strang 1 an der nX-30 durch AtGEN1 und AtSEND1. Es wurden Triplikate geladen. **C:** Wie B, aber für die nX-32 (siehe Kapitel 3.6.2) und Duplikate gezeigt. nD = genickter Duplex, kD = kurzer Duplex, M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge.

für AtGEN1 und AtSEND1 geeignet sind, schließt die erstgenannte Möglichkeit aus. Demnach müssen die kurzen Duplices mit der 1*-Markierung über ein RF-Intermediat entstehen.

3.6.2 Die nX-32: eine zweite migrierbare nHJ

Als zweite genickte HJ wurde die nX-32 getestet, bei welcher der Nick im Vergleich zur nX-30 um zwei Nukleotide in Richtung des 3'-Endes von Strang 3 verschoben ist.

Beide Proteine zeigen an Strang 2 der nX-32 im Sequenziergel keinen detektierbaren Umsatz (Abbildung 3.16A). Ebenso setzten beide Proteine ihre Schnitte mit 85 % (AtGEN1) und 68 % (AtSEND1) bevorzugt in Strang 1 im antiparallelen Strang gegenüber dem Nick, während die Aktivität an Strang 4 deutlich geringer ausfällt. Auch für die nX-32 wurden, wie in Abbildung 3.15 beschrieben, die beiden nativen Produktklassen (kurzer und langer Duplex) über Gelextraktion auf das

Vorhandensein spezifischer Schnittprodukte hin untersucht. Sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 erzeugen jeweils für beide Produktklassen ein gleiches Schnittmuster (Abbildung 3.15C).

AtGEN1 zeigt stärkeren HJ-Resolvasecharakter an nX-32

AtGEN1 zeigt an der nX-32 ein im Vergleich zur nX-30 stark konzentriertes Schnittmuster (Abbildung 3.16 und Abbildung 3.17): ein einziges, starkes Signal auf Höhe von 32 nt (Abbildung 3.16A, Spuren 2 und 3) sticht mit 68,8 % Anteil am Gesamtprodukt deutlich aus den Signalen der Nebenschnitte hervor, welche nur auf 12,3 % (33 nt) bzw. 9,2 % (31 nt) kommen (Abbildung 3.16B). Somit schneidet AtGEN1, die nX-32 mit hoher Effizienz (85,8 % Gesamtumsatz) in Strang 1 bevorzugt genau gegenüber dem Nick, während die aberrante Aktivität an Strang 4 im Vergleich zur nX-30 unterdrückt zu sein scheint. Die entsprechende Aktivität an Strang 4 der nX-32 spaltet nur ca. 35 % des Substrats, während an der nX-30 dieser Anteil bei 50 % lag (vgl. Abbildung 3.12B und Abbildung 3.16B, jeweils das linke Diagramm). Auffällig ist auch, dass die Schnittpositionen von AtGEN1 in Strang 4 gleichmäßiger verteilt sind als an der nX-30 beobachtet, was für eine relativ unspezifische Aktivität spricht. Die einzige Position, die in Strang 4 bevorzugt geschnitten wird, ist die Position 28 (Abbildung 3.16B).

Die Betrachtung der Produktstrukturen im nativen Gel zeigt für AtGEN1 einen geringeren Anteil von kD (Nicht-Resolvaseprodukt) am Gesamtprodukt von maximal 1/3 an der 4*-markierten nX-32. An der 1*-markierten nX-32 ist der Anteil mit ca. 1/5 noch einmal deutlich geringer. An der nX-30 waren es zum Vergleich ca. 50 % mit beiden Markierungen. Mit diesen Eigenschaften entspricht die Aktivität von AtGEN1 an der nX-32 eher der einer HJ-Resolvase als an der nX-30.

AtSEND1 zeigt Resolvasecharakter an nX-32

Der Nick der nX-32 bewirkt, dass AtSEND1 in Strang 1 ein breiteres Schnittmuster zeigt als an der nX-30. Das 33 nt-Produkt kennzeichnet mit 44,4 % des Gesamtschnittprodukts eine leichte Bevorzugung gegenüber der Spaltung an Position 32 (26,3 % der Summe der Produkte). Das dritte, im Autoradiogramm hervortretende Signal (Abbildung 3.16A Spuren 4 und 5) läuft auf Höhe von 34 nt. Somit setzt AtSEND1 seinen Schnitt am häufigsten vom Nick aus gesehen 1 nt nach 3' verschoben, gefolgt von der Schnittposition genau gegenüber dem Nick. Insgesamt spaltet AtSEND1 68 % aller Substratmoleküle in Strang 1, während 25 % (wie bei der nX-30) in Strang 4 geschnitten werden. Dabei ist der Hauptschnitt an Position 29 weniger betont, ähnlich wie für AtGEN1 der Fall (Abbildung 3.16B).

Im nativen Gel bleibt die Verteilung von kD und nD für alle Markierungen gleich wie bei der zuvor getesteten nX-30: 1/4 zu 3/4 mit den Markierungen 1* und 4* sowie kaum (siehe unten) oder kein kD mit den 2*- und 3*-Markierungen (vgl. Abbildung 3.12B und Abbildung 3.16B, jeweils das rechte Diagramm).

Zusammengenommen entspricht zwar die Bevorzugung von AtSEND1 für den Strang gegenüber dem Nick der Aktivität einer HJ-Resolvase, jedoch liegt die Hauptschnittposition um 1 nt nach 3' verschoben. Dass dies dennoch im Einklang mit einer HJ-Resolvasefunktion gebracht werden kann, wird in Kapitel 4.5.1.4 diskutiert.

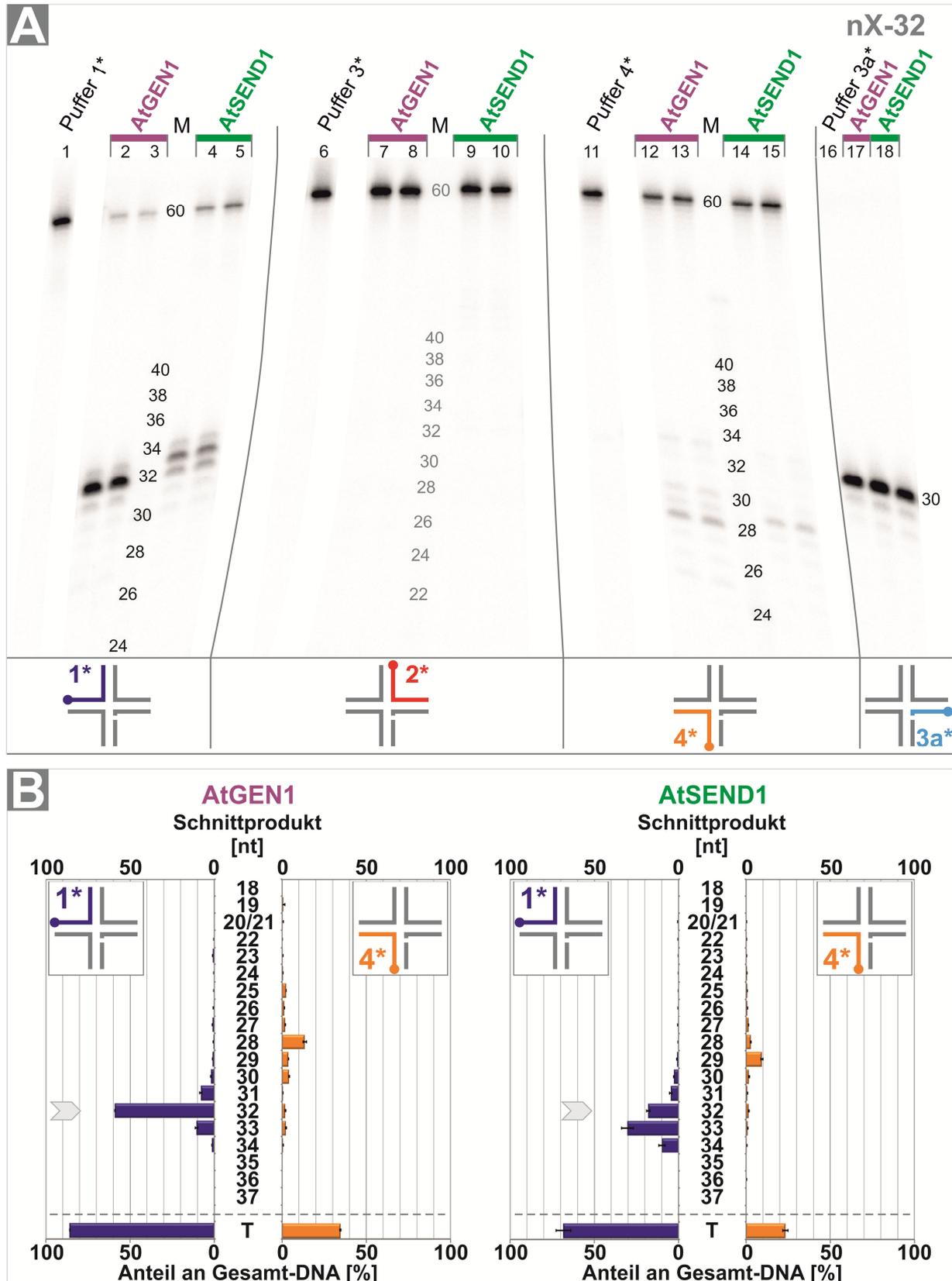


Abbildung 3.16: Schnittmusterbestimmung an der nX-32

A: Autoradiogramm des Sequenziergels zur Schnittmusterbestimmung von AtGEN1 und AtSEND1 an der nX-32. Es wurde immer jeweils ein Strang pro RF am 5'-Ende radioaktiv markiert (symbolisiert durch die Punkte). M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge. Die Markerbanden selbst sind in der hier gezeigten linearen Darstellung auf Grund ihrer schwachen Markierung nicht sichtbar. **B:** Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte

von AtGEN1 und AtSEND1 an den Strängen 1 und 4 der nX-32. Es werden nur die Schnittprodukte zwischen 18 und 37 nt gezeigt. Der vollständige Datensatz inklusive der Stränge 2 und 4 ist in Abbildung 9.8 zu finden. Der hellgraue Pfeil in den Diagrammen zeigt die Position an, die gegenüber dem Nick liegt. T = Summe aller Produkte am Gesamtsignal [%].

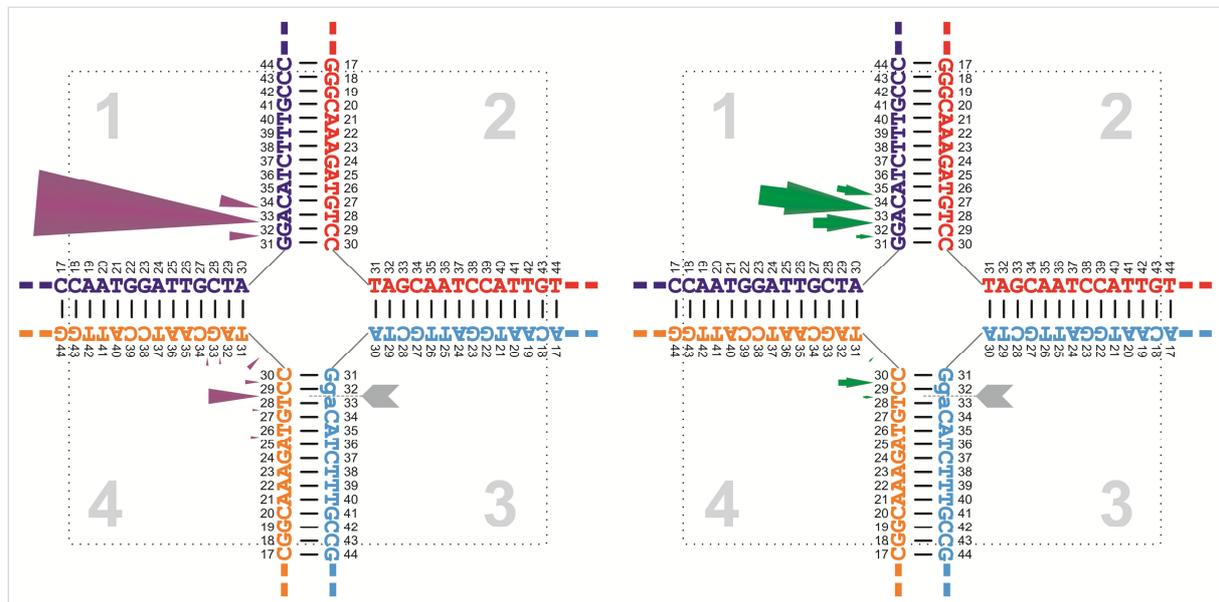


Abbildung 3.17: Schnittmuster der nX-32

Gezeigt ist der migrierbare Kernbereich der nX-32 plus ein Nucleotid des heterologen Bereichs. Lila Pfeile symbolisieren die Schnittpositionen von AtGEN1, grüne Pfeile die von AtSEND1. Die Größe der Pfeile entspricht dem Anteil des Produkts am Gesamtsignal, also der Gesamtmenge an DNA (Substrat und Produkte, Werte in den Diagrammen in Abbildung 3.16B). Es werden nur Schnittpositionen gezeigt, die mehr als 5% am Gesamtprodukt des jeweiligen Stranges ausmachen. Die Position des Nicks zwischen Nucleotid 32 und 33 wird durch den grauen Pfeil angezeigt und die angrenzenden Basen sind klein geschrieben.

Die Entstehung von ca. 9% (AtGEN1) bzw. ca. 5% kurzem Duplex (AtSEND1) an der 3*-markierten nX-32 deutet auf eine schwache nukleolytische Aktivität an Strang 2 hin, welche in den denaturierenden Gelen nicht detektiert wurde (vgl. Abbildung 3.16). Durch diese Aktivität würde Arm 3 von der nHJ abgespalten werden und es bliebe ein RF-Intermediat zurück. Dieses wiederum könnte, analog zu den getesteten X26-RFs durch nukleolytische Spaltung in der Folgestrangmatrize (Strang 4) zur Entstehung des 4*-markierten kD-Produkts beitragen. Gleichzeitig könnte darüber die breitere Verteilung der Schnittpositionen von AtGEN1 in Strang 4 erklärt werden.

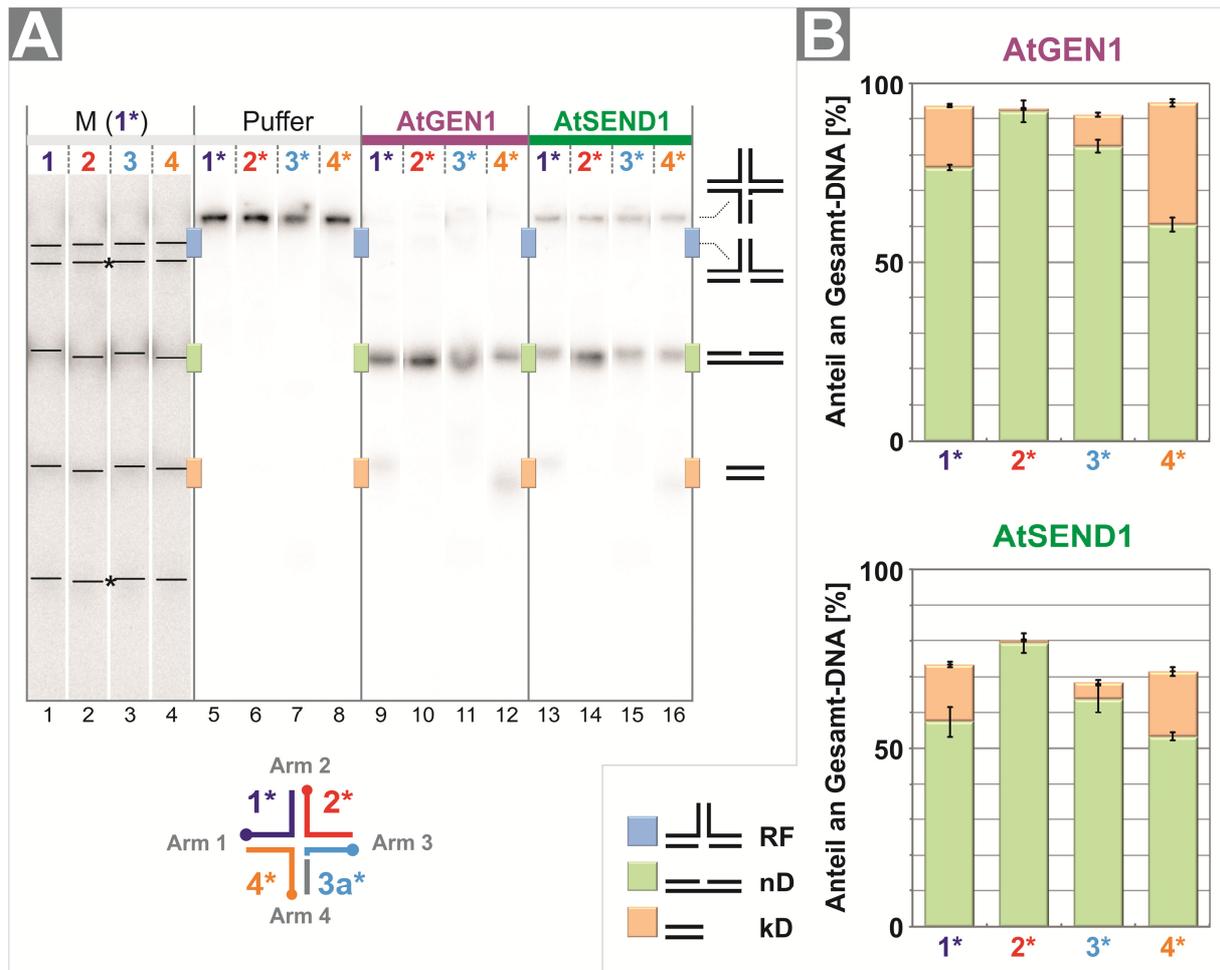


Abbildung 3.18: AtGEN1 und AtSEND1 an nX-32 – native Produktstrukturen

A: Gezeigt sind exemplarische Spuren von Reaktionsprodukten von AtGEN1 und AtSEND1 an der nX-32, jeweils an einem der vier Stränge markiert (symbolisiert durch die Punkte). Native 12 % TBE-PAGE, M = native Markerstrukturen. Horizontale Linien zeigen die Laufhöhe der rechts dargestellten Strukturen an (von oben nach unten: RF, nD, kD). Mit * markierte horizontale Linien zeigen die Laufhöhe von 5'-Flap und 30 nt-ssDNA-Oligonukleotid an. Die Markerspuren sind gammaverstärkt dargestellt (Faktor 2,3 in AIDA), da die sehr schwachen Signale anders nicht sichtbar sind. Alle anderen Spuren sind linear dargestellt. **B:** Quantifizierung der nativen Produktstrukturen nach Umsatz der vier verschiedenen markierten nX-32-HJs durch AtGEN1 (oben) bzw. AtSEND1 (unten). Die Gesamthöhe der Säulen entspricht dem Anteil der Summe aller Produkte an der Gesamt-DNA je Ansatz [%].

3.6.3 Auflösung genickter HJs über ein RF-Intermediat

Die Daten zum Schnittmuster und den nativen Produktstrukturen an den nHJs und RF-Substraten liefern deutliche Hinweise darauf, dass sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 nHJs nicht ausschließlich über Resolvaseaktivität auflösen, sondern zusätzlich einen alternativen Mechanismus anwenden können. Dieser wird im Folgenden mit ReF-I für *replication fork intermediate* bezeichnet werden. Erfolgt ein Schnitt durch AtGEN1 oder AtSEND1 in Strang 1 oder allgemein im antiparallelen, dem Nick gegenüberliegenden Strang einer nHJ, werden je nach Position des Schnittes zum Nick entweder zwei genickte Duplices (= Resolvaseprodukte) oder ein *gapped* und ein *flapped*-Duplex erzeugt, wobei sich diese drei Strukturen mit den hier verwendeten Gelsystemen nicht unterscheiden lassen. Spalten AtGEN1 oder AtSEND1 dagegen das Zucker-Phosphat-Rückgrat eines Nachbarstrangs des genickten Strangs nahe dem JP, wird dieser Arm durch den bereits vorhandenen Nick und den

nukleolytischen Bruch vom Rest der nHJ getrennt. Ein kurzer Duplex entsteht, welcher nur eine radioaktive Markierung an einem Oligonukleotid tragen kann. Die übrigbleibende, restliche nHJ besteht aus zwei vollständigen, teilweise gepaarten Strängen sowie zwei kurzen Oligonukleotiden und entspricht einer Modellreplikationsgabel. Wie in Kapitel 3.5 gezeigt, werden solche Replikationsgabeln von AtGEN1 und AtSEND1 durch Schnitte in der Folgestrangmatrixe zu einem kurzen und einem langen Duplex umgesetzt.

3.7 Die statische X0-HJ: Bestimmung der Schnittposition

Die statische X0-HJ, also eine Modell-HJ mit fixiertem JP, kann benutzt werden, um durch die Struktur bedingte Präferenzen für eine oder mehrere Schnittpositionen in Relation zum Junction-Mittelpunkt zu bestimmen. Sie ist aus anderen Oligonukleotiden aufgebaut als die X26-basierenden Substrate und bietet somit einen unterschiedlichen Sequenzkontext.

Die Aktivität von AtGEN1 entspricht größtenteils dem ReF-I-Weg

Um einen ersten Eindruck von der Aktivität von AtGEN1 und AtSEND1 an diesem Substrat zu erhalten, wurden die Nukleaseprodukte der X0 zunächst auf nativen Gelen untersucht. Wie bereits bei der Bestimmung der Substratspezifität gezeigt (Kapitel 3.3), löst AtGEN1 innerhalb von 30 min 80 % des Substrats auf, während AtSEND1 auf einen Gesamtumsatz von ca. 50 % kommt (Abbildung 3.19B). Der Vergleich der verschiedenen markierten X0-HJs im nativen Gel offenbart für AtGEN1 ein klar definiertes Verteilungsmuster von nD, kD und RF-ähnlichem Produkt (Abbildung 3.19A, Spuren 9–12), welches sich wie für die nHJs zuvor beschrieben, über eine ungleiche Verteilung der Schnitteffizienzen auf die vier Stränge der HJ erklären ließe. Die Markierungen der Stränge 1 und 4 zeigen hauptsächlich nD-Produkt an, was einen weitestgehend unberührten Strang 4 nahelegt. Gleichzeitig zeigen die Markierungen 2* und 3* durch die überwiegende Entstehung von kD-Produkt eine häufige Abspaltung der HJ-Arme 2 und 3 an. Dazu sind Schnitte in Strang 1 und 2 bzw. 2 und 3 nötig. Das Vorhandensein von RF-Strukturen mit den Markierungen 1*, 3* und 4* (Abbildung 3.19A, Spuren 9, 11, 12), sowie deren Abwesenheit mit der 2*-Markierung lässt nur eine mögliche Kombination von Oligonukleotiden in der RF-Struktur zu. Diese würde dann erreicht, wenn die Hauptschnitte von AtGEN1 in den Strängen 1 und 2 liegen würden und somit vornehmlich der Arm 2 als kD-Produkt abgespalten würde. Ein nachfolgender Schnitt in Strang 3 des resultierenden RF-Intermediats würde dann zur Entstehung der beobachteten Verteilung auf zwei kurze Duplices und einen genickten Duplex führen.

Die Schnittmusterbestimmung, schematisch in Abbildung 3.20 zusammengefasst, zeichnet ein zu diesen Beobachtungen passendes Bild. Tatsächlich schneidet AtGEN1 die Stränge 1 bis 3, während Strang 4 der X0 nur zu ca. 15 % umgesetzt wird. Die Stränge 1 und 2 verzeichnen mit 89,6 % und 79,2 % die meisten Schnitte durch AtGEN1, Strang 3 wird dagegen mit 63,3 % weniger häufig geschnitten. Somit erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das oben beschriebene Modell für die Abfolge der Schnitte korrekt ist und AtGEN1 die X0-HJ demnach entsprechend dem ReF-I-Modell prozessiert.

AtSEND1 liefert ein weniger klar zu deutendes Bild. Wie AtGEN1 schneidet AtSEND1 bevorzugt die Stränge 1 bis 3 der X0-HJ (zwischen 39,8 % und 46,1 %), jedoch ist deren Bevorzugung gegenüber Strang 4, welcher zu 25,2 % umgesetzt wird, im Vergleich zu AtGEN1, relativ gering. Der Anteil von Nicht-Resolvaseprodukten am Gesamtumsatz ist bei drei von vier Markierungen mit maximal 20 %

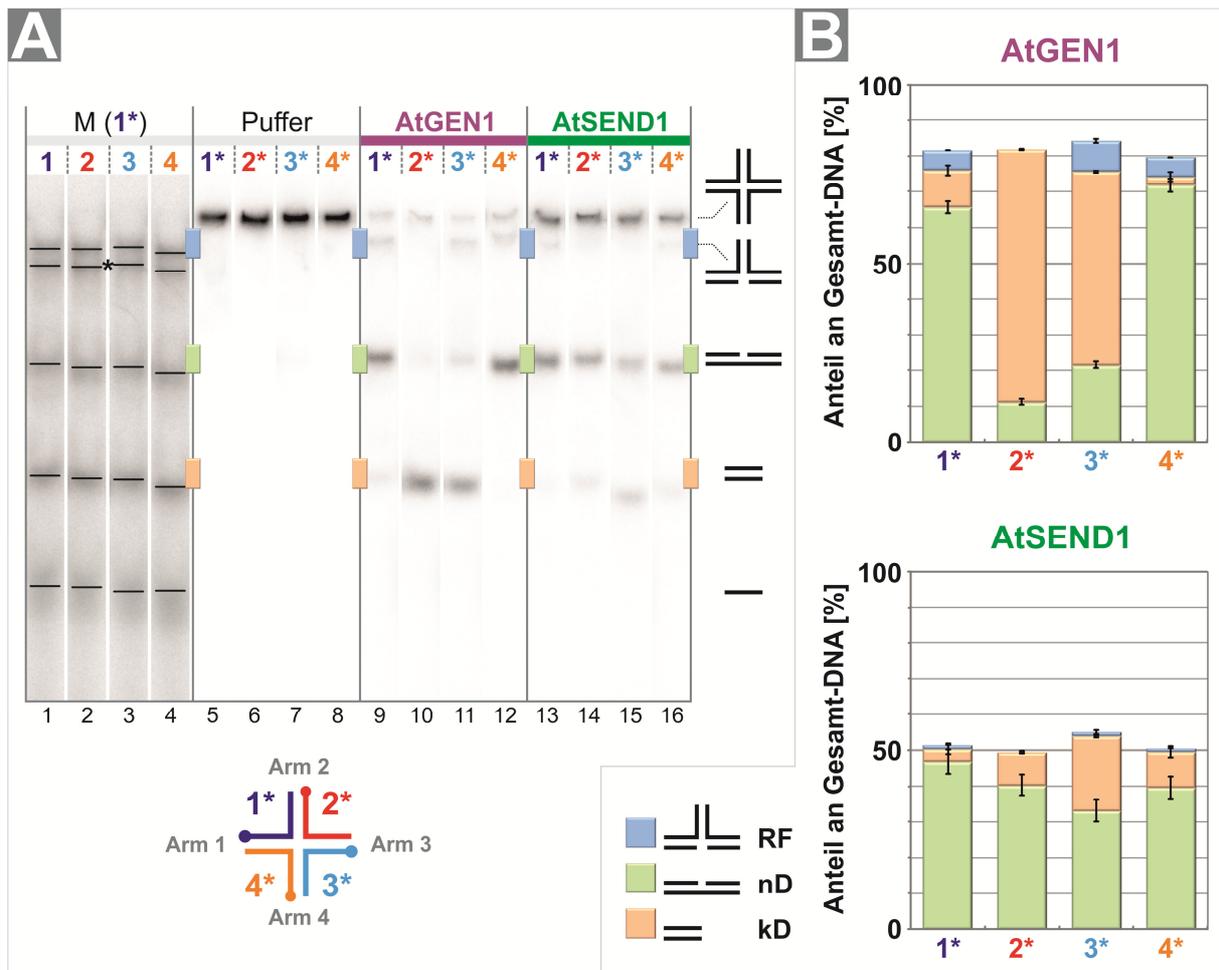


Abbildung 3.19: AtGEN1 und AtSEND1 an der statischen X0-HJ – native Produktstrukturen

A: Gezeigt sind exemplarische Spuren von Reaktionsprodukten von AtGEN1 und AtSEND1 an der statischen X0-HJ, jeweils an einem der vier Stränge markiert (symbolisiert durch die Punkte). Native 12 % TBE-PAGE, M = native Markerstrukturen. Horizontale Linien zeigen die Laufhöhe der rechts dargestellten Strukturen an (von oben nach unten: RF, nD, kD, 30 nt ssDNA). Die mit * markierten horizontalen Linien zeigen die Laufhöhe von 5'-Flap-Strukturen an. Die Markerspuren sind gammaverstärkt dargestellt (Faktor 2,3 in AIDA), da die sehr schwachen Signale anders nicht sichtbar sind. Alle anderen Spuren sind linear dargestellt. **B:** Quantifizierung der nativen Produktstrukturen nach Umsatz der vier verschiedenen markierten X0-HJs durch AtGEN1 (oben) bzw. AtSEND1 (unten). Die Gesamthöhe der Säulen entspricht dem Anteil der Summe aller Produkte an der Gesamt-DNA je Ansatz [%].

relativ niedrig. Nur die 3*-markierte X0 zeigt eine Verteilung von ca. 1/3 kD zu 2/3 nD. Das niedrige Level an RF-Intermediaten mit allen Markierungen korreliert dabei mit der bestimmten Substratspezifität.

AtSEND1 scheint anhand dieser Daten an der X0 weniger nach dem ReF-I-Modell zu agieren als AtGEN1, sondern zu einem größeren Anteil als Resolvase.

Die Schnittposition entspricht RuvC

Neben weiteren Daten zur Unterstützung des ReF-I-Mechanismus an HJs zeigen die Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 an der X0 eindeutig, dass beide potentiellen HJ-Resolvasen das Zucker-Phosphat-Rückgrat bevorzugt ein Nukleotid in 3'-Richtung des JP spalten. Diese Schnittposition ist die einzige, die in allen vier Strängen, also auch dem schlecht umgesetzten Strang 4, vorhanden ist und in den Strängen 1 bis 3 deutlich überwiegt. Nebenschnitte geringerer Effizienz beschränken sich fast

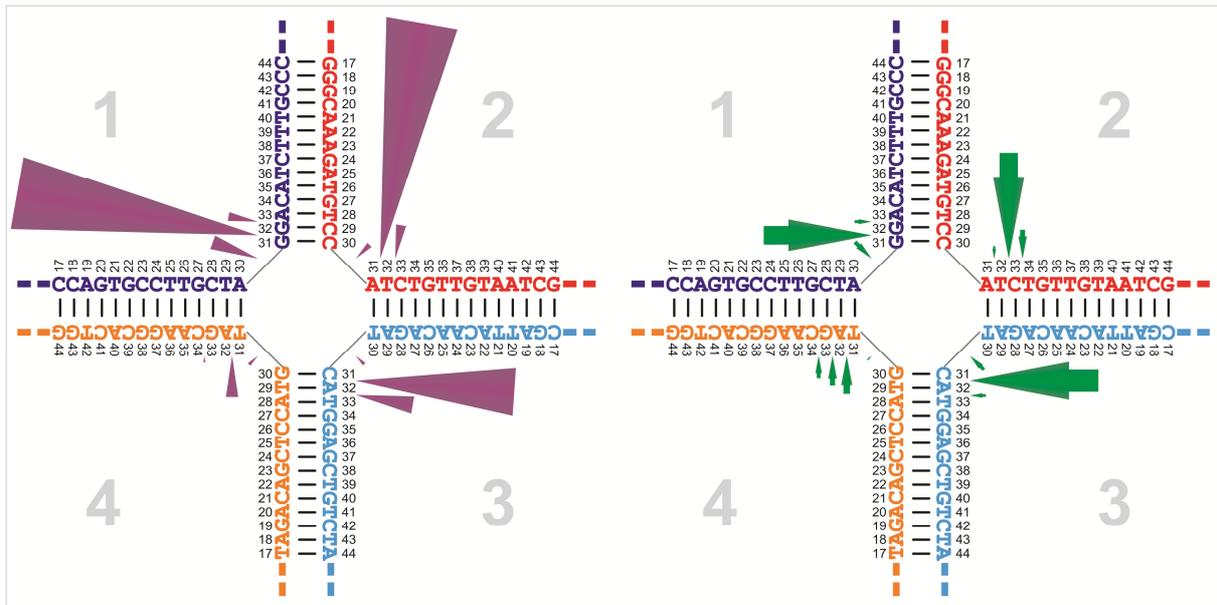


Abbildung 3.20: Schnittmuster der statischen X0-HJ

Gezeigt sind die 28 zentralen Basenpaare der statischen X0-HJ. Lila Pfeile symbolisieren die Schnittpositionen von AtGEN1, grüne Pfeile die von AtSEND1. Die Größe der Pfeile entspricht dem Anteil des Produkts am Gesamtsignal, also der Gesamtmenge an DNA (Substrat und Produkte). Es werden nur Schnittpositionen gezeigt, die mehr als 5 % am Gesamtprodukt des jeweiligen Stranges ausmachen. Das zugrundeliegende Sequenziergel und die Diagramme der Quantifizierung befinden sich im Anhang (Abbildung 9.9 und Abbildung 9.10)

ausschließlich auf den JP selbst und bis zu 3 nt 3' des JP. Somit platzieren beide Proteine ihre Schnitte am oder nahe um den JP, was eine strukturspezifische Aktivität weiter untermauert. Zudem entspricht diese Präferenz nicht nur dem EcRuvC-Paradigma, sondern auch den Schnittstellen der bisher charakterisierten eukaryotischen Resolvasen (Ip *et al.*, 2008; Bailly *et al.*, 2010).

3.8 AtGEN1 und AtSEND1 sind HJ-Resolvasen

Die X26-HJ ist wie die X0 eine intakte HJ bestehend aus vier ununterbrochenen Strängen. Im Gegensatz zur X0 ist die X26 so designt, dass sie zur *branch migration* über einen 26 bp homologen Kernbereich befähigt ist. In Bezug auf den Sequenzkontext um den JP ist sie dadurch punktsymmetrisch zum Mittelpunkt.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, stellt die X26 ein besseres Substrat als die X0 für AtGEN1 und AtSEND1 dar, die nHJs, 5'-Flaps und RFs werden jedoch deutlich besser umgesetzt. Dies spiegelt sich in den vergleichsweise niedrigen Umsätzen von AtSEND1 an der X26 wider (Abbildung 3.21). Im Gegensatz zu den bisher getesteten HJ-Substraten sind die auflösenden Aktivitäten von AtGEN1 und AtSEND1 an der X26 spezifisch für Resolvaseprodukte, wie die deutlichste Produktbande auf Höhe des genickten Duplex im nativen Gel zeigt (Abbildung 3.21A). Das ebenfalls gebildete kD-Produkt macht bei AtSEND1 nur ca. 9 % der Gesamtprodukte aus, bei AtGEN1 liegt das Niveau mit 13–18 % etwas unter dem an der nX-32. Im Autoradiogramm ist in den AtGEN1-Spuren (9–12) zusätzlich ein Signal auf Höhe der RF-Intermediate zu sehen, welche in der Quantifizierung (Abbildung 3.21B) im Pufferhintergrund verschwindet. AtSEND1 erzeugt dagegen keinen persistenten Anteil an RF-Produkt.

Die Entstehung der kD- und RF-Nebenprodukte mit allen vier Markierungen spricht für eine

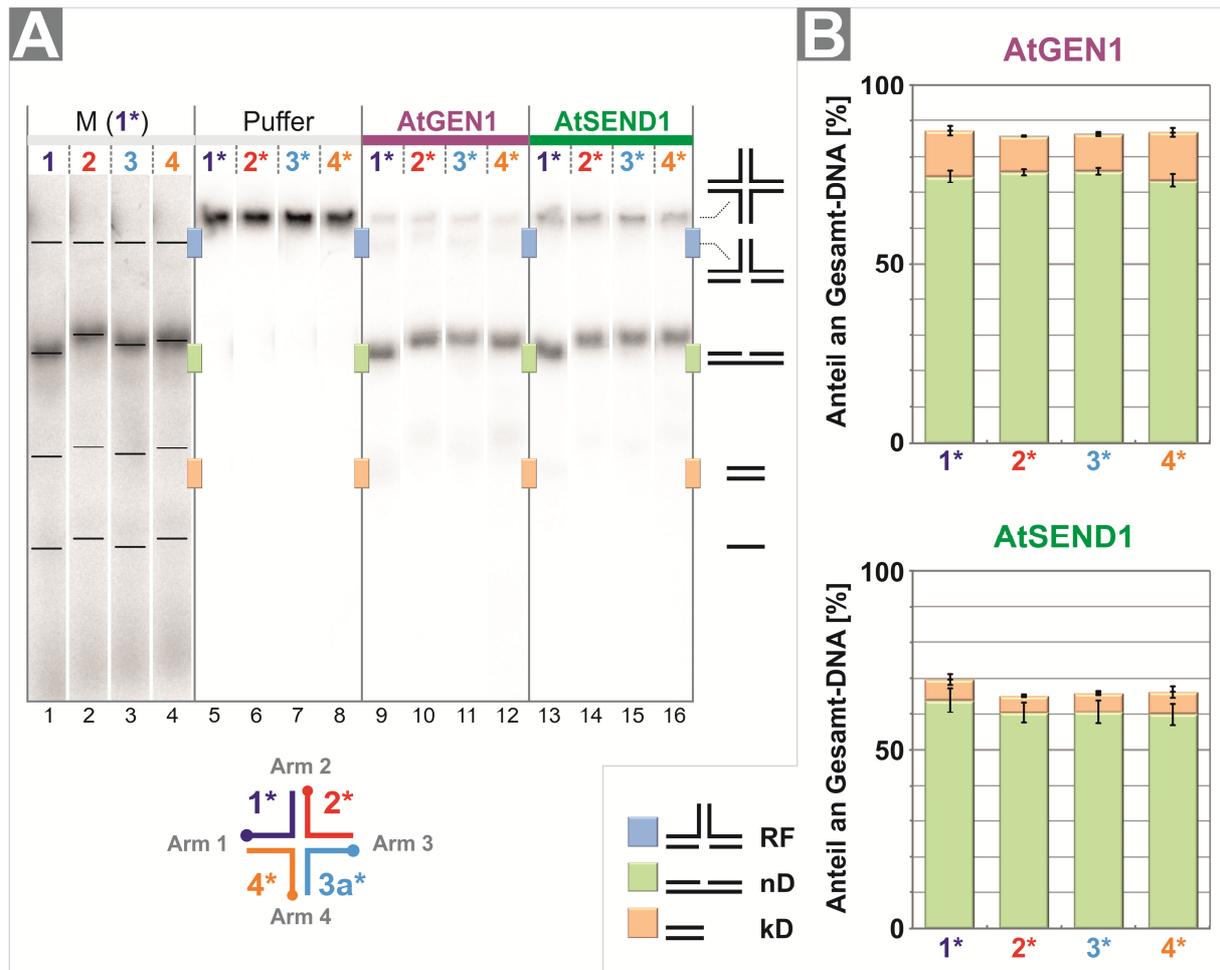


Abbildung 3.21: AtGEN1 und AtSEND1 an der migrierbaren X26-HJ – native Produktstrukturen

A: Gezeigt sind exemplarische Spuren von Reaktionsprodukten von AtGEN1 und AtSEND1 an der migrierbaren X26-HJ, jeweils an einem der vier Stränge markiert (symbolisiert durch die Punkte). Native 12 % TBE-PAGE, M = native Markerstrukturen. Horizontale Linien zeigen die Laufhöhe der rechts dargestellten Strukturen an (von oben nach unten: RF, nD, kD, 30 nt ssDNA). Die Markerspuren sind gammaverstärkt dargestellt (Faktor 2,3 in AIDA), da die sehr schwachen Signale anders nicht sichtbar sind. Alle anderen Spuren sind linear dargestellt. **B:** Quantifizierung der nativen Produktstrukturen nach Umsatz der vier verschiedenen markierten X26-HJs durch AtGEN1 (oben) bzw. AtSEND1 (unten). Die Gesamthöhe der Säulen entspricht dem Anteil der Summe aller Produkte an der Gesamt-DNA je Ansatz [%].

Nebenaktivität von AtGEN1 und AtSEND1 an der X26 entsprechend dem ReF-I-Mechanismus. Diese ist allerdings quantitativ von deutlich geringerer Bedeutung als die Auflösung zu Duplex-Strukturen. Die Frage, ob es sich bei diesen Duplices tatsächlich um Resolvaseprodukte in Form genickter Duplices handelt, kann anhand des Schnittmusters und einem Religationsexperiment beantwortet werden.

3.8.1 Schnittmuster mit nahezu perfekter Symmetrie

Analog zu den bisher präsentierten Schnittmustern erfolgte dessen Bestimmung über Sequenziergele. Dieses ist für die X26 in Abbildung 3.22 gezeigt. AtGEN1 erzeugt an Strang 1 der X26 ein breites Muster an Produkten von 34 nt bis 22 nt, wobei die drei Produktbanden bei 32, 31 und

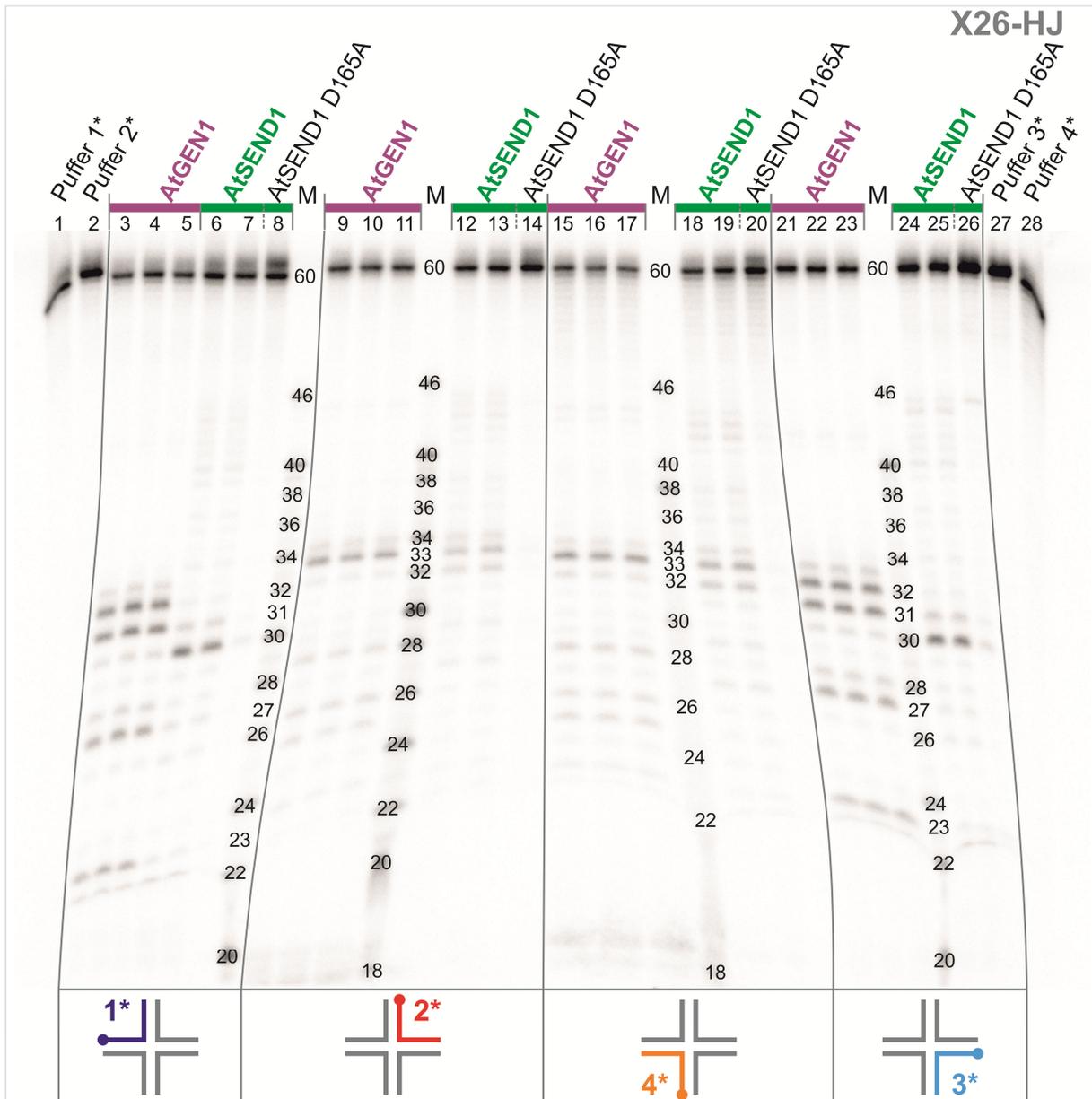


Abbildung 3.22: Schnittstellenbestimmung an X26-HJ

Gezeigt ist das Autoradiogramm des Sequenziergels zur Schnittmusterbestimmung von AtGEN1 und AtSEND1 an der migrierbaren X26-HJ. Es wurde immer jeweils ein Strang pro HJ am 5'-Ende radioaktiv markiert (symbolisiert durch die Punkte). M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge. Die Markerbanden selbst sind in der hier gezeigten linearen Darstellung auf Grund ihrer schwachen Markierung nicht sichtbar.

27 nt als Hauptschnittprodukte besonders hervorstechen (Spuren 3 – 5). Weiter hebt sich das 23 nt-Produkt noch etwas von den übrigen Nebenschnitten ab, weshalb es ebenfalls zu den Hauptschnittprodukten gezählt wird. Die Produkte des 4er-Strangs (Spuren 21 – 23) zeigen eine identische Verteilung: auch hier sind die Hauptschnittprodukte 32, 31, 27 und 23 nt lang und die Nebenschnitte verteilen sich auf den gleichen Längenbereich wie in Strang 1 (siehe auch Abbildung 9.11). An Strang 2 und 4 beschränkt sich die nukleolytische Aktivität von AtGEN1 größtenteils ebenfalls auf den Bereich von Positionen 34 bis 22 (vgl. 9 – 11 mit 15 – 17). Allerdings zeigt sich hier nur ein bevorzugter Hauptschnitt mit einem Produkt von 33 nt, während die Positionen 28, 26 und 25 als stärkste Nebenschnitte noch gut erkennbare Signale liefern. Das Schnittmuster beider Arme ist

nahezu identisch. Die kürzesten Schnittprodukte von 18 und 19 nt zeigen die einzige prägnante Abweichung von dieser Symmetrie: Während in Strang 2 das 18 nt-Signal das stärkere der beiden ist, überwiegt in Strang 4 das 19 nt-Produkt.

Bezogen auf die Summe aller Schnitte in einem Arm zeigt die Quantifizierung der Signale (siehe Abbildung 9.11) für AtGEN1 eine leichte Bevorzugung der Schnittrichtung 1/3 mit ca. 52 % gegenüber ca. 43 % in der Schnittrichtung 2/4. In der Summe entspricht dies dem im nativen Gel beobachteten Gesamtumsatz. AtSEND1, welches auf dem Sequenziergel im Gegensatz zu AtGEN1 nur in Duplikaten gezeigt wird, unterscheidet nicht zwischen den beiden Schnittrichtungen, die Häufigkeit der Schnitte liegt in allen vier Strängen dicht beisammen (um ca. 38 %).

Im Vergleich zu AtGEN1 fällt auf, dass AtSEND1 Schnitte an fast jeder Position innerhalb des homologen Kernbereichs der X26 setzt: von 22 nt bis 44 nt sind schwache, symmetrisch auftauchende Produkte in allen vier Strängen zu detektieren. Die einzigen Schnitte in Strang 1 und 3, die über diesem Grundniveau liegen, erzeugen ein schwaches 31 nt-Neben- und ein einziges Hauptschnittprodukt von 30 nt (Abbildung 3.22, Spuren 6, 7, 24 und 25). In Strang 2 und 4 verteilt sich die Hauptaktivität von AtSEND1 auf zwei Schnitte bei Position 33 und 32 (Spuren 12, 13, 18 und 19).

Die Position und Quantität der Schnitte sind für beide Enzyme in Abbildung 3.23 an der schematischen Darstellung des X26-Kernbereichs zusammengefasst. Die Punktsymmetrie zum Junction-Mittelpunkt ist in dieser Darstellung noch offensichtlicher als im Autoradiogramm. Somit ist die Voraussetzung für eine klassische HJ-Resolvaseaktivität an der X26 sowohl für AtGEN1 als auch AtSEND1 gegeben, da die Produkte mit hoher Wahrscheinlichkeit genickte, direkt ligierbare Duplices darstellen.

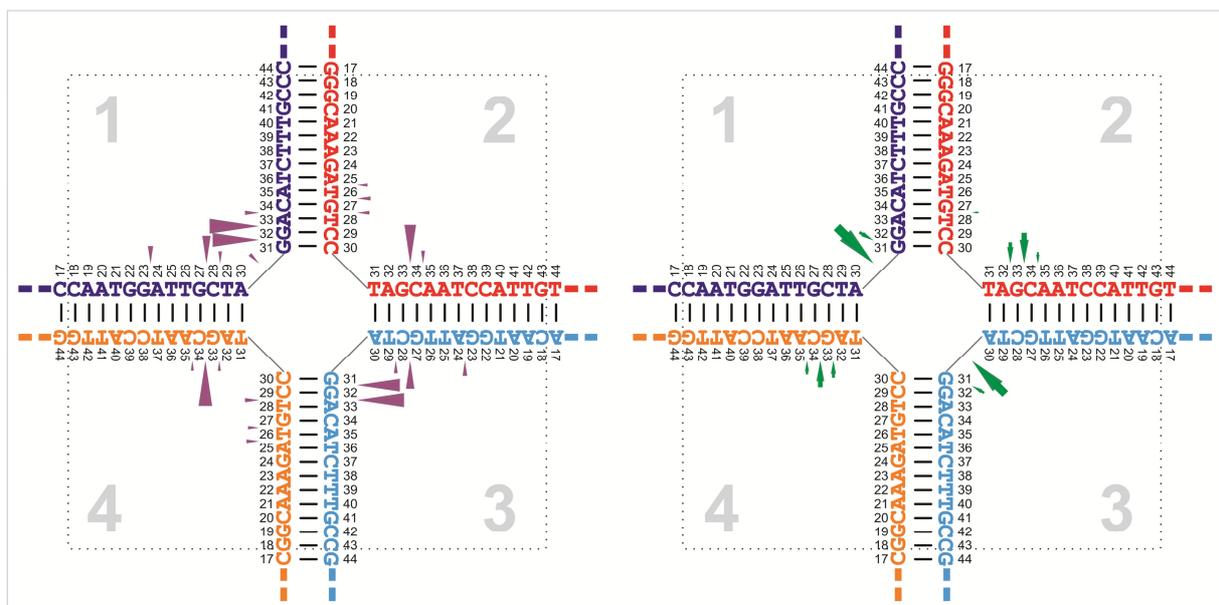


Abbildung 3.23: Schnittmuster der migrierbaren X26-HJ

Gezeigt ist der migrierbare Kernbereich der X26 plus ein Nucleotid des heterologen Bereichs. Lila Pfeile symbolisieren die Schnittpositionen von AtGEN1, grüne Pfeile die von AtSEND1. Die Größe der Pfeile entspricht dem Anteil des Produkts am Gesamtsignal, also der Gesamtmenge an DNA (Substrat und Produkte, Werte in den Diagrammen in Abbildung 9.11). Es werden nur Schnittpositionen gezeigt, die mehr als 5 % am Gesamtprodukt des jeweiligen Stranges ausmachen.

3.8.2 Religierbare Produkte

Da die Symmetrie der Schnitte allein noch nicht ausreicht, um eine Resolvaseaktivität zu zeigen, wurden AtGEN1 und AtSEND1 auf die Religierbarkeit ihrer Produkte getestet. Dazu wurde ein Derivat der X26-HJ verwendet, die asymmetrische X26-S. Bei dieser ist der dritte helikale Arm um sieben Nukleotide kürzer als die restlichen Arme. Dies wird durch eine Verkürzung am 3'- bzw. 5'-Ende der

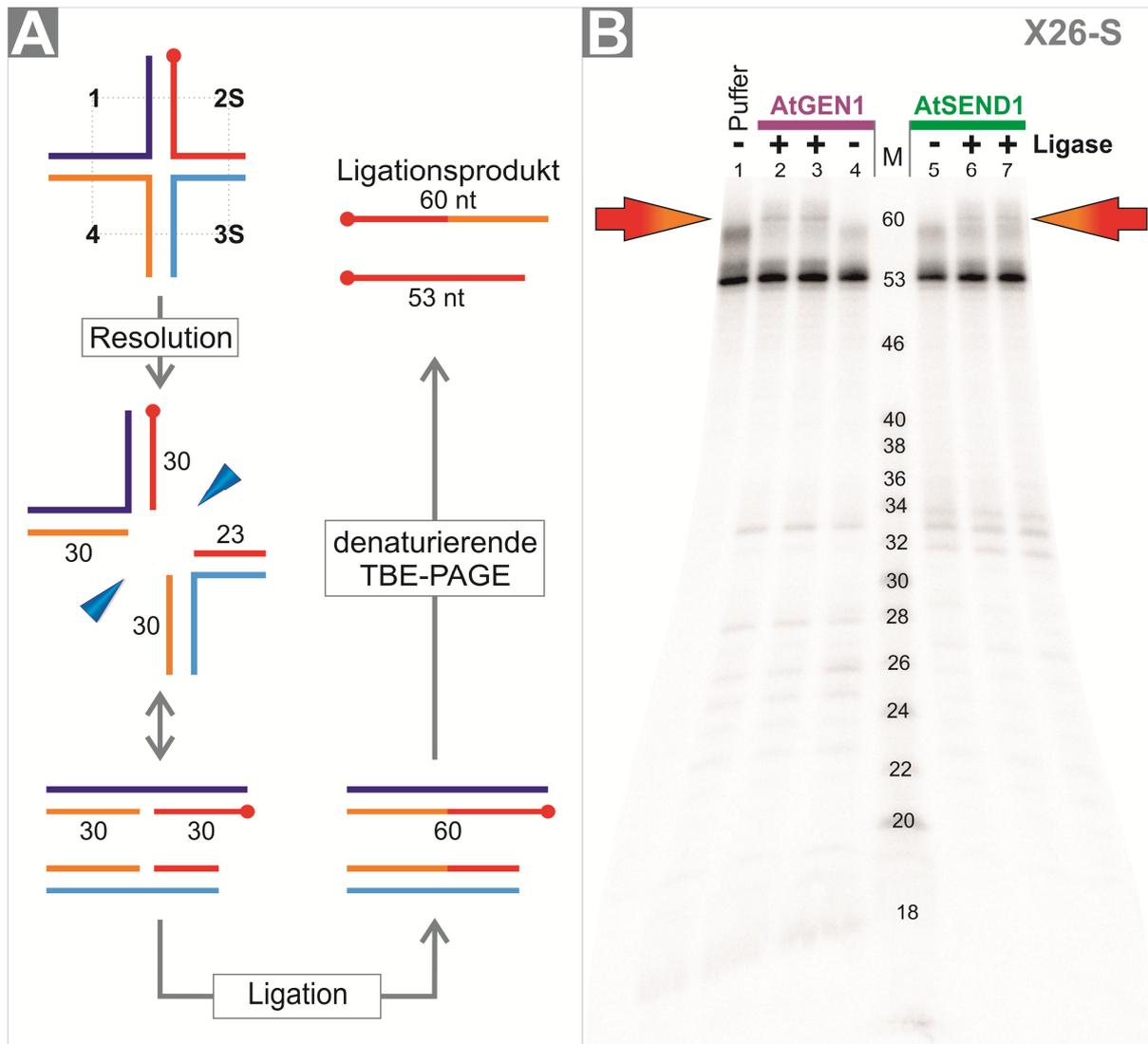


Abbildung 3.24: Religierbare Resolvaseprodukte

A: Schematische Darstellung des Prinzips hinter dem Religationsexperiment. Die asymmetrische HJ X26-S besteht in der gezeigten, zentrierten Darstellung aus drei helikalen Armen von je 30 bp und einem Arm von 23 bp. Der im Gegensatz zur X26 auf 53 nt verkürzte Strang 2S trägt das 5'-³²P. Somit lassen sich nur Schnitte in 2 / 4-Richtung detektieren. Exemplarisch wird eine Resolution über symmetrische Schnitte im Junction-Mittelpunkt gezeigt (blaue Pfeile). Es entstehen zwei genickte Duplices, ein kürzerer mit 53 nt und ein längerer von 60 nt mit zentralem Nick. Durch Zugabe von T4 DNA Ligase werden die Zucker-Phosphat-Rückgrate verknüpft und die Nicks geschlossen. Dabei wird die markierte 5'-Hälfte von 2S (rot mit Punkt) mit der 3'-Hälfte von Strang 4 zu einem 60 nt Oligonukleotid verknüpft. Dieses lässt sich über denaturierende Gelelektrophorese im Sequenziergel vom ursprünglichen, 53 nt langen 2S unterscheiden. Diese Reaktion ist spezifisch für symmetrische Schnitte nach Art einer Resolvase und kann nicht zur Bildung des Ligationsprodukts führen, wenn die Schnitte zuvor nicht perfekt symmetrisch ausgerichtet waren, sondern zu Duplices mit Flaps und Gaps führten. **B:** Sequenziergel des in A beschriebenen Experiments. Rotorange Pfeile zeigen das neu entstandene Ligationsprodukten in den Spuren mit Ligase an. Kontrollen ohne Ligase oder ohne Enzym und Ligase zeigen nur das Verdauemuster der X26-S, jedoch kein Ligationsprodukt.

Stränge 2 und 3 erreicht (Oligonukleotide X26-2S und X26-3S, Tabelle 2.4). Das Prinzip hinter dem Religationsexperiment ist in Abbildung 3.24A exemplarisch für die Resolution exakt im Mittelpunkt der Junction dargestellt. Die X26-S wird dazu am 5'-Ende des verkürzten Strang 2 markiert. Über symmetrische Schnitte in Richtung 2 / 4 (blaue Pfeile) entstehen zwei genickte Duplices, einer mit 53 nt Gesamtlänge und einer mit 60 nt Gesamtlänge und zentralem Nick. Letzterer trägt die radioaktive Markierung über die 5'-Hälfte des 2S-Oligonukleotids. Durch Zugabe einer Ligaseaktivität können die Nicks der Duplices wieder verschlossen werden, sofern keine Gaps oder Flaps vorliegen und die Enden beiderseits des Nicks ein 3'-OH bzw. 5'-Phosphat tragen. Dies führt zur Verknüpfung der 30 nt langen, markierten 5'-Hälfte von 2S mit der ebenfalls 30 nt langen 3'-Hälfte von 4 zu einem 60 nt Ligationsprodukt. Über denaturierende Längenbestimmung im Sequenziergel kann das Erscheinen dieses Ligationsprodukts oberhalb der 53 nt Substratbande detektiert werden.

Wie Abbildung 3.24B zeigt, taucht sowohl in Ansätzen mit AtGEN1 + Ligase (Spuren 2 und 3) als auch AtSEND1 + Ligase (Spuren 6 und 7) das resolvaspezifische 60 nt Ligationsprodukt auf. Kontrollansätze ohne Ligase zeigen kein Signal bei 60 nt. Somit erzeugen beide pflanzlichen Rad2/XPG-Homologe, AtGEN1 und AtSEND1, an der X26 religierbare Resolvaseprodukte über in Position und Quantität symmetrische Schnitte in zwei gegenüberliegenden Strängen der HJ.

4. Diskussion

4.1 Bioinformatische Analysen der pflanzlichen HJ-Resolvasen

4.1.1 Zwei Homologe potentieller HJ-Resolvasen in Pflanzen

Die Rad2/XPG-Nukleasefamilie oder auch FEN1-Superfamilie ist in allen Eukaryoten konserviert und unterteilt sich in vier Unterklassen: die XPG-orthologen Endonukleasen der NER (Klasse 1), die Flap-Endonukleasen der Replikation (FEN1, Klasse 2), die EXO1-Exonukleasen der MMR und HR (Klasse 3) und schließlich die Klasse 4, welche unter anderem die HJ-Resolvasen der Eukaryoten umfasst. Homologe aller Unterklassen sind in vielen Modellorganismen beschrieben. Auch in *A. thaliana* wurden neben AtUVH3, AtFEN1 und AtEXO1, den Vertretern der Klassen 1-3, bereits früh bioinformatisch putative Homologe der Klasse 4 identifiziert. Dabei handelt es sich zum einen um AtSEND1, welches als eine aus den N-terminalen 337 AS bestehende Teilsequenz als Homolog zu OsSEND-1 postuliert wurde (CAB87918, Furukawa *et al.*, 2003). Das vollständige Genmodell von AtSEND1 ist inzwischen unter At3g48900 in der TAIR-Datenbank hinterlegt. Zum anderen ist AtGEN1, auf dem Genlokus At1g01880, bereits 2005 anhand von Sequenzhomologie in die Gruppe um OsSEND-1 und OsGEN-L eingeordnet worden (Moritoh *et al.*, 2005). Moritoh *et al.*, 2005 identifizierten darüber hinaus auch Homologe zu OsGEN-L und AtGEN1 in weiteren Pflanzen und zeigten so, dass die GEN1-Homologe in den höheren Pflanzen (und Säugern) konserviert scheinen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit noch um weitere, inzwischen sequenzierte, Pflanzen erweitert. Für die Homologe zu OsSEND-1 und AtSEND1 wurde die Konservierung innerhalb der Pflanzen noch nicht weiter untersucht, es wurde jedoch bereits postuliert, dass es sich bei AtGEN1 und AtSEND1 um aus einem Duplikationsereignis stammende Paraloge handeln könnte (Hanada *et al.*, 2011). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch die SEND1-Homologe in alle höheren Pflanzen konserviert sind und sich gemeinsam in einer Klade anordnen, welche auf Sequenzebene näher mit den Rad2/XPG-Homologen der Klasse 1 verwandt sind, als mit ihren paralogenen Entsprechungen innerhalb eines Organismus. Die GEN1-Homologe der Pflanzen bilden dagegen eine eigene Klade, welche als nächste Verwandte mit DmGEN1 und HsGEN1 zwei tierische Vertreter aufweist. Dies legt die GEN1-Linie als ursprünglichen Vorfahren nahe, aus welchem SEND1 hervorging. Dieses Duplikationsereignis lässt sich anhand des Stammbaums auf einen Zeitraum nach der Abspaltung der Moose und Moosfarne eingrenzen, da sowohl *P. patens* als auch *S. moellendorffii* nur ein Klasse 4-Homolog besitzen, welches

eindeutig der GEN1-Klade zuzuordnen ist. Die später entstandenen Arten der Tracheophytae besitzen dagegen (fast) alle sowohl GEN1 als auch SEND1.

Die Ausnahmen von dieser Regel sind drei Vertreter der *Rosaceae* (Rosengewächse), in deren hinterlegten Genomen lediglich ein GEN1-Homolog gefunden wurde: *Prunus persica* (Pflirsich), *Malus domestica* (Apfel) und *Fragaria vesca* (Erdbeere). Die am nächsten verwandte Art, *Cucumis sativus* (Gurke) der Familie der *Cucurbitaceae* (Kürbisgewächse) besitzt dagegen Gene für sowohl GEN1 als auch SEND1. Eine mögliche Erklärung wäre eine Eliminierung des SEND1-Gens nach der Abspaltung der *Rosaceae*. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass der Grund für das Fehlen der SEND1-Homologe in der erst kürzlich erfolgten Veröffentlichung der Genome begründet ist und somit noch nicht alle Gene erfasst wurden. Eine ähnliche Situation ist in *Carica papaya*, dem nächsten sequenzierten Verwandten zu *A. thaliana* außerhalb der *Brassicaceae*, der Fall: Die Recherche in der Proteinfamilien der Phytozome-Datenbank ergab für *C. papaya* lediglich ein SEND1-Homolog, aber keinen Treffer entsprechend GEN1. BLAST-Analysen zeigten, dass im hinterlegten *Carica*-Genom der C-Terminus von CpGEN1 vorhanden ist, jedoch für den N-terminalen Bereich keine Sequenzen existieren.

Es ist also davon auszugehen, dass es nach der Abspaltung der Moosfarne zu einem Duplikationsereignis von GEN1 zu GEN1 und SEND1 kam und dass somit die höheren Pflanzen zwei funktionelle Homologe der HJ-Resolvasen besitzen, was die weiteren Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen. Einige Phagen Gram-positiver Bakterien (Green *et al.*, 2013), das Archaeobakterium *S. solfataricus* und die Hefe *S. cerevisiae* besitzen ebenfalls zwei funktionelle HJ-Resolvase-Gene. Dabei ist jedoch anzumerken, dass im Fall von *S. solfataricus* eine virale Herkunft von SsoHje angenommen wird (Middleton *et al.*, 2004). Auch die zweite Hefe-Resolvase ScCce1 ist auf Grund ihrer mitochondriellen Lokalisation (Kleff *et al.*, 1992) wahrscheinlich nicht aus einer Genduplikation entstanden oder sie hat im späteren Verlauf der Evolution ein mitochondrielles Lokalisationssignal erworben. *A. thaliana* ist damit der erste eukaryotische Organismus, für den eine Genduplikation zu zwei HJ-Resolvasen beschrieben wurde.

4.1.2 chromo-like Domäne

Die Chromo-Domäne (CD) gehört zur Klasse der OB- (*oligonucleotide and oligosaccharide binding*) folds der Einzelstrangbindedomänen. Man findet sie z.B. in sequenzunabhängigen DNA-Bindeproteinen, aber auch häufig in chromatinassoziierten Proteinen wie z.B. DmPc und DmHP1A/B (Eisenberg, 2001). Letzteres begründet ihre Benennung als **chromatin organization modifier** (Paro und Hogness, 1991). Chromobox-Proteine, wie Proteine mit CDs auch genannt werden, sind beteiligt am *gene silencing* aber auch an der Aktivierung von Genen und spielen unter anderem eine Rolle in der Neuorganisation des Chromatins. Dabei wurde sowohl *in vitro* die Fähigkeit zur Bindung nackter DNA und RNA gezeigt, als auch häufig die Interaktion mit Proteinen, z.B. methylierten Seitenketten des Histons H3 (Akhtar *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2008; Mishima *et al.*, 2013). Eine, durch AS-Austausch entstandene, Variante der CDs sind die Chromo shadow-Domänen (CSD), welche häufig in Proteinen vorkommen, die zusätzlich eine N-terminale CD tragen (Aasland und Stewart, 1995; Eisenberg, 2001). Sowohl für die isolierte CSD als auch vollständige Proteine wurde eine Dimerisierung der bzw. über die CSD gezeigt (Smothers und Henikoff, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Dabei kann die Dimerisierung die Voraussetzung für die Interaktion mit anderen Proteinen darstellen (Mendez *et al.*, 2011). Die Sekundärstrukturen von CD und CSD sind sich sehr ähnlich: Während die CD aus drei β -Faltblättern und einer α -Helix besteht, folgen bei der CSD eine kurze und eine länger α -Helix auf die drei β -Faltblätter (Eisenberg, 2001).

Dabei sind die β -Faltblätter an der Bindung von DNA und RNA, die C-terminalen α -Helices der CSD an der Dimerisierung und Proteininteraktion beteiligt (Cowieson *et al.*, 2000; Eissenberg, 2001).

Der Vergleich des als *Chromo domain-like* (InterPro:IPR016197) bzw. *Chromo domain* (InterPro:IPR000953) annotierten Bereichs in AtSEND1 mit seinen Homologen zeigt, dass dieser Bereich sowohl für die SEND1-Homologe in allen Pflanzen gut konserviert ist, als auch für die GEN1-Homologe, jedoch mit deutlich abweichender Sequenz (vgl. Abbildung 3.3). Beide Sequenzabschnitte lassen sich in einem Kernbereich mit dem Chromo-Consensus in Einklang bringen. Dies gilt nicht nur für die pflanzlichen Klasse 4-Homologe mit *O. sativa* und *A. thaliana* als Beispiel, sondern auch für die Klasse 4-Proteine in Mensch und Fliege. Jedoch ist anhand der dreidimensionalen Modellierungen und der Eigenschaften der Primärstruktur unklar, ob dieser *Chromo domain-like*-Variante (CDLV) benannte Sequenzabschnitt näher mit der CD oder der CSD verwandt ist, was die Einschätzung einer möglichen Funktion erschwert. Zudem tragen die CDLVs der GEN1-Homologe alle eine unterschiedlich lange Insertion zwischen den als β -Faltblätter zwei und drei vorhergesagten Bereichen, deren Einfluss nicht abzuschätzen ist. Um die Funktionalität der CDLV und deren eventuellen Rolle in den Funktionen von AtGEN1, AtSEND1 und ihren Homologen zu untersuchen wird es nötig sein, *in vitro*-Experimente durchzuführen, welche die gezielte Deletion und Mutation der CDLV umfassen. Außerdem könnten weiterführend chimäre Proteine oder die Expression und Analyse der CDLV als isoliertes rekombinantes Peptid aufschlussreiche Daten liefern. Die Hypothese, dass die CDLV eine Rolle in der Dimerisierung von AtGEN1 und AtSEND1 spielen könnte, begründet sich in den dreidimensionalen Modellierungen, die näher an der Tertiärstruktur der CSD liegen, und ist besonders reizvoll. Hier bietet die vorliegende Arbeit einen Ansatzpunkt für einen neuen Aspekt in der Erforschung der Aktivität der eukaryotischen HJ-Resolvasen.

4.2 Klonierte Konstrukte, Expression, Aufreinigung

Der Aufbau der rekombinanten Proteine von AtGEN1 und AtSEND1 spiegelt die verwendete Aufreinigungsstrategie über Streptactin-Affinitätschromatographie und Ni-IMAC wieder. Die zusätzliche Erkennungssequenz der PreScission Protease (PCS) sollte einen zusätzlichen Aspekt zur Aufreinigung hinzufügen bzw. die Abspaltung der Tags ermöglichen, sollten sich diese als störend herausstellen (Arnau *et al.*, 2006). Tatsächlich kann von einem störenden Einfluss der Tags auf die Aktivität der ursprünglichen Konstrukte mit N-terminalem His-Tag und PCS sowie C-terminalem StrepII-Tag und der PCS (n-His-PCS-c-PCS-StrepII) ausgegangen werden, da diese unter ähnlichen Reaktionsbedingungen, wie die in dieser Arbeit verwendeten, keine Aktivität an zwei Modell-HJs zeigten (Graf, 2010). Die daraufhin konstruierten und für die Charakterisierung verwendeten rekombinanten Proteine mit natürlich belassenem N-Terminus (Abbildung 2.1) zeigten dagegen bereits in frühen Aufreinigungen eine robuste nukleolytische Aktivität an Modell-HJs. Die Voraussetzung des natürlichen N-Terminus für die Aktivität deutet auf eine gestörte Faltung des Proteins während der Expression hin, da die nachträgliche Abspaltung der Tags über die PreScission Protease keine Aktivierung ermöglichte (Graf, 2010). Analog wird die Aktivität von CeGEN-1 bereits durch wenige saure AS oder Histidine am N-Terminus vollständig gehemmt (A. P. Bailly, persönliche Mitteilung über Frau Dr. Daniela Kobbe). Umgekehrt kann der Verlust N-terminaler AS ebenfalls zum Aktivitätsverlust führen, wie für die ersten 16 AS der T7 Endo I gezeigt (Freeman *et al.*, 2013).

Im Fall der verwendeten c-PCS-His-StrepII-Konstrukte erwies sich die Abspaltung der Tags als unnötig, da auch die rekombinanten Proteine inklusive Tags eine robuste nukleolytische Aktivität

zeigten. Dies kann mit dem ungeordneten Charakter und somit erhöhten Flexibilität der ungeordneten C-terminalen Sequenzen beider Homologe zusammenhängen (Wright und Dyson, 1999). So wurde z.B. auch für HsGEN1 und CeGEN-1 gezeigt, dass bei C-terminalen Trunkierungen die Aktivität erhalten bleibt (Ip *et al.*, 2008; Bailly *et al.*, 2010; Rass *et al.*, 2010), was die Hypothese unterstützt, dass die rekombinanten Proteine unempfindlicher gegenüber C-terminalen Veränderungen sind. Der ungeordnete Charakter des C-Terminus könnte auch ein Grund für die Laufanomalie von AtGEN1 in der SDS-PAGE sein, ähnlich wie für OsGEN-L postuliert, welches ebenfalls eine größere apparente Molekülmasse besitzt, als das theoretisch errechnete (Yang *et al.*, 2012).

4.2.1 Konservierte AS

Um sicherzustellen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften von AtGEN1 und AtSEND1 tatsächlich von den entsprechenden rekombinanten Proteinen herrühren, sollten AS-Austauschvarianten zu jedem Zeitpunkt der Experimente parallel prozessiert werden. So kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Aktivitäten von eventuell mit aufgereinigten *E. coli*-Kontaminationen stammen. Um dies zu gewährleisten, müssen die Negativkontrollen außer der Unfähigkeit zur nukleolytischen Spaltung möglichst identische Eigenschaften zu den unveränderten Proteinen besitzen. In der Rad2/XPG-Nukleasefamilie sind sieben saure AS konserviert, deren Beteiligung an der nukleolytischen Aktivität aus Untersuchungen an HsFEN1 gut charakterisiert ist (Tabelle 4.1). Alle spielen eine Rolle bei der Koordinierung zweier zweiwertiger Metallionen. Dabei koordinieren Asp34, Asp86, Glu158 und Glu160, teilweise indirekt über Wassermoleküle, das eine Metallion und Glu160, Asp179, Asp181 direkt das zweite Metallion (Shen *et al.*, 1997; Tsutakawa *et al.*, 2011). Kompetitionsstudien mit AS-Austauschvarianten von HsFEN1 zeigen weiter, dass die genannten AS unterschiedlich stark zur Substratbindung beitragen. So zeigt z.B. der D181A-Austausch DNA-Bindung auf WT-Niveau bei 800fach verminderter Nukleaseaktivität, während E158A und D179A zum vollständigen Verlust der Substratbindung führen (Shen *et al.*, 1997; Tsutakawa *et al.*, 2011). Analog zum D181A-Austausch ist auch für die Resolvasen der Bakteriophagen T4 und T7 gezeigt worden, dass sich nukleolytische Aktivität und Substratbindung getrennt voneinander inhibieren lassen, was somit ein weiteres gemeinsames Merkmal der Resolvasen und strukturspezifischen Nukleasen darstellen könnte (Duckett *et al.*, 1995; Pöhler *et al.*, 1996).

Im Hinblick auf den hohen Konservierungsgrad innerhalb der Rad2/XPG-Familie erschienen die Entsprechungen zu HsFEN1 D181A in AtGEN1 (D163A) und AtSEND1 (D165A) als ideale Kandidaten zur Verwendung als Negativkontrollen. D75A und D76A, die Entsprechungen zu D86A in HsFEN1 wurden als zweite Kandidaten ausgewählt, von denen nur eine leichte Beeinträchtigung der Substratbindung zu erwarten war (Shen *et al.*, 1997). Darüber hinaus sollte der gleichzeitige Austausch der Entsprechungen zu Glu158 und Glu160 in AtGEN1 (E140A/E142A) und AtSEND1 (E142A/E144A) neben dem Verlust der nukleolytischen Aktivität auch zur Unterdrückung der Substratbindung führen.

In HsGEN1 führt der Austausch der Position E157A wie die weiteren in Tabelle 4.1 gekennzeichneten Austausche dazu, dass im Gegensatz zum WT-Protein kein genicktes Duplex-Resolvaseprodukt nachweisbar ist (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010). Allerdings wurden in diesen Arbeiten ausschließlich native Gele gezeigt. Die HsGEN1 E157A entsprechenden Austausche von Asp163 in AtGEN1 und Asp165 in AtSEND1 zeigen in nativen Gelen ebenfalls keinen Unterschied zu den Pufferkontrollen. Aber mit den in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten denaturierenden Gelen zeigt sich, dass AtGEN1

D163A und AtSEND1 D165A an der pmHJ und einem 5'-Flap eine Restaktivität zurückbehalten. Dies trifft insbesondere für AtSEND1 D165A zu. Während über native Gele die elektrophoretische Trennung intakter HJs von genickten HJs schwierig ist, ermöglichen denaturierende Gele die Detektion von Schnitten in einzelnen Strängen, wie für die Restaktivität beobachtet. Demnach ist unter alleiniger Berücksichtigung der publizierten Daten nicht auszuschließen, dass auch in HsGEN1 und ScYen1 eine ähnlich geartete Restaktivität vorhanden ist.

Der AS-Austausch in *A. thaliana* nimmt auf zwei Arten Einfluss auf die Restaktivität. Zum einen wird an verschiedenen Strängen verschiedener DNA-Substrate die Reaktion unterschiedlich stark gehemmt. Dies reicht von fast keiner Hemmung (AtSEND1 D165A an dem 5'-Flap2) bis zur vollständigen Inhibierung (z.B. AtSEND1 D165A an Strang 3 der X26). Zum anderen erzeugt AtSEND1 D165A an der pmHJ ein konzentrierteres Schnittmuster als unverändertes AtSEND1, was für einen Einfluss des Asp165 auf die Spezifität der Schnitte hindeutet. Anhand dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob dieses Aspartat in *A. thaliana* eine andere Rolle in der Koordinierung zweiwertiger Metallionen spielt als in HsFEN1 und zudem an der Bestimmung der Spezifität auf Struktur- oder Sequenzebene beteiligt ist. Die weiterführende Untersuchung dieser Einflüsse könnte Aufschluss über, möglicherweise pflanzenspezifische, Unterschiede zwischen den Klasse 4-Homologen der Rad2/XPG-Familie geben.

Um sicherzustellen, dass keine *E. coli*-Proteinaktivität beschrieben wird, wurden die AS-Austauschvarianten AtGEN1 D75A bzw. AtSEND1 D76A als Negativkontrollen verwendet, deren Gegenstücke in HsGEN1 ebenfalls keine Aktivität zeigen (Ip *et al.*, 2008). Als Negativkontrolle für die Charakterisierungen der menschlichen und Hefe-Resolvasen wurden E134A/E136A bzw. E193A/E195A verwendet (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010), deren *Arabidopsis*-Pendants ebenfalls nukleolytisch vollständig inaktiv sind.

Tabelle 4.1: Die konservierten Aminosäuren in den Homologen von HsGEN1 und ScYen1

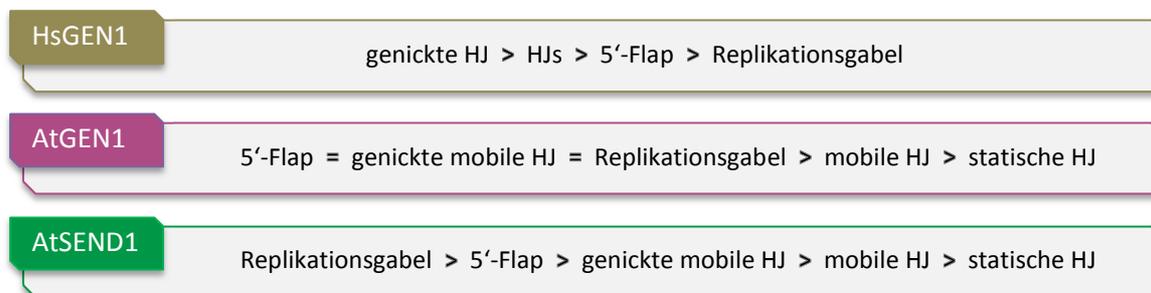
Fett gedruckte AS-Positionen (z.B. D30A) bezeichnen einen in der Literatur oder der vorliegenden Arbeit beschriebenen Austausch der entsprechenden AS zu einem Alanin, was zum Verlust der Aktivität an Modellsubstraten führt. Mit * markierte AS wurden jeweils gemeinsam in einer Proteinvariante untersucht. Normal gedruckte AS wurden nicht getestet, sind aber zur Nachvollziehbarkeit der konservierten Positionen aufgeführt. Im Fall von AtGEN1 und AtSEND1 ist der Aktivitätsverlust für den Austausch D163A bzw. D165A nicht vollständig (fett/kursiv). A = Alanin, D = Aspartat, E = Glutamat; ¹Die letzte Spalte zeigt die für HsFEN1 bestimmte Beteiligung der entsprechenden AS an der nukleolytischen Spaltung (c) bzw. Substratbindung (b). Ein blauer Hintergrund steht für die Koordinierung des ersten Metallions, ein grüner Hintergrund zeigt die Koordinierung des zweiten Metallions an.

HsGEN1	CeGEN-1	ScYen1	AtGEN1	AtSEND1	OsGEN-L	OsSEND-1	HsFEN1	¹
D30A	D30	D41	D31	D30	D31	D30	D34A	c
E75	D76	D118	D75A	D76A	D78	D76	D86A	c
E134A	D133	E193A*	E140A*	E142A*	E148	E144	E158A	b
E136A	E135A	E195A*	E142A*	E144A*	E150	E146	E160A	b
E155	D154	D214	D161	D163	D169	D165	D179A	b
E157A	D156	D216	D163A	D165A	D171	D167	D181A	c
D208	D212	D288	D213	D215	D221	D217	D233A	b

4.3 Substratspezifität

Entsprechend ihrer strukturellen Zugehörigkeit zur Rad2/XPG-Familie besitzen AtGEN1 und AtSEND1 die Signaturaktivität der Familie: sie spalten 5'-Flap-Substrate genau ein Nukleotid im Duplexbereich hinter dem ss/dsDNA-Übergang (Harrington und Lieber, 1994; Lee und Wilson, 1999; Hohl *et al.*, 2003). Der Vergleich mit HsGEN1 zeigt, dass die pflanzlichen Klasse 4-Homologe einen identischen 5'-Flap (5'-Flap4 in Tabelle 2.5) mit höherer Spezifität an der typischen Position schneiden, als HsGEN1, welches unter ähnlichen Reaktionsbedingungen bis zu drei verschiedene Schnitte einfügt (Rass *et al.*, 2010).

Über die familientypische Auflösung von 5'-Flaps hinaus zeigen die bisher charakterisierten Klasse 4-Homologe die Fähigkeit auch Replikationsgabeln in Form geblockter Flaps sowie HJs aufzulösen (Bailly *et al.*, 2010; Rass *et al.*, 2010). Auch in diesen Eigenschaften entsprechen AtGEN1 und AtSEND1 ihren Homologen, sie zeigen jedoch eine abweichende Präferenz für diese Substratstrukturen. Die von der Resolvase aus Mensch bevorzugten HJs (Rass *et al.*, 2010) stehen in *Arabidopsis* hinter den Replikationsgabeln und dem 5'-Flap zurück:



Für OsGEN-L wurde gezeigt, dass für die 5'-Flap-Aktivität niedrige Konzentrationen (25 mM) einwertiger Ionen optimal sind, die HJ-Resolvaseaktivität dagegen 150 mM KCl benötigt (Yang *et al.*, 2012). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit nach den Bedingungen gesucht, unter denen der Umsatz einer HJ für AtGEN1 und AtSEND1 am besten war (Daten nicht gezeigt). Für AtGEN1 stellte sich 50 mM NaCl als optimal heraus, während sich für AtSEND1 100 mM NaCl als am besten erwies. Die übrigen Reaktionsbedingungen konnten für AtGEN1 und AtSEND1 identisch gewählt werden. Alle Substrate wurden unter den jeweiligen an der pmHJ optimierten Bedingungen für das entsprechende Enzym getestet, um auf Grund gleich bleibender Bedingungen eine Basis für Vergleiche zu haben. Es ist allerdings denkbar, dass die hier präsentierte Präferenzreihung der getesteten Substrate unter anderen Reaktionsbedingungen abweichen und die Unterschiede zwischen AtGEN1 und AtSEND1 geringer ausfallen könnten. Die Veränderung der angebotenen zweiwertigen Metallionen könnte z.B. ebenso einen deutlichen Einfluss zeigen, wie für HsGEN1, dessen prägnante Bevorzugung von HJ-Strukturen über 5'-Flaps und RFs mit Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+} abgeschwächt wird (Rass *et al.*, 2010). Unter der Annahme eines einheitlichen Schnittmechanismus aller Rad2/XPG-Nukleasen liefern die feinen Unterschiede in der Primärstruktur der vier Klassen, übertragen auf die Kristallstrukturen von HsFEN1, allein und im Komplex mit seinem bevorzugten Substrat, eine einleuchtende Erklärung für das weiter gefasste Substratspektrum der Klasse 4-Homologe (Orans *et al.*, 2011; Tsutakawa *et al.*, 2011; Tsutakawa und Tainer, 2012). Die Bindung des Substrats erfolgt bei HsFEN1 und übertragbar auf XPG, EXO1 und GEN1 über die helikalen, nicht geschnittenen Arme der DNA, unter anderem über die HhH2-Domäne. Die dafür benötigten Struktur- und Sequenzbereiche sind innerhalb der

Rad2/XPG-Familie konserviert. Dagegen existieren auffallende Unterschiede in den Bereichen, welche in HsFEN1 die Selektivität für 5'-ssDNA-Überhänge mit maximal einem Nukleotid 3'-Überhang festlegen. Dies sind vor allem eine Gruppe saurer Aminosäuren (*acidic block*), die verhindert, dass 3'-Überhänge länger als ein Nukleotid gebunden werden, und zwei α -Helices, welche als eine Art Deckel (*cap*) ein Tor aus zwei weiteren α -Helices (*helical gateway*) verschließen. Durch dieses Gateway wird der einzelsträngige 5'-Flap geführt und das Cap verhindert die Bindung von dsDNA wie z.B. von Bubble-, RF- oder HJ-Strukturen (Tsutakawa *et al.*, 2011). Der saure Block ist spezifisch für HsFEN1, während auch HsEXO1 das Cap über dem Gateway konserviert hat. HsXPG und HsGEN1 fehlt beides aber fast vollständig. Durch das Fehlen dieser Strukturen sind sterisch hindernde Bereiche des aktiven Zentrums der XPG- und GEN1-Homologe weit genug geöffnet, um einen, oder im Fall einer HJ zwei, Doppelstränge aufnehmen zu können (Tsutakawa *et al.*, 2011).

4.4 Die Nicht-Resolvaseaktivität: ReF-I

AtGEN1 und AtSEND1 weisen an genickten und statischen HJs eine Aktivität auf, welche nicht einer HJ-Resolvase entspricht, sondern über ein Replikationsgabel-Intermediat zu zwei kurzen und einem langen Duplex führt. Deshalb wurde diese Aktivität in Kapitel 3.6.3 ReF-I (*replication fork intermediate*) benannt. Dabei scheint die Asymmetrie der HJs am JP ein entscheidender Faktor für diese Aktivität zu sein, denn an der X26, welche bis auf ihre beiden maximal migrierten Formen (Abbildung 4.1) immer einen punktsymmetrischen Sequenzkontext um den JP aufweist, macht die ReF-I-Aktivität nur einen kleinen Teil der HJ-Auflösung aus.

Die Schnitte von AtGEN1 und AtSEND1 in den beiden maximal weit migrierten Formen der X26 unterstützen die Hypothese, dass die Asymmetrie der Basenpaare am JP zu asymmetrischen Schnittereignissen führt. Die zentralen Basenpaare am JP der beiden extremen Migrationsformen und die nicht symmetrischen Schnitte sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Der einzelne Schnitt an Position 45 in Strang 2 durch AtSEND1 wird auch von HsGEN1 an der X26 erzeugt (Ip *et al.*, 2008).

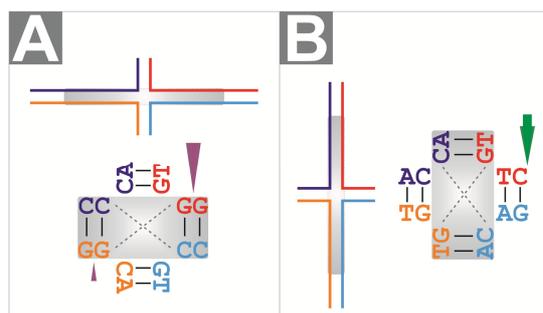


Abbildung 4.1: Asymmetrie der Sequenz am JP der X26

Gezeigt sind die beiden zentralen Basenpaare jeden Arms der X26 in ihren beiden Migrationsendpunkten. Gestrichelte Linien deuten Punktsymmetrie an, grau hinterlegte Sequenzen gehören zum homologen Kernbereich der X26. **A:** AtGEN1 schneidet in Strang 2 (rot) häufiger an Position 18 als in Strang 4 (lila Pfeile). **B:** AtSEND1 schneidet Position 45 ausschließlich in Strang 2 (grüner Pfeil)

Die statische X0 weist am JP zwangsläufig nicht punktsymmetrische Sequenzen auf, um den JP in einer Position zu fixieren. Somit bietet sich für die Resolvasen an der X0 eine ähnliche Situation wie an der voll ausgelenkten X26. Der Effekt ist besonders bei AtGEN1 offensichtlich, während bei AtSEND1 die quantitative Asymmetrie des Schnittmusters nicht ganz so ausgeprägt ist (vgl. Abbildung 3.20). Beide Enzyme zeigen jedoch eine deutliche Bevorzugung für Schnitte in zwei benachbarten Strängen, was in der Auflösung der X0 über ein RF-Intermediat resultiert. Ein weiterer Einflussfaktor neben der fehlenden Symmetrie der Sequenz am JP mag, ähnlich wie bei EcRuvC, die in Kapitel

4.5.1.2 genauer erläuterte Sequenzspezifität von AtGEN1 und AtSEND1 sein. Für EcRuvC wurde ebenfalls gezeigt, dass es an statischen HJs über zum Teil asymmetrische Schnitte auflöst und dass an einer genickten HJ RF-Intermediate entstehen (Osman *et al.*, 2009).

Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten, genickten HJs weisen dagegen am JP wie die X26 einen punktsymmetrischen Sequenzkontext auf, da die Nicks innerhalb des homologen Kernbereichs liegen. Jedoch zerstört der Nick selbst die Symmetrie der Junction. Das heißt wir haben es hier mit einer strukturellen Asymmetrie zu tun, deren bestimmendes Merkmal die Direktionalität und vor allem das 5'-Ende des unterbrochenen Stranges ist. Ein solches 5'-Ende ermöglicht es z.B. SpMus81-Eme1 zwischen den Strängen einer genickten HJ zu unterscheiden und so diese spezifisch zu Crossover-Produkten aufzulösen (Osman *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde für HsGEN1 und OsGEN-L gezeigt, dass diese, ebenso wie AtGEN1 und AtSEND1, eine Replikationsgabel spezifisch im Matrizenstrang der Folgestrangsynthese schneiden und die Leitstrangmatrize unberührt lassen (Rass *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Diese Eigenschaft ließe sich ebenfalls über die Positionierung des 5'-DNA-Endes erklären. Diese Aktivität entspricht in ihren Eigenschaften eher der 5'-Flap-Aktivität der FEN1-Homologe als einer HJ-Resolvase, mit dem Unterschied, dass statt eines ssDNA-Flaps ein doppelsträngiger Überhang vorliegt und abgespalten wird. Wie für die Aktivität der Rad2/XPG-Klassen 1 bis 3 könnte auch im Fall von AtGEN1 und AtSEND1 an den asymmetrischen Junctions ein Monomer für die Aktivität ausreichend sein. Ein Indiz dafür ist die über Elektronenmikroskopie gezeigte Bindung von HsGEN1 als Monomer an Replikationsgabeln (Rass *et al.*, 2010). Ebenso scheint an den nHJs aber die Bindung eines Dimers möglich, von denen eines in einer aktiven, das andere in einer inaktiven Konformation vorliegt (Ceschini *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2013). Wie im vorigen Kapitel erläutert, fehlen den GEN1-Homologen Elemente der Tertiärstruktur, welche in HsFEN1 verhindern, dass 5'-dsDNA-Überhänge gebunden werden können (Tsutakawa *et al.*, 2011; Tsutakawa und Tainer, 2012). Somit ist es durchaus möglich, dass eine nHJ nach dem Charakter eines Flap-Substrats gebunden wird und das jeweils aktive Zentrum dabei an den Strang dirigiert wird, mit dem das 5'-Ende des Nicks am JP paart. Somit ließe sich die Entstehung der RF-Intermediate unter Abspaltung des Arms 4 der nHJs erklären.

Weder für HsGEN1, ScYen1 noch CeGEN-1 gibt es Hinweise in den entsprechenden Publikationen für die Entstehung von kurzen Duplexprodukten und RF-Intermediaten. Darum stellt sich die Frage, ob es sich bei der ReF-I-Aktivität um eine pflanzenspezifische Erweiterung der Aktivität innerhalb der Rad2/XPG-Klasse 4 handelt. Die Schnittmuster der Resolvasen aus *A. thaliana* an der XO und das von OsGEN-L zeigen eine frappierende Ähnlichkeit: Die Verteilung der Aktivität auf die vier Stränge der statischen HJs sind insofern identisch, dass drei Stränge in deutlich höherem Maße umgesetzt werden als der vierte (diese Arbeit, Yang *et al.*, 2012). Diese Ähnlichkeiten in den Datensätzen, besonders von AtGEN1 und OsGEN-L, führen zu der Schlussfolgerung, dass auch OsGEN-L, der bis zu dieser Arbeit einzige charakterisierte pflanzliche Vertreter der HJ-Resolvasen, ebenfalls eine Aktivität entsprechend dem ReF-I-Mechanismus besitzt.

4.4.1 Eine mögliche Rolle für die ReF-I-Aktivität *in vivo*?

Es stellt sich die Frage, ob die *in vitro* beobachtete Auflösung von HJ-Strukturen über die beschriebene ReF-I-Aktivität *in vivo* eine Rolle spielt. Für die Abläufe an statischen HJs kann dies verneint werden, da eine HJ *in vivo* über Replikationsgabelregression oder Stranginvasion in homologe Sequenzen entsteht (vgl. Kapitel 1.1) und somit immer den gleichen Sequenzkontext in

gegenüberliegenden Einzelsträngen aufweist. An der getesteten X26-HJ macht die ReF-I-Aktivität nur einen geringen Anteil an den Auflösungsereignissen aus, jedoch scheint bereits das auf Grund des potentiell fatalen Ausgangs ausreichend, dass diese Aktivität unerwünscht wäre.

Im Kontext einer HJ, welche *in vivo* zwei homologe Chromosomen oder Chromatiden miteinander verbindet, würde die Auflösung über den ReF-I-Weg zwar die kovalente Verknüpfung trennen, jedoch dabei einen Doppelstrangbruch (DSB) in einer der DNA-Helices zurücklassen bzw. neu erzeugen. Dieser müsste wiederum repariert werden, was potentiell zur gleichen Situation führen könnte. Auch steht die postulierte Funktion der HJ-Resolvasen als Backup-Mechanismus (Matos *et al.*, 2011), nicht im Einklang mit dieser Aktivität.

Im Vergleich zur intakten X26 liegt der Anteil der ReF-I-Aktivität an den nHJs deutlich höher, stellt aber auch hier nur eine Nebenaktivität dar. Genickte HJ-Intermediate der DNA-Rekombination und Reparatur werden als bevorzugte Ziele HJ-auflösender Enzyme diskutiert (Schwartz und Heyer, 2011). Allerdings lässt zumindest der, im Fall von AtGEN1 gezeigte, erhebliche Anteil der ReF-I-Aktivität genickte DNA-Verzweigungen als *in vivo*-Substrate von AtGEN1 und AtSEND1 unwahrscheinlich erscheinen. Alternativ könnte die ungewollte asymmetrische Auflösung genickter und vollständiger HJs unterdrückt sein, so dass nur die Resolvaseaktivität der Enzyme zur Auflösung der Rekombinationsintermediate benutzt werden kann. Dass die ReF-I-Aktivität durch eine stringente Regulation unterdrückt werden könnte, ist in Einklang mit den Erkenntnissen, dass die HJ-Resolvaseaktivität von ScYen1 einer engen Kontrolle unterliegt (Matos *et al.*, 2011). Dabei ist die Regulation der Hefe-Resolvase ScYen1 und der strukturspezifischen Endonuklease ScMus81-Mms4, zwei wichtige Faktoren für die Auflösung von Rekombinationsintermediaten in *S. cerevisiae* eng mit dem Zellzyklus gekoppelt. Beide Endonukleasen werden über Phosphorylierungen reguliert, wobei deren Wirkung entgegengesetzt ist: phosphoryliertes ScYen1 ist inhibiert, während phosphoryliertes ScMus81-Mms4 hyperaktiv ist. In der Meiose unterstützt ScMus81-Mms4 die Bildung von Crossovers indem es während der späten Prophase I und dem Beginn der ersten Reifeteilung ScCdc5-abhängig hyperaktiviert wird. Die Aktivierung von ScYen1 in der Anaphase I und zu Beginn der zweiten Reifeteilung durch Dephosphorylierung gewährleistet dabei die korrekte Segregation der homologen Chromosomen, indem es eventuell noch vorhandene Chiasmata auflöst. Im somatischen Gewebe ist die Aktivität von ScMus81-Mms4 und ScYen1 in S- und G-Phase unterdrückt, da dort die potentielle Auflösung durch die strukturspezifischen Endonukleasen zu Crossover-Produkten schädlich für die Zelle sein kann. Stattdessen werden Rekombinationsintermediate über den Non-Crossover-spezifischen Dissolutions-Weg aufgelöst (Gangloff *et al.*, 1994; Ira *et al.*, 2003). Erst in der M-Phase werden ScMus81-Mms4 und ScYen1 durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung aktiviert und fungieren, wie ScYen1 in der Meiose, als Backup-Mechanismus um die Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen zu gewährleisten (Matos *et al.*, 2011). Hier offenbart sich für die HJ-Resolvasen eine zweite potentielle Regulationsebene: ScYen1 befindet sich während der S-Phase im Cytoplasma, ebenso wie HsGEN1, und wird während der G1-Phase in den Zellkern gebracht (Kosugi *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu scheint HsGEN1 auf die Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase der Mitose angewiesen zu sein, da keine zellzyklusabhängige Kernlokalisierung gezeigt werden konnte (Matos *et al.*, 2011).

Es ist möglich, dass diese oder ähnliche Mechanismen die *in vivo*-Aktivität der eukaryotischen HJ-Resolvasen nicht nur zeitlich regulieren, sondern auch die Art der Aktivität beeinflussen und so die potentiell toxische Aktivität von AtGEN1 und AtSEND1 unterdrücken.

4.5 AtGEN1 und AtSEND1: zwei funktionelle HJ-Resolvasen

4.5.1.1 Schnittposition

Die strukturbedingte Schnittposition von AtGEN1 und AtSEND1 wurde an der gleichen Modell-HJ bestimmt, wie für HsGEN1 und ScYen1 (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010). Dabei wurde ausgenutzt, dass eine statische HJ den Junction Point (JP) nicht verschieben kann und somit die Aussage ermöglicht, dass beide pflanzlichen HJ-Resolvasen die Phosphodiesterbindung in der Regel zwischen zwei Nukleotiden eine Position in 3'-Richtung vom JP entfernt schneiden. Diese Eigenschaft ist identisch zu sowohl den anderen bisher charakterisierten eukaryotischen HJ-Resolvasen aus Mensch, Reis, Hefe und Fadenwurm (Bailly *et al.*, 2010; Rass *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012) als auch zum Musterbeispiel der Resolvasen, EcRuvC (Osman *et al.*, 2009). Darin unterscheiden sich die HJ-Resolvasen der Eukaryoten von anderen strukturspezifischen Nukleasen wie dem Heterodimer Mus81-Mms4/EME1 und den Resolvasen der Phagen und Archaeobakterien, die zwischen 3 – 7 nt 5' des JP bzw. 2 – 3 nt 3' des JP schneiden (Komori *et al.*, 1999; Kvaratskhelia und White, 2000b; Kvaratskhelia und White, 2000a; Osman *et al.*, 2003). Auch die Schnitte an anderen verzweigten Substraten wie den 5'-Flaps (siehe das vorige Kapitel) und Replikationsgabeln gleichen sich unter den eukaryotischen Resolvasen (Rass *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

4.5.1.2 Sequenzspezifität und Strukturspezifität

Ob und wie eine verzweigte DNA-Struktur aufgelöst wird, hängt nicht immer ausschließlich von der Struktur selbst ab. Wie die in Tabelle 1.1 zusammengestellte Übersicht zeigt, ist das Vorhandensein einer bestimmten Sequenz um die gespaltene Phosphodiesterbindung als zusätzliche Voraussetzung für die Aktivität der HJ-Resolvasen nicht unüblich. Dies ist z.B. für EcRuvC zu beobachten, welches statische HJs, deren Sequenzen am JP nicht dem benötigten Consensus entsprechen, nur minimal oder gar nicht auflösen kann (Shah *et al.*, 1997; Fogg und Lilley, 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten vier 5'-Flap-Substrate unterscheiden sich alle anhand ihrer Sequenz. Sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 setzen eines (jedoch verschiedene) dieser Substrate schlechter um als die restlichen drei, was auf eine (unterschiedliche) Sequenzspezifität hindeuten kann. Allerdings ermöglichen die vier Sequenzkontexte keine Formulierung eines möglichen Consensus. Auch unter Einbeziehung der Aktivitäten an den vier Strängen der X0-HJ, welche aus den gleichen Oligonukleotiden aufgebaut ist, wie die 5'-Flaps, lässt sich noch keine Aussage über die Art der bevorzugten Sequenzen machen.

Das Vorhandensein einer Sequenzspezifität äußert sich an migrierbaren Substraten in der Bevorzugung von Hot Spots für die Schnittaktivität, seien es Modell-HJs mit homologem Kernbereich (Bennett *et al.*, 1993; Komori *et al.*, 1999; Kvaratskhelia und White, 2000b; Ip *et al.*, 2008) oder RecA-vermittelte Rekombinationssubstrate, die z.B. im Fall von EcRuvC verwendet wurden (Shah *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 im homologen Kernbereich der X26-HJ distinkte Schnittmuster erzeugen, in denen sich bis zu vier Schnittpositionen je Strang deutlich hervorheben. AtGEN1 erzeugt auf beide Schnittrichtungen verteilt am meisten Hauptschnitte (vier in 1 / 3-Richtung, einer in 2 / 4-Richtung), welche alle 3' eines Guanins liegen (G↓A, G↓C, G↓G, G↓A, G↓C). Dies spricht, auf Grund des geringen Stichprobenumfangs natürlich unter Vorbehalt, für eine Sequenzpräferenz von AtGEN1, welche mit 5'-G↓-3' beschrieben

werden kann (siehe Tabelle 4.2), in ihrem weiteren Umfang jedoch unbekannt ist. Eine Aussage über einen möglichen Consensus von AtSEND1 wäre voreilig, da es nur drei Hauptschnitte an der X26 erzeugt. Es ist aber auffällig, dass zwei der drei Schnitte in der Sequenz 5'-CTA↓G-3' erfolgen. Dies könnte auf eine Sequenzpräferenz hindeuten, die ähnlich viele Positionen umfasst wie die von EcRuvC und SsoHje. Für die meisten anderen Resolvasen wurde ein kürzerer Consensus beschrieben (vgl. Tabelle 1.1).

Tabelle 4.2: Sequenzkontext der Hauptschnittpositionen an der X26

AtGEN1			AtSEND1			
5'-	-3'	Produkt	5'-	-3'	Produkt	
CAAT	TGG↓	ATTGCT	23 nt	TTGCTA↓	GGACAT	30 nt
GGAT	TTG↓	CTAGGA	27 nt	GTCCTA↓	GCAATC	32 nt
TGCT	TAG↓	GACATC	31 nt	TCCTAG↓	CAATCC	33 nt
GCTAG	G↓	ACATCT	32 nt			
TCCT	TAG↓	CAATCC	33 nt			

Die Sequenz am JP und die Struktur des Substrats scheinen in unterschiedlichem Maße Einfluss auf die Aktivitäten von AtGEN1 und AtSEND1 zu nehmen. Während AtSEND1 eine durchgängige Leiter von schwachen Schnittprodukten zwischen 22 und 44 nt erzeugt, also die X26 an fast jeder Position des Kernbereichs spaltet, weist die Verteilung von AtGEN1 Lücken auf. Dies gibt Raum für die Spekulation, dass AtSEND1 die X26 an fast jeder Position des homologen Kernbereichs auf Grund der HJ-Struktur schneidet. Mit der möglichen Sequenzpräferenz lässt sich das so vereinbaren, dass AtSEND1 dann besonders aktiv ist, wenn ein bestimmter Sequenzkontext um den JP der HJ vorliegt. AtGEN1 dagegen könnte entweder einen sehr kurzen oder flexibleren Consensus als AtSEND1 aufweisen, welcher für die Aktivität vorhanden sein muss, weil die HJ-Struktur allein nicht ausreicht. Diese Eigenschaft würde EcRuvC entsprechen, welches ebenfalls eine HJ nur dann schneidet, wenn eine Sequenz entsprechend dem Consensus um den JP vorliegt (Shah *et al.*, 1997; Fogg und Lilley, 2000). Allerdings sind für eine Erhebung dieser Hypothesen über den Rang der Spekulation hinaus weitere Versuche beispielsweise mit den Junctions Jbm5 (Komori *et al.*, 1999; Bailly *et al.*, 2010) und X12 (Kobbe *et al.*, 2008) nötig, um die zur Verfügung stehenden Sequenzdaten zu erweitern.

4.5.1.3 Symmetrische Schnittmuster und ligierbare Resolvaseprodukte

Die Orientierung der eingeführten Schnitte an den getesteten HJs kennzeichnet AtGEN1 und AtSEND1 als HJ-Resolvasen. Dies ist insbesondere an der X26 ersichtlich, welche mit ihrem homologen Kernbereich von 26 Nukleotiden zu 26 Schritten *branch migration* fähig ist. Dabei ahmt sie, so lange der JP nicht an einer der beiden möglichen, maximal weit migrierten Positionen liegt, die Eigenschaften einer HJ in der Zelle nach. Sie ist dann, im Gegensatz zu den statischen Modell-HJs, in alle Richtungen migrierbar und weist direkt am JP immer einen punktsymmetrischen Sequenzkontext auf. Unter dieser Voraussetzung erzeugen AtGEN1 und AtSEND1 ein nahezu perfekt symmetrisches Schnittmuster: die Schnitte in den gegenüberliegenden antiparallelen Strängen sind immer paarweise in Position und Häufigkeit identisch. Ausgehend von der strukturbestimmten Schnittposition (Kapitel 4.5.1.1) ist anzunehmen, dass auch an der X26 die Schnitte bevorzugt 1 nt 3' des JP erzeugt werden. Mit der Bevorzugung bestimmter Schnittstellen, wie für beide Proteine

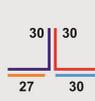
beobachtet, lässt sich das so vereinbaren, dass die entsprechende Phosphodiesterbindung dann gespalten wird, wenn sie 1 nt 3' des JP lokalisiert ist.

Die Religierbarkeit der Schnittprodukte und die zeitlich dichte Abfolge der Schnitte in den gegenüberliegenden antiparallelen Armen der HJ sind weitere, über die Schnittmustersymmetrie hinausgehende, Eigenschaft einer HJ-Resolvase. Ein symmetrisches Schnittmuster allein zeigt noch nicht, dass die entstehenden Produkte Resolvaseprodukte sind. Es wäre z.B. denkbar, dass ein symmetrisches Schnittmuster auch dann entsteht, wenn eine Nickase (also ein Enzym welches einen Strang der HJ schneidet und sich dann wieder löst) durch die identische Sequenz der gegenüberliegenden Stränge gesteuert, die HJ nach und nach in Duplexprodukte zerlegen würde. Dabei wäre aber nicht gewährleistet, dass die Auflösung über symmetrische Schnitte geschähe, wie es das Schnittmuster vortäuschen würde. Stattdessen könnten auch Produkte mit Einzelstranglücken und -überhängen entstehen. Für AtGEN1 und AtSEND1 konnte jedoch über die Entstehung des spezifischen Ligationsprodukts an der X26-S gezeigt werden, dass das Schnittmuster der X26 in religierbarem Produkt resultiert. Erste weiterführende Experimente zeigen zusätzlich, dass AtSEND1 ein plasmidbasierendes Substrat durch dicht aufeinander folgende Schnitte auflöst. Also agieren AtGEN1 und AtSEND nicht wie eine Nickase, sondern entsprechend dem Mechanismus einer Resolvase.

4.5.1.4 Die Aktivität an genickten HJs offenbart einen überwiegenden Anteil der HJ-Resolvaseaktivität

Die Aktivitäten von AtGEN1 und AtSEND1 zeigen auch an den genickten HJs Eigenschaften einer HJ-Resolvase. Wie diese Eigenschaften trotz der überlagernden ReF-I-Aktivität zu erkennen sind soll im Folgenden erläutert werden. Dabei wird auch gezeigt werden, dass der Nick in Strang 3 der getesteten nHJs unterschiedliche Auswirkungen hat. Der ausschlaggebende Punkt ist die Position des Nicks bezogen auf das Schnittmuster des jeweiligen Enzyms an der intakten X26. Entspricht die Position des Nicks einer der bevorzugten Schnittstellen des jeweiligen Enzyms, wird die gegenüberliegende Position in Strang 1 verstärkt gespalten. Weicht die Position des Nicks von den bevorzugten Schnittstellen des jeweiligen Enzyms ab, erfolgt der Schnitt, allein durch die Struktur bestimmt, genau ein Nukleotid 3' der symmetrischen Position.

Um diese Punkte herauszuarbeiten, ist der direkte Vergleich der Schnittmuster an den nHJs mit dem Schnittmuster des entsprechenden RF-Intermediats notwendig. Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Modellreplikationsgabeln auf Basis der X26-HJ (Kapitel 3.5) entsprechen exakt den Strukturen, die übrig bleiben, wenn der jeweilige Hauptschnitt in Strang 4 der nX-30 bzw. nX-32 vor einem Schnitt in Strang 1 erfolgt. Das folgende Schema zeigt die entsprechenden Zugehörigkeiten:

Schnitt in Strang 4				
 nX-32	AtGEN1:	Position 28	➔	 RF1
	AtSEND1:	Position 29	➔	 RF2
 nX-30	AtGEN1:	Position 33	➔	 RF3
	AtSEND1:			

AtSEND1 löst die nX-30 entsprechend einer Resolvase auf

AtSEND1 schneidet die intakte X26 in 1 / 3-Richtung bevorzugt an Position 30, der Nick der nX-30 entspricht dieser Präferenz. Das Schnittmuster von AtSEND1 in Strang 1 der nX-30 mit dem, einer Resolvase entsprechenden, Hauptprodukt von 30 nt ist mit dem der RF3 nahezu identisch. Darum wäre es zunächst denkbar, dass die Schnitte an der nX-30 vollständig über den Umweg über das RF3-Intermediat entstehen. Allerdings würde dies voraussetzen, dass alle umgesetzten nX-30-Moleküle zuerst in Strang 4 geschnitten würden, wodurch ausschließlich kurzes Duplexprodukt mit der 4*-Markierung entstehen würde. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie sowohl die nativen Gele als auch die relative Intensität der Schnitte von Strang 4 der nX-30 (Abbildung 4.2) zeigen. Maximal 25 % der Produkte sind kurze Duplices, während die restlichen 75 % lange Duplices sind. Lange Duplexprodukte mit einer Markierung im Strang 4 können ausschließlich dann entstehen, wenn die nHJ im Strang gegenüber dem Nick und sonst in keinem weiteren Strang geschnitten wird. Daraus lässt sich folgern, dass der überwiegende Teil der Schnitte in Strang 1 entsprechend einer Resolvaseaktivität als erster und einziger Schnitt erfolgen. Dies trifft sowohl für die bevorzugte Schnittposition exakt gegenüber dem Nick zu, als auch auf den schwächeren Nebenschnitt bei 31 nt, welcher 1 nt 3' des JP liegt.

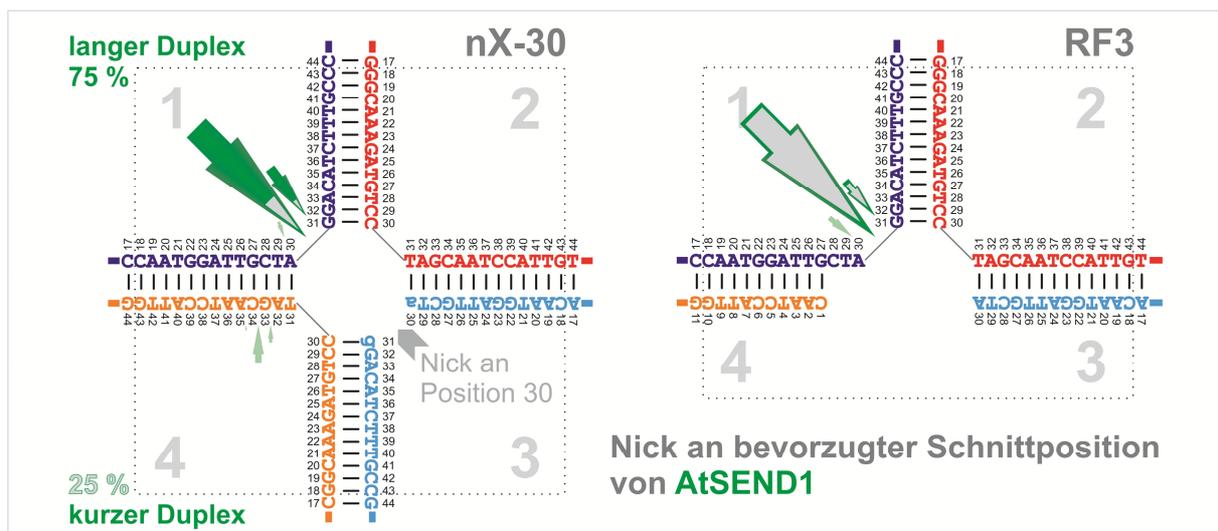


Abbildung 4.2: HJ-Resolvaseaktivität von AtSEND1 an der nX-30

Gezeigt sind die Schnittmuster von AtSEND1 jeweils im Vergleich an der nX-30 (links) und dem entsprechenden RF3-Intermediat (rechts). Pfeile, die nicht der Hauptresolvaseantwort auf den Nick entsprechen, sind transparent dargestellt. Graue Flächen in den Pfeilen symbolisieren den Anteil der ReF-I-Aktivität. Die Prozentangaben zu „langer Duplex“ und „kurzer Duplex“ geben die ungefähre Verteilung auf kD- und nD-Produkte in den nativen Gelen an (siehe Abbildung 3.14 für die genauen Werte).

AtGEN1 löst die nX-32 entsprechend einer Resolvase auf

Das Schnittmuster der X26 zeigt, dass die Position 32 die am häufigsten von AtGEN1 gespaltene Stelle in 1 / 3-Richtung ist. Somit wurde der Nick in der nX-32 so gelegt, dass er dieser Schnittpräferenz entspricht. Gleich wie bei der Kombination von AtSEND1 und nX-30 unterscheidet sich das Schnittmuster von Strang 1 der nX-32 kaum von dem des entsprechenden Strangs der RF1 (Abbildung 4.3). Jedoch zeigen auch in dieser Kombination die nativen Gele und die Schnitte in Strang 4 der nHJ,

dass nur ein kleiner Anteil der Schnitte über den ReF-I-Weg zu erklären ist. Es zeigt sich ebenso eine deutliche Bevorzugung der Schnittposition exakt gegenüber dem Nick. Demnach löst auch AtGEN1 eine nHJ zu ligierbaren Duplices auf, wenn der Nick einer der Hauptschnittstellen der intakten HJ entspricht.

Diese beiden Beispiele belegen, dass sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 an einer genickten HJ überwiegend als HJ-Resolvase aktiv sind.

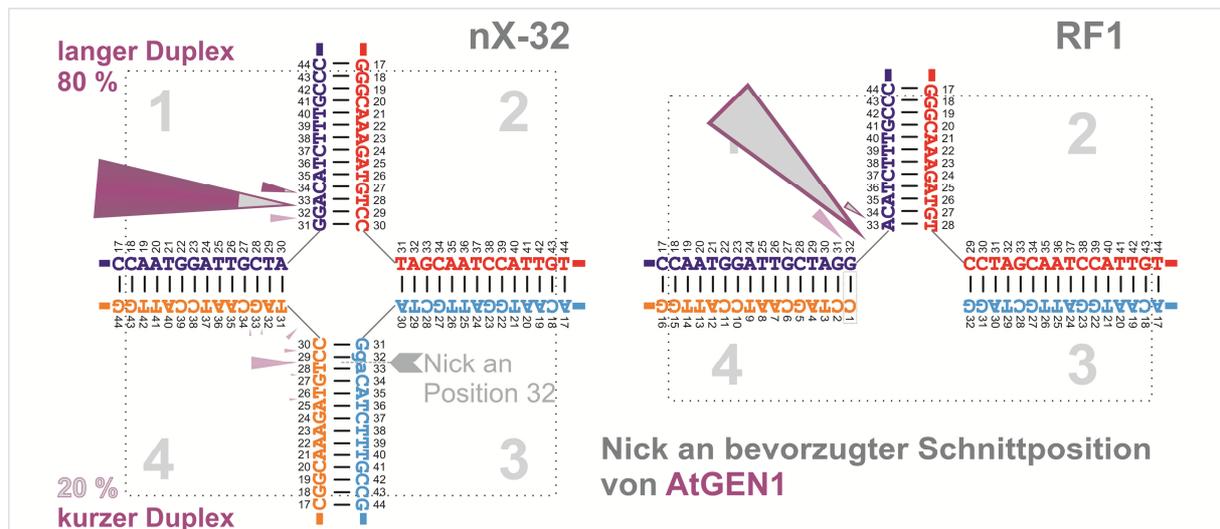


Abbildung 4.3: HJ-Resolvaseaktivität von AtGEN1 an der nX-32

Gezeigt sind die Schnittmuster von AtGEN1 jeweils im Vergleich an der nX-32 (links) und dem entsprechenden RF1-Intermediat (rechts). Pfeile, die nicht der Hauptresolvaseantwort auf den Nick entsprechen, sind transparent dargestellt. Graue Flächen in den Pfeilen symbolisieren den Anteil der ReF-I-Aktivität. Die Prozentangaben zu „langer Duplex“ und „kurzer Duplex“ geben die ungefähre Verteilung auf kD- und nD-Produkte in den nativen Gelen an (siehe Abbildung 3.18 für die genauen Werte).

Lässt sich die Position des Counternicks beliebig verschieben?

Um den Positionseinfluss des Nicks auf die Schnittaktivität im gegenüberliegenden Arm weiter zu charakterisieren, wurden auch die Kombinationen von Resolvase und nHJ getestet, bei denen der Nick an einer Position liegt, welche in der X26 nicht oder kaum geschnitten wird. Für die Interpretation der Ergebnisse wird, wie von Pöhler *et al.*, 1994 postuliert, davon ausgegangen, dass der Nick dazu führt, dass die migrierbare Junction in einer bestimmten Form fixiert wird, mit dem Nick im JP. Im Fall der nX-30 bedeutet dies, dass der JP zwischen den Basen 30 und 31 liegt, und entsprechend für die nX-32 zwischen den Basen 32 und 33.

AtSEND1 an der nX-32: Der Nick führt nur eingeschränkt zu einem symmetrisch orientierten Gegenschnitt

Die Bevorzugung eines Schnittes im Strang gegenüber dem Nick ist für AtSEND1 an der nX-32 relativ leicht ersichtlich. Die Argumentation ist dabei identisch zu der an der nX-30. Obwohl sich die Schnittmuster an der nX-32 und dem Replikationsgabel-Intermediat (RF2) nicht unterscheiden (Abbildung 4.4), kann Strang 1 nur zu einem geringen Anteil über den Umweg des ReF-I gespalten

werden, da deutlich weniger kurze Duplexprodukte im nativen Gel erscheinen als lange Duplices und die Aktivität von AtSEND1 in Strang 4 der nX-32 vergleichsweise schwach ist. Umgekehrt formuliert heißt das, dass der überwiegende Teil der AtSEND1-Aktivität an der nX-32 entsprechend einer HJ-Resolvase zur Spaltung von Strang 1 führt. Auf den ersten Blick widerspricht die bevorzugte Schnittposition 33, welche nicht punktsymmetrisch zum Nick liegt, dem HJ-Resolvasecharakter. Geht man aber davon aus, dass der Nick das Zentrum der Junction bildet, liegt die bevorzugte Schnittposition in Strang 1 genau ein Nukleotid 3' des JP. Das heißt, dass hier der strukturelle Aspekt bestimmend wirkt und AtSEND1 entsprechend seiner inhärenten Eigenschaften als eukaryotische Resolvase die HJ an der typischen Position 1 nt 3' des JP schneidet.

Der zum Nick symmetrische Schnitt an Position 32, welcher in religierbaren Produkten resultiert, ist deutlich seltener als der an Position 33. Allerdings kann auch dessen Häufigkeit nur zu einem Viertel über die ReF-I-Aktivität erklärt werden, womit auch die Schnitte an dieser Position über die Resolvaseaktivität von AtSEND1 entstehen müssen.

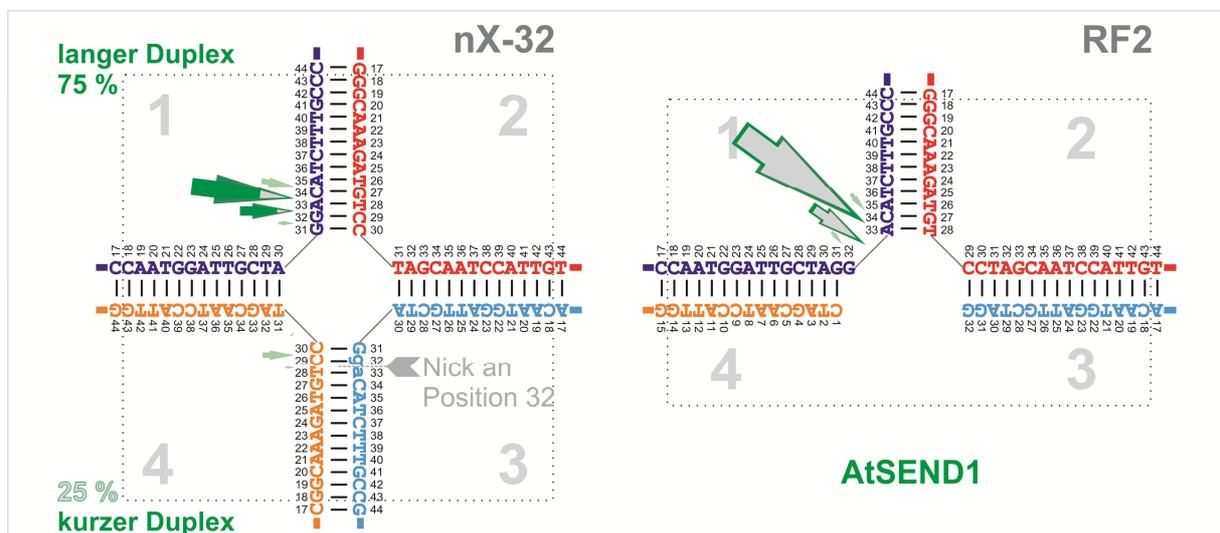


Abbildung 4.4: HJ-Resolvaseaktivität von AtSEND1 an der nX-32

Gezeigt sind die Schnittmuster von AtSEND1 jeweils im Vergleich an der nX-32 (links) und dem entsprechenden RF2-Intermediat (rechts). Pfeile, die nicht der Hauptresolvaseantwort auf den Nick entsprechen, sind transparent dargestellt. Graue Flächen in den Pfeilen symbolisieren den Anteil der ReF-I-Aktivität. Die Prozentangaben zu „langer Duplex“ und „kurzer Duplex“ geben die ungefähre Verteilung auf kD- und nD-Produkte in den nativen Gelen an (siehe Abbildung 3.18 für die genauen Werte).

AtGEN1 an der nX-30: Der Nick führt nicht zu einem symmetrisch orientierten Gegenschnitt

AtGEN1 zeigt an der nX-30 ein distinktes Schnittmuster, welches sich in Strang 1 von dem der RF3 unterscheidet (Abbildung 4.5). Es ist charakterisiert durch zwei Hauptschnitte, von denen der an Position 31, also 1 nt 3' des JP, ca. doppelt so häufig vorkommt wie der an Position 30 im JP. Über Gelextraktion der nativen Produkte wurde gezeigt, dass der 30er-Schnitt ausschließlich über den ReF-I-Weg entsteht und in kurzem Duplex resultiert (Abbildung 3.15). Die nativen Gele und die Verteilung der Schnittaktivitäten zeigen, dass ungefähr die Hälfte aller aufgelösten nX-30-Moleküle über den ReF-I-Weg zu zwei kurzen und einem langen Duplex aufgelöst werden (Abbildung 4.5). Da jedoch das Schnittmuster der RF3 zeigt, dass auf diesem Weg Position 31 und 30 gleich häufig

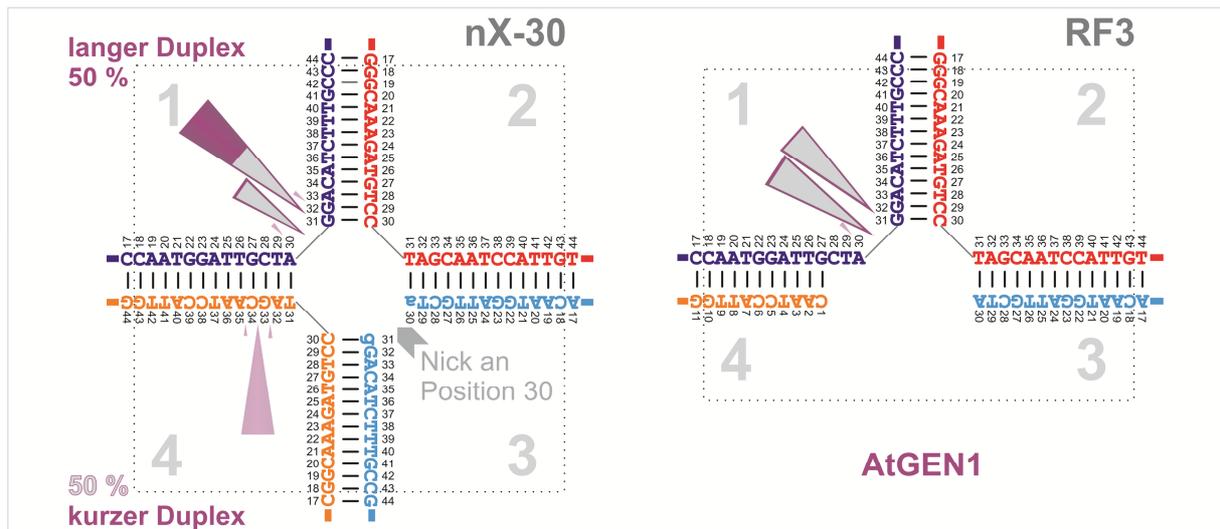


Abbildung 4.5: HJ-Resolvaseaktivität von AtGEN1 an der nX-30

Gezeigt sind die Schnittmuster von AtGEN1 jeweils im Vergleich an der nX-30 (links) und dem entsprechenden RF3-Intermediat (rechts). Pfeile, die nicht der Hauptresolvaseantwort auf den Nick entsprechen, sind transparent dargestellt. Graue Flächen in den Pfeilen symbolisieren den Anteil der ReF-I-Aktivität. Die Prozentangaben zu „langer Duplex“ und „kurzer Duplex“ geben die ungefähre Verteilung auf kD- und nD-Produkte in den nativen Gelen an (siehe Abbildung 3.14 für die genauen Werte).

geschnitten werden, lässt dies nur die Erklärung zu, dass die überschüssigen Schnitte an Position 31 in Strang 1 der nX-30 über Resolvaseaktivität entstehen. Die Gelextraktion der langen Duplices belegt dies zusätzlich (Abbildung 3.15B). Wie im Fall von AtSEND1 an der nX-32 liegt diese Schnittposition genau ein Nukleotid 3' des JP, wenn der Nick das Zentrum der nHJ bildet. Somit ist auch für die Kombination von AtGEN1 und dem Nick an Position 30 gezeigt, dass die Auflösung entsprechend der strukturellen Präferenz einer eukaryotischen HJ-Resolvase durch Schnitte 1 nt 3' des JP erfolgt.

Wie lassen sich relativ zum Nick versetzte Schnitte mit HJ-Resolvasen vereinbaren?

Bei allen vier Kombinationen aus nHJ und Resolvase wurden Schnitte beobachtet, die in Relation zum Nick um ein Nukleotid nach 3' verschoben sind. Solche Schnitte führen zu nicht religierbaren Produkten mit 1 nt Lücken bzw. Überhängen. Obwohl solche nicht religierbaren Produkte von einer klassischen HJ-Resolvase primär nicht erwartet werden, lassen sich gerade diese Schnitte so interpretieren, dass es sich bei AtGEN1 und AtSEND1 um funktionelle Resolvasen handelt. Die Strukturelektivität und der Schnitt 1 nt 3' des JP sind inhärente Eigenschaften, welche die beiden *Arabidopsis*-Homologe mit ihren weiteren eukaryotischen Verwandten teilen, und die für diese Schnitte verantwortlich sind.

Eine intakte HJ wird durch die Bindung einer HJ-Resolvase unter Ausbildung eines Homodimers und zwei Schnitte, je einer von jedem aktiven Zentrum, aufgelöst. Im Fall des RuvC-Homologs von *Thermus thermophilus* zeigt die Kristallstruktur zwei unterschiedliche Konformere der beiden Monomere in einem Dimer (Kapitel 1.3.1.4.1, Chen *et al.*, 2013). Auch für SpYdc2 stellte sich heraus, dass die Monomere innerhalb eines Dimers nicht absolut symmetrisch sind, sondern sich in der Positionierung einzelner Aminosäureseitenketten unterscheiden (Ceschini *et al.*, 2001). Im Fall von TthRuvC handelte es sich dabei um AS, welche eine Rolle für die korrekte Ausrichtung des gebundenen Substrats im aktiven Zentrum spielen, bei SpYdc2 liegen die Unterschiede im aktiven Zentrum selbst und betreffen die Koordinierung der für die Aktivität essentiellen zweiwertigen

Metallionen. Diese Unterschiede sprechen für die Hypothese, dass ein Resolvasedimer aus einem katalytisch aktiven und einem katalytisch inaktiven Monomer aufgebaut sein kann. Darüber hinaus wird postuliert, dass durch das Einbringen des Schnitts durch das aktive Monomer eine Konformationsänderung induziert wird. Durch diese Konformationsänderung geht das inaktive Monomer in die aktive Konformation über und das aktive Monomer wird inaktiviert (Chen *et al.*, 2013). Gleichzeitig zum Umklappen von Aminosäureseitenketten scheint eine damit verbundene Konformationsänderung des HJ-Substrats wahrscheinlich, welche dazu führt, dass sich der noch zu spaltende Strang der HJ in das neu aktivierte aktive Zentrum des zweiten Monomers einpasst. Die Untersuchung von Kristallstrukturen von HsMUS81-EME1 zeigen, wie die erhöhte Flexibilität der genickten HJ nach dem ersten Schnitt es ermöglicht, dass der noch aufzulösende Strang in das zweite aktive Zentrum des Heterotetramers eingepasst wird (Kapitel 1.3.1.4.1, Chang *et al.*, 2008). Dafür könnte eine Konformationsänderung des flexiblen Bereichs zwischen der HhH2-DNA-Bindedomäne und der Nukleasedomäne von HsMUS81 eine unterstützende Rolle spielen (Chang *et al.*, 2008).

Übertragen auf die Familienmitglieder der Rad2/XPG-Nukleasen und insbesondere auf die eukaryotischen HJ-Resolvasen bieten diese Eigenschaften eine plausible Erklärung für das Verhalten von AtGEN1 und AtSEND1 an den genickten HJ-Substraten im Vergleich zur intakten HJ. Besteht der Resolvasedimer nach der Bindung an eine nHJ aus einem aktiven und einem inaktiven Konformer, trifft dieser auf Grund der strukturspezifischen Bindung am JP auf den bereits vorhandenen künstlichen Nick. Für den Fall, dass die Untereinheit, die den genickten Strang bindet, in ihrer aktiven Konformation vorliegt, findet diese kein geeignetes Substrat und kann so auch nicht die durch den Schnitt bedingte, gegenseitige Konformationsänderung einleiten. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird diese unproduktive Bindung nach der Lebenszeit des Enzym-DNA-Komplexes aufgelöst werden ohne dass die nHJ verändert wurde. Wird die nHJ dagegen so gebunden, dass die inaktive Untereinheit des Resolvasedimers den künstlich genickten Strang bindet und die aktive Form in Kontakt mit dem intakten Strang 1 kommt, entsteht ein produktiver Komplex. Allerdings würde dabei die Schnittposition allein über die Struktur der HJ als solche bestimmt werden, was in den beobachteten Schnitten 1 nt 3' des JP resultieren würde. Im Unterschied dazu würde an der intakten HJ die erste nukleolytische Spaltung zur gegenseitigen Konformationsänderung der Monomere und evtl. der Junction führen und somit gewährleisten, dass der Counternick in symmetrischer Orientierung erfolgt (Chang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013).

Der ungeordnete Charakter der C-Termini aller Klasse 4-Homologe bietet die Möglichkeit für solche bindungs- und aktivitätsabhängige Veränderungen der Proteinstruktur. Darüber hinaus wurde für HsFEN1 gezeigt, dass zwei Bereiche (die *hydrophobic wedge* und das *helical cap*) der Sekundär- und Tertiärstruktur einen ungeordneten Charakter aufweisen, jedoch einen substratinduzierten *disorder to order* Übergang durchlaufen und eine entscheidende Rolle für die Substratspezifität spielen (Sakurai *et al.*, 2005; Tsutakawa *et al.*, 2011).

Das vorgeschlagene Modell erklärt jedoch nicht, warum die Schnitte in Strang 1 der nHJs dann symmetrisch sind, wenn der Nick einer bevorzugten Schnittposition entspricht (z.B. AtSEND1 an der nX-30). Zunächst können ähnliche Vorgänge angenommen werden, wie zuvor für die nicht passenden Nickpositionen beschrieben, welche zu Schnitten 1 nt 3' der symmetrischen Position führen. Solche Schnitte sind auch in den Schnittmustern von AtSEND1 an der nX-30 (Abbildung 4.2) und AtGEN1 an der nX-32 (Abbildung 4.3) erkennbar. Die Bevorzugung der symmetrischen Hauptschnitte lässt sich dann erklären, wenn man die in Kapitel 4.5.1.2 diskutierte Sequenzpräferenz von AtGEN1 und AtSEND1 in die Betrachtung mit einbezieht: Entspricht der Nick einer bevorzugten Schnittstelle des

jeweiligen Enzyms an der X26, heißt das, dass die Sequenz im intakten Strang 1 um die symmetrische Position ebenfalls der bevorzugten Sequenz entspricht. In Analogie zu SpMus81-Eme1 (Chang *et al.*, 2008; Osman *et al.*, 2009) könnte die durch den Nick vorhandene Flexibilität der nHJ es ermöglichen, dass diese bevorzugte Sequenz in das aktive Zentrum von AtGEN1 bzw. AtSEND1 eingepasst werden kann. Somit würde ein symmetrischer Schnitt zu den beobachteten religierbaren Produkten führen.

Zusammengefasst suggerieren die hier präsentierten Ergebnisse, dass durch die Position eines künstlichen Nicks die Aktivität der Resolvase an der nHJ beeinflusst werden kann, jedoch die beliebige Verschiebung der symmetrischen Schnitte nicht möglich ist. Auch wenn der künstliche Nick sich durch die Verwendung eines am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotids topologisch nicht vom Phosphodiesteraseprodukt einer Resolvase unterscheidet, scheint der Vorgang der ersten nukleolytischen Spaltung notwendig zu sein für die Symmetrie der Schnitte. Dies kann so gedeutet werden, dass ein künstlicher Nick nicht äquivalent zu einem endonukleolytisch eingebrachten Einzelstrangbruch in einem der HJ-Stränge ist. Der Effekt, den der künstliche Nick auf die Aktivität der Resolvasen AtGEN1 und AtSEND1 ausübt, wird über die Struktur der nHJ vermittelt und äußert sich in zwei Aspekten. (I) Der Nick führt im Vergleich zur intakten HJ zu häufigeren Schnitten in Strang 1 über die Resolvaseaktivität. Ein ähnliches Verhalten wurde für den strukturspezifischen Endonuklease-Komplex Mus81-Mms4 in *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *A. thaliana* beschrieben (Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Geuting, 2008). (II) Die so fixierte genickte HJ wird entsprechend dem Resolvasecharakter von AtGEN1 und AtSEND1 an der Rad2/XPG-typischen Position 1 nt 3' des JP geschnitten. Zu einer Abweichung kommt es nur dann, wenn ein Nukleotid in 5'-Richtung, also im JP selbst, eine vom entsprechenden Enzym bevorzugte Sequenz lokalisiert ist.

4.6 Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Abschließend sollen der Übersicht halber die im vorangegangenen dargestellten Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Charakterisierung von AtGEN1 und AtSEND1 noch einmal direkt gegenübergestellt werden.

Beide *A. thaliana* Homologe der Klasse 4 der Rad2/XPG-Nukleasefamilie zeigen *in vitro* eine dsDNA-Flap-Aktivität, welche HJs über ein Replikationsgabel-Intermediat auflöst. Diese Aktivität ist jedoch nur eine Nebenaktivität. Die Hauptaktivität an HJs entspricht der einer HJ-Resolvaseaktivität, mit deutlichen Parallelen zum RuvC-Paradigma und den eukaryotischen HJ-Resolvasen: Sowohl AtGEN1 als auch AtSEND1 schneiden strukturspezifisch das Zucker-Phosphat-Rückgrat gegenüberliegender DNA-Einzelstränge ein Nukleotid 3' des Überkreuzungspunktes einer HJ und lösen diese zu religierbaren Duplices auf. Beide Enzyme zeigen eine Präferenz für Schnitte in bestimmten Sequenzen. Ihre Aktivitäten in einem DNA-Strang gegenüber einem Einzelstrangbruch (Nick) in einer HJ lassen sich durch die Position des Nicks beeinflussen und führen zu einer Konzentrierung des Schnittmusters auf einige wenige Schnittpositionen in diesem Strang. Dabei führt das Vorhandensein eines bevorzugten Sequenzkontexts gegenüber dem Nick zu symmetrischen Schnittprodukten, während eine abweichende Sequenz zu ein Nukleotid nach 3' versetzten Schnitten führt.

AtGEN1 und AtSEND1 teilen 34 % Ähnlichkeit in ihren konservierten N-terminalen Bereichen auf Sequenzebene. Die restliche Primärstruktur ist jedoch wenig konserviert, auch wenn generelle Eigenschaften wie der Sequenzabschnitt mit Homologie zur *Chromo domain-like*-Domäne und der ungeordnete Charakter des C-Terminus erhalten sind. Daraus erwachsende Unterschiede der

Sekundär- und Tertiärstruktur könnten die Grundlage für die leichten Unterschiede in der Substratspezifität der beiden Resolvasen sein. AtGEN1 setzt sowohl Replikationsgabeln als auch genickte HJs und 5'-Flaps in ähnlichem Umfang um. AtSEND1 zeigt im Gegensatz dazu eine leichte Präferenz für einfach und zweifach verzweigte DNA-Strukturen (5'-Flaps und Replikationsgabeln) gegenüber HJs. Zwischen den getesteten HJs unterscheidet AtSEND1 in geringerem Ausmaß als AtGEN1, d.h. die Unterschiede der Aktivität zwischen nHJs und intakten HJs sind weniger ausgeprägt. Die ReF-I-Aktivität von AtSEND1 macht an allen getesteten HJ-Substraten einen deutlich geringeren Anteil der Gesamtaktivität aus, als für AtGEN1 beobachtet. Letzteres löst bis zur Hälfte einer genickten HJ über die Nicht-Resolvaseaktivität auf. Zuletzt scheint eine unterschiedliche Gewichtung des Sequenzeinflusses auf die Schnitteffizienz wahrscheinlich: Bei AtGEN1 scheint die Sequenzpräferenz einen größeren Einfluss auf die Positionierung der Schnitte zu haben, als bei AtSEND1.

5. Ausblick

Die Grundlage der Resolution von Holliday Junctions, d.h. die Auflösung über symmetrische Schnitte zu religierbaren Produkten, benötigt die dicht aufeinanderfolgende endonukleolytische Aktivität zweier aktiver Zentren der HJ-Resolvase. Dies wird bei allen bisher beschriebenen Resolvasen dadurch gewährleistet, dass alle entweder bereits in Lösung als Homodimere vorliegen (z.B. EcRuvC, T4 Endo VII) oder substratabhängig erst an der HJ dimerisieren (HsGEN1). Während für die Resolvasen der Phagen und Prokaryoten die dabei interagierenden Bereiche der Proteine gut charakterisiert sind, sind die Grundlagen der Dimerisierung für die eukaryotischen Resolvasen unklar. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von AtSEND1 und AtGEN1 in den meisten eukaryotischen Resolvasen die *Chromo domain-like*-Variante (CDLV) bioinformatisch identifiziert, welche sich zwischen den GEN1- und SEND1-Homologen unterscheiden. Beide Varianten weisen Homologien zur Chromo- und Chromo shadow-Domäne auf. Für letztere wurde die Fähigkeit zur Homodimerisierung gezeigt (Smothers und Henikoff, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Die Charakterisierung rekombinanter Proteine mit deletierten oder ausgetauschten CDLVs, könnte Einblicke in eine potentielle Rolle der CDLVs bei der Dimerisierung der eukaryotischen HJ-Resolvasen ermöglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen *in vitro*-Daten erlauben die Formulierung weitreichender biochemischer Fragestellungen. Zum Beispiel wurde hier anhand der Schnittmuster gezeigt, dass beide *Arabidopsis*-Resolvasen eine Sequenzpräferenz besitzen, die sich jedoch zwischen AtGEN1 und AtSEND1 unterscheidet. Es wäre für eine auf den hier gezeigten Ergebnissen aufbauende Charakterisierung von Interesse, diese Sequenzpräferenz genauer zu bestimmen. Hierzu könnte man zusätzlich zur Verwendung weiterer mobiler Modell-HJs, eine plasmidbasierende, RecA-vermittelte α -Struktur, wie für EcRuvC beschrieben, am Lehrstuhl etablieren. Aufbauend auf den daraus gewonnenen Erkenntnissen könnten dann gezielt weitere Substrate designt werden. Diese könnten zum Beispiel für weitere Experimente zur Resolution innerhalb der Lebenszeit eines Enzym-Substrat-Komplexes verwendet werden oder um den Positionseffekt eines künstlichen Nicks noch eingehender zu untersuchen.

Auch die weitere *in vivo* Charakterisierung der beiden HJ-Resolvasen von *Arabidopsis thaliana* bietet noch interessante Ansätze. Da die bisherige Charakterisierung von Einzel- und Doppelmutanten von AtGEN1 und AtSEND1 keine Sensitivitäten gegen Genotoxine zeigte, ist die weiterführende Untersuchung von Mehrfachmutanten mit weiteren (potentiellen) Faktoren der Homologen Rekombination wie AtMUS81-EME1A/B, AtRECQ4A und AtSLX1A/B, die an der Auflösung von HJ-Intermediaten beteiligt, sind sinnvoll. Insbesondere wäre interessant, ob sich Mutanten mit entweder AtGEN1 oder AtSEND1 in Kombination mit den weiteren Faktoren unterschiedlich verhalten und so weitere Unterschiede der beiden Paraloge herausarbeiten lassen.

6. Zusammenfassung

Holliday Junctions (HJs) kommen als intermediäre Strukturen in der DNA-Reparatur und der meiotischen Neuorganisation des Genoms über Homologe Rekombination vor und müssen für das schadensfreie Überleben der Zelle aufgelöst werden. Die Resolution, d.h. die Auflösung über punktsymmetrisch orientierte Schnitte in zwei gegenüberliegenden Strängen der Junction zu religierbaren Produkten, ist eine Möglichkeit, wie dies geschehen kann. Für einige Mitglieder der Klasse 4 der eukaryotischen Rad2/XPG-Nukleasefamilie wurde eine HJ-Resolvaseaktivität beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden die biochemischen Eigenschaften der beiden *Arabidopsis*-Homologe der Rad2/XPG Klasse 4 AtGEN1 und AtSEND1 mit Fokus auf ihre mögliche Rolle als HJ-Resolvase bestimmt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass neben den bereits bioinformatisch nachgewiesenen GEN1-Homologen auch die SEND1-Homologe in den höheren Pflanzen konserviert sind und sie auf eine Genduplikation nach der Abspaltung der Moose und Farne zurückgehen. Es wurde gezeigt, dass beide *Arabidopsis*-Homologe *in vitro* eine strukturspezifische Endonukleaseaktivität besitzen, welche eine im Vergleich zu den Homologen aus Mensch und Fadenwurm breitere Substratspezifität aufweisen: Sowohl 5'-Flaps, Replikationsgabeln und HJs sind Substrate von AtGEN1 und AtSEND1, wobei sich die Präferenzen der beiden Proteine leicht unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt weiterhin für AtGEN1 und AtSEND1 *in vitro* eine Aktivität, die auf Grund der involvierten Replikationsgabelintermediate ReF-I (*replication fork intermediate*) getauft wurde und eine Nebenaktivität der beiden Proteine darstellt.

Die Hauptaktivität von AtGEN1 und AtSEND1 ist jedoch die einer HJ-Resolvase: an fast allen getesteten HJ-Substraten erfolgte der überwiegende Anteil der Auflösung entsprechend einer Resolvaseaktivität. Insbesondere an der mobilen X26, welche mit ihrem homologen Kernbereich von allen getesteten Strukturen die beste Annäherung an die *in vivo*-Eigenschaften einer HJ darstellt, erfolgt die Auflösung der HJ hauptsächlich über Resolution. Die Resolvasen aus *Arabidopsis thaliana* teilen die Eigenschaften ihrer Homologe der Rad2/XPG-Klasse 4 und zeigen deutliche Ähnlichkeiten zum Resolvasenparadigma EcRuvC: Sowohl die Position der strukturspezifischen Schnitte ein Nukleotid 3' des Junction Point, die Symmetrie der Schnitte, als auch die Bevorzugung eines, noch weitestgehend unbekanntes, Sequenzkontextes sind konservierte Eigenschaften. Die Experimente an den genickten mobilen Holliday Junctions zeigten erstmals für die klassischen HJ-Resolvasen, dass an einer migrierbaren genickten Junction der Schnitt im gegenüberliegenden Strang bevorzugt um ein Nukleotid in 3'-Richtung versetzt erfolgt, wenn der Sequenzkontext von der Präferenz des jeweiligen

Enzyms abweicht. Entspricht der Nick einer präferierten Schnittposition der Resolvase, erfolgt der gegenüberliegende Schnitt bevorzugt in der symmetrischen Position.

Die Tatsache, dass in den höheren Pflanzen sowohl die GEN1- als auch die SEND1-Homologe im Verlauf der Evolution konserviert sind, spricht für unterschiedliche Funktionen der beiden pflanzlichen Resolvasen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Unterschiede der *in vitro*-Eigenschaften unterstützen diese Hypothese: (I) AtGEN1 und AtSEND1 weisen unterschiedliche Präferenzen bezüglich der bevorzugten Substrate auf, (II) AtSEND1 löst HJ-Substrate in geringerem Umfang über den Ref-I-Weg auf als AtGEN1 und (III) die Sequenzpräferenz der beiden Enzyme unterscheidet sich.

7. Summary

Holliday junctions (HJs) arise as intermediate structures during DNA repair and meiotic reorganization of the genome by homologous recombination and have to be separated to warrant cell survival without detrimental rearrangements. One of the possible ways of achieving this goal is called resolution and is characterized by symmetrically related incisions in two opposite strands of the junction, resulting in readily religatable products. A Holliday junction resolving activity has been described for some members of class 4 of the eukaryotic Rad2/XPG nuclease family. The objective of the present study was the biochemical characterization of the two *Arabidopsis* homologs AtGEN1 and AtSEND1 focusing on potential functions as HJ resolvases.

In the work described here it is shown that in addition to the GEN1 homologs, which have already been confirmed with bioinformatic methods, the SEND1 homologs are conserved in higher plants as well. Both genes originate from a gene duplication event, which most likely took place after the differentiation of moss and ferns. It is demonstrated that both class 4 homologs of the Rad2/XPG family from *Arabidopsis thaliana* exhibit structure-specific endonuclease activities *in vitro*, which show a wider substrate specificity compared to the human and worm homologs: 5'-flaps as well as replication forks and HJs are substrates of AtGEN1 and AtSEND1, with slightly different preferences by the two proteins.

This study describes an *in vitro* activity of AtGEN1 and AtSEND1, which was named ReF-I (replication fork intermediate) based on the involvement of replication forks as intermediate structures. This activity is a subsidiary activity of the two proteins.

However, the main activity of AtGEN1 and AtSEND1 is that of a HJ resolvase: almost all tested HJ substrates were resolved mainly with characteristics of a resolution activity. The mobile X26 in particular, which among all tested structures represents the best approximation of the properties of a HJ *in vivo*, due to its homologous core, is essentially resolved by canonical resolution activities. The resolvases of *Arabidopsis thaliana* share the characteristics of its Rad2/XPG class 4 homologs and show considerable similarities with the EcRuvC paradigm of resolvases: Both the position of the structure-specific incisions one nucleotide 3' of the junction point, as well as the symmetry of the incisions, and the preference of a yet to be determined sequence context are conserved properties. The experiments with the nicked mobile Holliday Junctions provide the first evidence for canonical HJ resolvases, that, if the sequence context deviates from the preference of the respective enzyme, the preferential cleavage in the opposite strand is displaced by one nucleotide in 3' direction. If, in contrast, the nick matches a preferred cleavage site of the resolvase, the incision at a symmetrical position in the opposite strand is favored.

The evolutionary conservation of both GEN1 and SEND1 homologs in higher plants argues for different functions of the two resolvases in plants. The present data specifies differences in their *in vitro* characteristics, supporting this hypothesis: (I) AtGEN1 and AtSEND1 show different substrate specificities, (II) AtSEND1 resolves HJ substrates to a lesser extent by the ReF-I activity than AtGEN1 and (III) die sequence specificities of both enzymes differ.

8. Referenzen

- Aasland, R. und Stewart, A. F. (1995). "The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1." *Nucleic Acids Res* **23**(16): 3168-73.
- Agmon, N., Yovel, M., Harari, Y., Liefshitz, B. und Kupiec, M. (2011). "The role of Holliday junction resolvases in the repair of spontaneous and induced DNA damage." *Nucleic Acids Res* **39**(16): 7009-19.
- Agostinho, A., Meier, B., Sonnevile, R., Jagut, M., Woglar, A., Blow, J., Jantsch, V. und Gartner, A. (2013). "Combinatorial Regulation of Meiotic Holliday Junction Resolution in *C. elegans* by HIM-6 (BLM) Helicase, SLX-4, and the SLX-1, MUS-81 and XPF-1 Nucleases." *PLoS Genet* **9**(7): e1003591.
- Akhtar, A., Zink, D. und Becker, P. B. (2000). "Chromodomains are protein-RNA interaction modules." *Nature* **407**(6802): 405-9.
- Andersen, S. L., Kuo, H. K., Savukoski, D., Brodsky, M. H. und Sekelsky, J. (2011). "Three structure-selective endonucleases are essential in the absence of BLM helicase in *Drosophila*." *PLoS Genet* **7**(10): e1002315.
- Ariyoshi, M., Vassilyev, D. G., Iwasaki, H., Nakamura, H., Shinagawa, H. und Morikawa, K. (1994). "Atomic structure of the RuvC resolvase: a holliday junction-specific endonuclease from *E. coli*." *Cell* **78**(6): 1063-72.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. und Pedersen, J. (2006). "Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins." *Protein Expr Purif* **48**(1): 1-13.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. und Schwede, T. (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." *Bioinformatics* **22**(2): 195-201.
- Aylon, Y., Liefshitz, B. und Kupiec, M. (2004). "The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle." *EMBO J* **23**(24): 4868-75.
- Bailly, A. P., Freeman, A., Hall, J., Declais, A. C., Alpi, A., Lilley, D. M. J., Ahmed, S. und Gartner, A. (2010). "The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolvases links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair." *PLoS Genet* **6**(7): e1001025.
- Bennett, R. J., Dunderdale, H. J. und West, S. C. (1993). "Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase: cleavage specificity and DNA distortion." *Cell* **74**(6): 1021-31.
- Bennett, R. J. und West, S. C. (1995). "Structural analysis of the RuvC-Holliday junction complex reveals an unfolded junction." *J Mol Biol* **252**(2): 213-26.
- Bennett, R. J. und West, S. C. (1996). "Resolution of Holliday junctions in genetic recombination: RuvC protein nicks DNA at the point of strand exchange." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12217-22.
- Bennett, R. J. und Keck, J. L. (2004). "Structure and function of RecQ DNA helicases." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**(2): 79-97.
- Benson, F. E. und West, S. C. (1994). "Substrate specificity of the *Escherichia coli* RuvC protein. Resolution of three- and four-stranded recombination intermediates." *J Biol Chem* **269**(7): 5195-201.
- Biertümpfel, C., Yang, W. und Suck, D. (2007). "Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction." *Nature* **449**(7162): 616-20.
- Blanck, S., Kobbe, D., Hartung, F., Fengler, K., Focke, M. und Puchta, H. (2009). "A SRS2 homolog from *Arabidopsis thaliana* disrupts recombinogenic DNA intermediates and facilitates single strand annealing." *Nucleic Acids Res* **37**(21): 7163-76.
- Blanco, M. G., Matos, J., Rass, U., Ip, S. C. und West, S. C. (2010). "Functional overlap between the structure-specific nucleases Yen1 and Mus81-Mms4 for DNA-damage repair in *S. cerevisiae*." *DNA Repair (Amst)* **9**(4): 394-402.

- Blastyak, A., Hajdu, I., Unk, I. und Haracska, L. (2010). "Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLF1 in replication of damaged DNA." *Mol Cell Biol* **30**(3): 684-93.
- 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.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. und Jones, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* Rockville, Maryland, USA, American Society of Plant Physiologists.
- Bzymek, M., Thayer, N. H., Oh, S. D., Kleckner, N. und Hunter, N. (2010). "Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair." *Nature* **464**(7290): 937-41.
- Center, M. S. und Richardson, C. C. (1970). "An endonuclease induced after infection of Escherichia coli with bacteriophage T7. I. Purification and properties of the enzyme." *J Biol Chem* **245**(23): 6285-91.
- Ceschini, S., Keeley, A., McAlister, M. S., Oram, M., Phelan, J., Pearl, L. H., Tsaneva, I. R. und Barrett, T. E. (2001). "Crystal structure of the fission yeast mitochondrial Holliday junction resolvase Ydc2." *EMBO J* **20**(23): 6601-11.
- 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, J. und Astrom, S. U. (2012). "A catalytic and non-catalytic role for the Yen1 nuclease in maintaining genome integrity in Kluyveromyces lactis." *DNA Repair (Amst)* **11**(10): 833-43.
- Chen, J. H., Churchill, M. E., Tullius, T. D., Kallenbach, N. R. und Seeman, N. C. (1988). "Construction and analysis of monomobile DNA junctions." *Biochemistry* **27**(16): 6032-8.
- Chen, L., Shi, K., Yin, Z. und Aihara, H. (2013). "Structural asymmetry in the Thermus thermophilus RuvC dimer suggests a basis for sequential strand cleavages during Holliday junction resolution." *Nucleic Acids Res* **41**(1): 648-56.
- Churchill, M. E., Tullius, T. D., Kallenbach, N. R. und Seeman, N. C. (1988). "A Holliday recombination intermediate is twofold symmetric." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13): 4653-6.
- Clegg, R. M., Murchie, A. I., Zechel, A., Carlberg, C., Diekmann, S. und Lilley, D. M. (1992). "Fluorescence resonance energy transfer analysis of the structure of the four-way DNA junction." *Biochemistry* **31**(20): 4846-56.
- Cole, F., Keeney, S. und Jasin, M. (2010). "Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins: more than just Spo11." *Genes Dev* **24**(12): 1201-7.
- Connolly, B., Parsons, C. A., Benson, F. E., Dunderdale, H. J., Sharples, G. J., Lloyd, R. G. und West, S. C. (1991). "Resolution of Holliday junctions in vitro requires the Escherichia coli ruvC gene product." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14): 6063-7.
- Constantinou, A., Davies, A. A. und West, S. C. (2001). "Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells." *Cell* **104**(2): 259-68.
- Cooper, J. P. und Hagerman, P. J. (1989). "Geometry of a branched DNA structure in solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19): 7336-40.
- Coulon, S., Gaillard, P. H., Chahwan, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd und Russell, P. (2004). "Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast." *Mol Biol Cell* **15**(1): 71-80.
- Cowieson, N. P., Partridge, J. F., Allshire, R. C. und McLaughlin, P. J. (2000). "Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis." *Curr Biol* **10**(9): 517-25.
- Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D. und Wilson, T. E. (2005). "Nonhomologous end joining in yeast." *Annu Rev Genet* **39**: 431-51.
- Declais, A. C. und Lilley, D. M. (2000). "Extensive central disruption of a four-way junction on binding CCE1 resolving enzyme." *J Mol Biol* **296**(2): 421-33.
- Declais, A. C., Fogg, J. M., Freeman, A. D., Coste, F., Hadden, J. M., Phillips, S. E. und Lilley, D. M. (2003). "The complex between a four-way DNA junction and T7 endonuclease I." *EMBO J* **22**(6): 1398-409.
- Dickie, P., McFadden, G. und Morgan, A. R. (1987). "The site-specific cleavage of synthetic Holliday junction analogs and related branched DNA structures by bacteriophage T7 endonuclease I." *J Biol Chem* **262**(30): 14826-36.
- Doe, C. L., Osman, F., Dixon, J. und Whitby, M. C. (2000). "The Holliday junction resolvase SpCCE1 prevents mitochondrial DNA aggregation in Schizosaccharomyces pombe." *Mol Gen Genet* **263**(6): 889-97.
- Duckett, D. R., Murchie, A. I., Diekmann, S., von Kitzing, E., Kemper, B. und Lilley, D. M. J. (1988). "The structure of the Holliday junction, and its resolution." *Cell* **55**(1): 79-89.
- Duckett, D. R., Murchie, A. I. und Lilley, D. M. (1990). "The role of metal ions in the conformation of the four-way DNA junction." *EMBO J* **9**(2): 583-90.

- Duckett, D. R., Panis, M. J. und Lilley, D. M. (1995). "Binding of the junction-resolving enzyme bacteriophage T7 endonuclease I to DNA: separation of binding and catalysis by mutation." *J Mol Biol* **246**(1): 95-107.
- Dunand-Sauthier, I., Hohl, M., Thorel, F., Jaquier-Gubler, P., Clarkson, S. G. und Scharer, O. D. (2005). "The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity." *J Biol Chem* **280**(8): 7030-7.
- Dunderdale, H. J., Sharples, G. J., Lloyd, R. G. und West, S. C. (1994). "Cloning, overexpression, purification, and characterization of the Escherichia coli RuvC Holliday junction resolvase." *J Biol Chem* **269**(7): 5187-94.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic Acids Res* **32**(5): 1792-7.
- Eichman, B. F., Vargason, J. M., Mooers, B. H. und Ho, P. S. (2000). "The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: sequence effects on the structure of four-way junctions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 3971-6.
- Eissenberg, J. C. (2001). "Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age." *Gene* **275**(1): 19-29.
- Elborough, K. M. und West, S. C. (1990). "Resolution of synthetic Holliday junctions in DNA by an endonuclease activity from calf thymus." *EMBO J* **9**(9): 2931-6.
- Ezekiel, U. R. und Zassenhaus, H. P. (1993). "Localization of a cruciform cutting endonuclease to yeast mitochondria." *Mol Gen Genet* **240**(3): 414-8.
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E. R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M. Q., Ruse, C., Yates, J. R., 3rd, Russell, P., Fuchs, R. P., McGowan, C. H. und Gaillard, P. H. (2009). "Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases." *Cell* **138**(1): 78-89.
- Finger, L. D., Blanchard, M. S., Theimer, C. A., Sengerova, B., Singh, P., Chavez, V., Liu, F., Grasby, J. A. und Shen, B. (2009). "The 3'-flap pocket of human flap endonuclease 1 is critical for substrate binding and catalysis." *J Biol Chem* **284**(33): 22184-94.
- Fogg, J. M., Schofield, M. J., White, M. F. und Lilley, D. M. (1999). "Sequence and functional-group specificity for cleavage of DNA junctions by RuvC of Escherichia coli." *Biochemistry* **38**(35): 11349-58.
- Fogg, J. M. und Lilley, D. M. (2000). "Ensuring productive resolution by the junction-resolving enzyme RuvC: large enhancement of the second-strand cleavage rate." *Biochemistry* **39**(51): 16125-34.
- Fogg, J. M., Schofield, M. J., Declais, A. C. und Lilley, D. M. (2000). "Yeast resolving enzyme CCE1 makes sequential cleavages in DNA junctions within the lifetime of the complex." *Biochemistry* **39**(14): 4082-9.
- Fogg, J. M., Kvaratskhelia, M., White, M. F. und Lilley, D. M. (2001). "Distortion of DNA junctions imposed by the binding of resolving enzymes: a fluorescence study." *J Mol Biol* **313**(4): 751-64.
- Forbes, S. A., Bhamra, G., Bamford, S., Dawson, E., Kok, C., Clements, J., Menzies, A., Teague, J. W., Futreal, P. A. und Stratton, M. R. (2008). "The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)." *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 10**: Unit 10 11.
- Freeman, A. D., Ward, R., El Mkami, H., Lilley, D. M. und Norman, D. G. (2011). "Analysis of conformational changes in the DNA junction-resolving enzyme T7 endonuclease I on binding a four-way junction using EPR." *Biochemistry* **50**(46): 9963-72.
- Freeman, A. D., Declais, A. C. und Lilley, D. M. (2013). "The importance of the N-terminus of T7 endonuclease I in the interaction with DNA junctions." *J Mol Biol* **425**(2): 395-410.
- Fricke, W. M. und Brill, S. J. (2003). "Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3." *Genes Dev* **17**(14): 1768-78.
- Furukawa, T., Kimura, S., Ishibashi, T., Mori, Y., Hashimoto, J. und Sakaguchi, K. (2003). "OsSEND-1: a new RAD2 nuclease family member in higher plants." *Plant Mol Biol* **51**(1): 59-70.
- 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.
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L. und Rothstein, R. (1994). "The Yeast Type I Topoisomerase Top3 Interacts with Sgs1, a DNA Helicase Homolog: a Potential Eukaryotic Reverse Gyrase." *Microbiology* **14**(12).
- Gao, M., Rendtlew Danielsen, J., Wei, L. Z., Zhou, D. P., Xu, Q., Li, M. M., Wang, Z. Q., Tong, W. M. und Yang, Y. G. (2012). "A novel role of human holliday junction resolvase GEN1 in the maintenance of centrosome integrity." *PLoS One* **7**(11): e49687.
- Gari, K., Decaillet, C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. und Constantinou, A. (2008). "The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks." *Mol Cell* **29**(1): 141-8.
- 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.
- Gebhardt, J. (2010). "Klonierung, Expression und Aufreinigung der Helikase AtRECQsim aus *Arabidopsis thaliana*." *Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*. Zulassungsarbeit.
- Geuting, V. (2008). "Biochemische Charakterisierung der MUS81-EME1A- und MUS81-EME1B-Endonukleasekomplexe von *Arabidopsis thaliana*." *Botanisches Institut II, Universität Karlsruhe (TH)*. Dissertation.
- Geuting, V., Kobbe, D., Hartung, F., Durr, J., Focke, M. und Puchta, H. (2009). "Two distinct MUS81-EME1 complexes from *Arabidopsis* process Holliday junctions." *Plant Physiol* **150**(2): 1062-71.
- Giraud-Panis, M. J. und Lilley, D. M. (1997). "Near-simultaneous DNA cleavage by the subunits of the junction-resolving enzyme T4 endonuclease VII." *EMBO J* **16**(9): 2528-34.
- Graf, D. (2010). "Optimierung der Expression und Aufreinigung von AtGEN1." *Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*. Bachelorthese.
- Grainger, R. J., Murchie, A. I. und Lilley, D. M. (1998). "Exchange between stacking conformers in a four-Way DNA junction." *Biochemistry* **37**(1): 23-32.
- Grasby, J. A., Finger, L. D., Tsutakawa, S. E., Atack, J. M. und Tainer, J. A. (2012). "Unpairing and gating: sequence-independent substrate recognition by FEN superfamily nucleases." *Trends Biochem Sci* **37**(2): 74-84.
- Green, V., Curtis, F. A., Sedelnikova, S., Rafferty, J. B. und Sharples, G. J. (2013). "Mutants of phage bIL67 RuvC with enhanced Holliday junction binding selectivity and resolution symmetry." *Mol Microbiol*.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. und Prakash, S. (1994). "Holliday junction cleavage by yeast Rad1 protein." *Nature* **371**(6497): 531-4.
- Hadden, J. M., Declais, A. C., Carr, S. B., Lilley, D. M. und Phillips, S. E. (2007). "The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease I." *Nature* **449**(7162): 621-4.
- 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., Sawada, Y., Kuromori, T., Klausnitzer, R., Saito, K., Toyoda, T., Shinozaki, K., Li, W. H. und Hirai, M. Y. (2011). "Functional compensation of primary and secondary metabolites by duplicate genes in *Arabidopsis thaliana*." *Mol Biol Evol* **28**(1): 377-82.
- Harrington, J. J. und Lieber, M. R. (1994). "Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair." *Genes Dev* **8**(11): 1344-55.
- Hartung, F. und Puchta, H. (2000). "Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*." *Nucleic Acids Res* **28**(7): 1548-54.
- 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.
- Ho, C. K., Mazon, G., Lam, A. F. und Symington, L. S. (2010). "Mus81 and Yen1 promote reciprocal exchange during mitotic recombination to maintain genome integrity in budding yeast." *Mol Cell* **40**(6): 988-1000.
- Hohl, M., Thorel, F., Clarkson, S. G. und Scharer, O. D. (2003). "Structural determinants for substrate binding and catalysis by the structure-specific endonuclease XPG." *J Biol Chem* **278**(21): 19500-8.
- Holliday, R. (1964). "A mechanism for gene conversion in fungi." *Genet Res* **5**(02): 282-304.
- Hyde, H., Davies, A. A., Benson, F. E. und West, S. C. (1994). "Resolution of recombination intermediates by a mammalian activity functionally analogous to *Escherichia coli* RuvC resolvase." *J Biol Chem* **269**(7): 5202-9.
- Ip, S. C., Rass, U., Blanco, M. G., Flynn, H. R., Skehel, J. M. und West, S. C. (2008). "Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast." *Nature* **456**(7220): 357-61.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. und Haber, J. E. (2003). "Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast." *Cell* **115**(4): 401-11.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijsa, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., Haber, J. E. und Foiani, M. (2004). "DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1." *Nature* **431**(7011): 1011-7.
- Ishikawa, G., Kanai, Y., Takata, K., Takeuchi, R., Shimanouchi, K., Ruike, T., Furukawa, T., Kimura, S. und Sakaguchi, K. (2004). "DmGEN, a novel RAD2 family endo-exonuclease from *Drosophila melanogaster*." *Nucleic Acids Res* **32**(21): 6251-9.
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Shiba, T., Nakata, A. und Shinagawa, H. (1991). "*Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure." *EMBO J* **10**(13): 4381-9.

- Jackson, S. P. und Bartek, J. (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-8.
- Jensch, F., Kosak, H., Seeman, N. C. und Kemper, B. (1989). "Cruciform Cutting Endonucleases from *Saccharomyces-Cerevisiae* and Phage-T4 Show Conserved Reactions with Branched Dnas." Embo Journal **8**(13): 4325-4334.
- Jeyaseelan, R. und Shanmugam, G. (1988). "Human placental endonuclease cleaves Holliday junctions." Biochem Biophys Res Commun **156**(2): 1054-60.
- Kanai, Y., Ishikawa, G., Takeuchi, R., Ruike, T., Nakamura, R., Ihara, A., Ohashi, T., Takata, K., Kimura, S. und Sakaguchi, K. (2007). "DmGEN shows a flap endonuclease activity, cleaving the blocked-flap structure and model replication fork." FEBS J **274**(15): 3914-27.
- Kelley, L. A. und Sternberg, M. J. (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." Nat Protoc **4**(3): 363-71.
- Kemper, B. und Brown, D. T. (1976). "Function of gene 49 of bacteriophage T4. II. Analysis of intracellular development and the structure of very fast-sedimenting DNA." J Virol **18**(3): 1000-15.
- Kemper, B. und Janz, E. (1976). "Function of gene 49 of bacteriophage T4. I. Isolation and biochemical characterization of very fast-sedimenting DNA." J Virol **18**(3): 992-9.
- Kerr, C. und Sadowski, P. D. (1975). "The involvement of genes 3,4,5 and 6 in genetic recombination in bacteriophage T7." Virology **65**(1): 281-5.
- Khuu, P. A., Voth, A. R., Hays, F. A. und Ho, P. S. (2006). "The stacked-X DNA Holliday junction and protein recognition." J Mol Recognit **19**(3): 234-42.
- Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. und Schwede, T. (2009). "The SWISS-MODEL Repository and associated resources." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D387-92.
- Kleff, S., Kemper, B. und Sternglanz, R. (1992). "Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease." EMBO J **11**(2): 699-704.
- Klimesch, J. (2012). "Untersuchungen zur somatischen homologen Doppelstrangbruch-Reparatur in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*." Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Dissertation.
- Knoll, A. (2011). "Rolle der DNA-Helikasen FANCM, SRS2 und RTEL1 in der somatischen und meiotischen homologen Rekombination von *Arabidopsis thaliana*." Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Dissertation.
- Kobbe, D., Blanck, S., Demand, K., Focke, M. und Puchta, H. (2008). "AtRECQ2, a RecQ helicase homologue from *Arabidopsis thaliana*, is able to disrupt various recombinogenic DNA structures in vitro." The Plant Journal **55**(3): 397-405.
- Komori, K., Sakae, S., Shinagawa, H., Morikawa, K. und Ishino, Y. (1999). "A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8873-8.
- Komori, K., Sakae, S., Fujikane, R., Morikawa, K., Shinagawa, H. und Ishino, Y. (2000). "Biochemical characterization of the hjc holliday junction resolvase of *Pyrococcus furiosus*." Nucleic Acids Res **28**(22): 4544-51.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. und Yanagawa, H. (2009). "Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10171-6.
- Kuligina, E., Sokolenko, A. P., Mitiushkina, N. V., Abysheva, S. N., Preobrazhenskaya, E. V., Gorodnova, T. V., Yanus, G. A., Togo, A. V., Cherdynitseva, N. V., Bekhtereva, S. A., Dixon, J. M., Larionov, A. A., Kuznetsov, S. G. und Imyanitov, E. N. (2013). "Value of bilateral breast cancer for identification of rare recessive at-risk alleles: evidence for the role of homozygous GEN1 c.2515_2519delAAGTT mutation." Fam Cancer **12**(1): 129-32.
- Kvaratskhelia, M. und White, M. F. (2000a). "Two Holliday junction resolving enzymes in *Sulfolobus solfataricus*." J Mol Biol **297**(4): 923-32.
- Kvaratskhelia, M. und White, M. F. (2000b). "An archaeal Holliday junction resolving enzyme from *Sulfolobus solfataricus* exhibits unique properties." J Mol Biol **295**(2): 193-202.
- Leach, D. R. (2007). "Holliday junctions, heteroduplex DNA and map expansion: a commentary on 'A mechanism for gene conversion in fungi' by Robin Holliday." Genet Res **89**(5-6): 281-3.
- Lee, B. I. und Wilson, D. M., 3rd (1999). "The RAD2 domain of human exonuclease 1 exhibits 5' to 3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities." J Biol Chem **274**(53): 37763-9.
- Li, X. und Heyer, W. D. (2008). "Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance." Cell Res

- 18**(1): 99-113.
- Lieber, M. R. (1997). "The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair." *Bioessays* **19**(3): 233-40.
- Lilley, D. M. J. (2000). "Structures of helical junctions in nucleic acids." *Q Rev Biophys* **33**(2): 109-59.
- Lilley, D. M. J. und White, M. F. (2001). "The junction-resolving enzymes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(6): 433-43.
- Lin, F. L., Sperle, K. und Sternberg, N. (1984). "Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process." *Mol Cell Biol* **4**(6): 1020-34.
- Liu, Y., Kao, H. I. und Bambara, R. A. (2004). "Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism." *Annu Rev Biochem* **73**: 589-615.
- Llorente, B., Smith, C. E. und Symington, L. S. (2008). "Break-induced replication: what is it and what is it for?" *Cell cycle*.
- Lockshon, D., Zweifel, S. G., Freeman-Cook, L. L., Lorimer, H. E., Brewer, B. J. und Fangman, W. L. (1995). "A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast." *Cell* **81**(6): 947-55.
- Lorenz, A., West, S. C. und Whitby, M. C. (2010). "The human Holliday junction resolvase GEN1 rescues the meiotic phenotype of a *Schizosaccharomyces pombe* mus81 mutant." *Nucleic Acids Res* **38**(6): 1866-73.
- Lydeard, J. R., Jain, S., Yamaguchi, M. und Haber, J. E. (2007). "Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32." *Nature* **448**(7155): 820-3.
- Machwe, A., Xiao, L. und Orren, D. K. (2006). "Length-dependent degradation of single-stranded 3' ends by the Werner syndrome protein (WRN): implications for spatial orientation and coordinated 3' to 5' movement of its ATPase/helicase and exonuclease domains." *BMC Mol Biol* **7**: 6.
- Malkova, A., Ivanov, E. L. und Haber, J. E. (1996). "Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7131-6.
- Mankouri, H. W. und Hickson, I. D. (2007). "The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvosome'?" *Trends Biochem Sci* **32**(12): 538-46.
- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M. und West, S. C. (2011). "Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis." *Cell* **147**(1): 158-72.
- McKinney, S. A., Declais, A. C., Lilley, D. M. J. und Ha, T. (2003). "Structural dynamics of individual Holliday junctions." *Nat Struct Biol* **10**(2): 93-7.
- Mendez, D. L., Kim, D., Chruszcz, M., Stephens, G. E., Minor, W., Khorasanizadeh, S. und Elgin, S. C. (2011). "The HP1a disordered C terminus and chromo shadow domain cooperate to select target peptide partners." *Chembiochem* **12**(7): 1084-96.
- Meselson, M. und Weigle, J. J. (1961). "Chromosome Breakage Accompanying Genetic Recombination in Bacteriophage." *PNAS* **47**: 857-868.
- Middleton, C. L., Parker, J. L., Richard, D. J., White, M. F. und Bond, C. S. (2004). "Substrate recognition and catalysis by the Holliday junction resolving enzyme Hje." *Nucleic Acids Res* **32**(18): 5442-51.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2009). "Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination." *Trends Biochem Sci* **34**(5): 264-72.
- Mishima, Y., Watanabe, M., Kawakami, T., Jayasinghe, C. D., Otani, J., Kikugawa, Y., Shirakawa, M., Kimura, H., Nishimura, O., Aimoto, S., Tajima, S. und Suetake, I. (2013). "Hinge and chromoshadow of HP1alpha participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes." *J Mol Biol* **425**(1): 54-70.
- Mizuuchi, K., Kemper, B., Hays, J. und Weisberg, R. A. (1982). "T4 endonuclease VII cleaves holliday structures." *Cell* **29**(2): 357-65.
- Moritoh, S., Miki, D., Akiyama, M., Kawahara, M., Izawa, T., Maki, H. und Shimamoto, K. (2005). "RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGEN-like), a new member of the RAD2/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice." *Plant Cell Physiol* **46**(5): 699-715.
- Mueller, J. E., Kemper, B., Cunningham, R. P., Kallenbach, N. R. und Seeman, N. C. (1988). "T4 endonuclease VII cleaves the crossover strands of Holliday junction analogs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9441-5.
- 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.
- Muñoz-Galván, S., Tous, C., Blanco, M. G., Schwartz, E. K., Ehmsen, K. T., West, S. C., Heyer, W. D. und Aguilera, A. (2012). "Distinct roles of Mus81, Yen1, Slx1-Slx4, and Rad1 nucleases in the repair of replication-born double-strand breaks by sister chromatid exchange." *Mol Cell Biol* **32**(9): 1592-603.
- Murchie, A. I., Clegg, R. M., von Kitzing, E., Duckett, D. R., Diekmann, S. und Lilley, D. M. (1989). "Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules." *Nature* **341**(6244): 763-6.
- Murchie, A. I., Portugal, J. und Lilley, D. M. (1991). "Cleavage of a four-way DNA junction by a restriction

- enzyme spanning the point of strand exchange." *EMBO J* **10**(3): 713-8.
- 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): 255-262.
- Nielsen, F. C., Jager, A. C., Lutzen, A., Bundgaard, J. R. und Rasmussen, L. J. (2004). "Characterization of human exonuclease 1 in complex with mismatch repair proteins, subcellular localization and association with PCNA." *Oncogene* **23**(7): 1457-68.
- Nishino, T., Komori, K., Tsuchiya, D., Ishino, Y. und Morikawa, K. (2001). "Crystal structure of the archaeal holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition." *Structure* **9**(3): 197-204.
- Nowakowski, J., Shim, P. J., Prasad, G. S., Stout, C. D. und Joyce, G. F. (1999). "Crystal structure of an 82-nucleotide RNA-DNA complex formed by the 10-23 DNA enzyme." *Nat Struct Biol* **6**(2): 151-6.
- Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Crouch, R. J. und Yang, W. (2005). "Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis." *Cell* **121**(7): 1005-16.
- Oram, M., Keeley, A. und Tsaneva, I. (1998). "Holliday junction resolvase in *Schizosaccharomyces pombe* has identical endonuclease activity to the CCE1 homologue YDC2." *Nucleic Acids Res* **26**(2): 594-601.
- Orans, J., McSweeney, E. A., Iyer, R. R., Hast, M. A., Hellinga, H. W., Modrich, P. und Beese, L. S. (2011). "Structures of human exonuclease 1 DNA complexes suggest a unified mechanism for nuclease family." *Cell* **145**(2): 212-23.
- Orel, N., Kyryk, A. und Puchta, H. (2003). "Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome." *Plant J* **35**(5): 604-12.
- Ortiz-Lombardia, M., Gonzalez, A., Eritja, R., Aymami, J., Azorin, F. und Coll, M. (1999). "Crystal structure of a DNA Holliday junction." *Nat Struct Biol* **6**(10): 913-7.
- 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., Gaskell, L. und Whitby, M. C. (2009). "Efficient second strand cleavage during Holliday junction resolution by RuvC requires both increased junction flexibility and an exposed 5' phosphate." *PLoS One* **4**(4): e5347.
- Otsuji, N., Iyehara, H. und Hideshima, Y. (1974). "Isolation and characterization of an *Escherichia coli* *ruv* mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation." *J Bacteriol* **117**(2): 337-44.
- Panayotatos, N. und Wells, R. D. (1981). "Cruciform structures in supercoiled DNA." *Nature* **289**(5797): 466-70.
- Panyutin, I. G. und Hsieh, P. (1994). "The kinetics of spontaneous DNA branch migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 2021-5.
- Panyutin, I. G., Biswas, I. und Hsieh, P. (1995). "A pivotal role for the structure of the Holliday junction in DNA branch migration." *EMBO J* **14**(8): 1819-26.
- Pardo, B. und Aguilera, A. (2012). "Complex chromosomal rearrangements mediated by break-induced replication involve structure-selective endonucleases." *PLoS Genet* **8**(9): e1002979.
- Paro, R. und Hogness, D. S. (1991). "The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(1): 263-7.
- Parsons, C. A., Stasiak, A., Bennett, R. J. und West, S. C. (1995). "Structure of a multisubunit complex that promotes DNA branch migration." *Nature* **374**(6520): 375-8.
- Picksley, S. M., Parsons, C. A., Kemper, B. und West, S. C. (1990). "Cleavage specificity of bacteriophage T4 endonuclease VII and bacteriophage T7 endonuclease I on synthetic branch migratable Holliday junctions." *J Mol Biol* **212**(4): 723-35.
- Pöhler, J. R., Duckett, D. R. und Lilley, D. M. J. (1994). "Structure of four-way DNA junctions containing a nick in one strand." *J Mol Biol* **238**(1): 62-74.
- Pöhler, J. R., Giraud-Panis, M. J. und Lilley, D. M. (1996). "T4 endonuclease VII selects and alters the structure of the four-way DNA junction; binding of a resolution-defective mutant enzyme." *J Mol Biol* **260**(5): 678-96.
- Potter, H. und Dressler, D. (1977). "On the mechanism of genetic recombination: the maturation of recombination intermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(10): 4168-72.
- Pottmeyer, S. und Kemper, B. (1992). "T4 Endonuclease-Vii Resolves Cruciform DNA with Nick and Counter-Nick and Its Activity Is Directed by Local Nucleotide-Sequence." *J Mol Biol* **223**(3): 607-615.
- Puchta, H. (1999). "Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells." *Genetics* **152**(3): 1173-81.
- Rass, U., Compton, S. A., Matos, J., Singleton, M. R., Ip, S. C., Blanco, M. G., Griffith, J. D. und West, S. C. (2010).

- "Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein." *Genes Dev* **24**(14): 1559-69.
- Sadowski, P. D. (1971). "Bacteriophage T7 endonuclease. I. Properties of the enzyme purified from T7 phage-infected *Escherichia coli* B." *J Biol Chem* **246**(1): 209-16.
- Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Hamada, K., Okada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H. und Hakoshima, T. (2005). "Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA." *EMBO J* **24**(4): 683-93.
- Sargent, R. G., Brenneman, M. A. und Wilson, J. H. (1997). "Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination." *Mol Cell Biol* **17**(1): 267-77.
- Schärer, O. D. (2008). "XPG: its products and biological roles." *Adv Exp Med Biol* **637**: 83-92.
- Schofield, M. J., Lilley, D. M. und White, M. F. (1998). "Dissection of the sequence specificity of the Holliday junction endonuclease CCE1." *Biochemistry* **37**(21): 7733-40.
- Schwacha, A. und Kleckner, N. (1995). "Identification of Double Holliday Junctions as Intermediates in Meiotic Recombination." *Cell* **83**(5): 783-791.
- Schwartz, E. K. und Heyer, W. D. (2011). "Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes." *Chromosoma* **120**(2): 109-27.
- Seeliger, K. (2011). "Untersuchungen zur meiotischen und somatischen Rekombination in Pflanzen." *Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*. Dissertation.
- Shah, R., Bennett, R. J. und West, S. C. (1994). "Genetic recombination in *E. coli*: RuvC protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots in vitro." *Cell* **79**(5): 853-64.
- Shah, R., Cosstick, R. und West, S. C. (1997). "The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts." *Embo Journal* **16**(6): 1464-1472.
- Sharples, G. J., Benson, F. E., Illing, G. T. und Lloyd, R. G. (1990). "Molecular and functional analysis of the *ruv* region of *Escherichia coli* K-12 reveals three genes involved in DNA repair and recombination." *Mol Gen Genet* **221**(2): 219-26.
- Shen, B., Nolan, J. P., Sklar, L. A. und Park, M. S. (1996). "Essential amino acids for substrate binding and catalysis of human flap endonuclease 1." *J Biol Chem* **271**(16): 9173-6.
- Shen, B., Nolan, J. P., Sklar, L. A. und Park, M. S. (1997). "Functional analysis of point mutations in human flap endonuclease-1 active site." *Nucleic Acids Res* **25**(16): 3332-8.
- Shida, T., Iwasaki, H., Saito, A., Kyogoku, Y. und Shinagawa, H. (1996). "Analysis of substrate specificity of the RuvC holliday junction resolvase with synthetic Holliday junctions." *J Biol Chem* **271**(42): 26105-9.
- Siebert, R. und Puchta, H. (2002). "Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome." *Plant Cell* **14**(5): 1121-31.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S. und Wigley, D. B. (2007). "Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases." *Annu Rev Biochem* **76**: 23-50.
- Smith, C. E., Llorente, B. und Symington, L. S. (2007). "Template switching during break-induced replication." *Nature* **447**(7140): 102-5.
- Smothers, J. F. und Henikoff, S. (2000). "The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer." *Curr Biol* **10**(1): 27-30.
- Sun, B., Hong, J., Zhang, P., Dong, X., Shen, X., Lin, D. und Ding, J. (2008). "Molecular basis of the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Eaf3 chromo domain with methylated H3K36." *J Biol Chem* **283**(52): 36504-12.
- Symington, L. S. und Kolodner, R. (1985). "Partial purification of an enzyme from *Saccharomyces cerevisiae* that cleaves Holliday junctions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(21): 7247-51.
- Symington, L. S. und Gautier, J. (2011). "Double-strand break end resection and repair pathway choice." *Annu Rev Genet* **45**: 247-71.
- Szostak, J. W., Orrweaver, T. L., Rothstein, R. J. und Stahl, F. W. (1983). "The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination." *Cell* **33**(1): 25-35.
- Tay, Y. D. und Wu, L. (2010). "Overlapping roles for Yen1 and Mus81 in cellular Holliday junction processing." *J Biol Chem* **285**(15): 11427-32.
- Tran, P. T., Erdeniz, N., Symington, L. S. und Liskay, R. M. (2004). "EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease." *DNA Repair (Amst)* **3**(12): 1549-59.
- Tsujimoto, Y. und Ogawa, H. (1978). "Intermediates in genetic recombination of bacteriophage T7 DNA. Biological activity and the roles of gene 3 and gene 5." *J Mol Biol* **125**(3): 255-73.
- Tsutakawa, S. E., Classen, S., Chapados, B. R., Arvai, A. S., Finger, L. D., Guenther, G., Tomlinson, C. G., Thompson, P., Sarker, A. H., Shen, B., Cooper, P. K., Grasby, J. A. und Tainer, J. A. (2011). "Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily." *Cell* **145**(2): 198-211.

- Tsutakawa, S. E. und Tainer, J. A. (2012). "Double strand binding-single strand incision mechanism for human flap endonuclease: implications for the superfamily." *Mech Ageing Dev* **133**(4): 195-202.
- Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M. und Taylor, R. W. (2010). "Mitochondrial DNA mutations and human disease." *Biochim Biophys Acta* **1797**(2): 113-28.
- Turnbull, C., Hines, S., Renwick, A., Hughes, D., Pernet, D., Elliott, A., Seal, S., Warren-Perry, M., Gareth Evans, D., Eccles, D., Stratton, M. R. und Rahman, N. (2010). "Mutation and association analysis of GEN1 in breast cancer susceptibility." *Breast Cancer Res Treat* **124**(1): 283-8.
- Tuteja, N., Singh, M. B., Misra, M. K., Bhalla, P. L. und Tuteja, R. (2001). "Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**(4): 337-97.
- Unk, I., Hajdu, I., Blastyak, A. und Haracska, L. (2010). "Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLF and SHPRH in DNA damage tolerance." *DNA Repair (Amst)* **9**(3): 257-67.
- von Kitzing, E., Lilley, D. M. und Diekmann, S. (1990). "The stereochemistry of a four-way DNA junction: a theoretical study." *Nucleic Acids Res* **18**(9): 2671-83.
- Waldman, A. S. und Liskay, R. M. (1988). "Resolution of synthetic Holliday structures by an extract of human cells." *Nucleic Acids Res* **16**(21): 10249-66.
- Wallace, D. C. (1992). "Diseases of the mitochondrial DNA." *Annu Rev Biochem* **61**: 1175-212.
- Wang, X., Ira, G., Tercero, J. A., Holmes, A. M., Diffley, J. F. und Haber, J. E. (2004). "Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **24**(16): 6891-9.
- West, S. C. (1997). "Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins." *Annu Rev Genet* **31**: 213-44.
- West, S. C. (2009). "The search for a human Holliday junction resolvase." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 3): 519-26.
- Whitby, M. C. und Dixon, J. (1997). "A new Holliday junction resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe* that is homologous to CCE1 from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **272**(4): 509-522.
- 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.
- White, M. F. und Lilley, D. M. (1996). "The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **257**(2): 330-41.
- White, M. F. und Lilley, D. M. (1997a). "The resolving enzyme CCE1 of yeast opens the structure of the four-way DNA junction." *J Mol Biol* **266**(1): 122-34.
- White, M. F. und Lilley, D. M. (1997b). "Characterization of a Holliday junction-resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6465-71.
- White, M. F. und Lilley, D. M. (1998). "Interaction of the resolving enzyme YDC2 with the four-way DNA junction." *Nucleic Acids Res* **26**(24): 5609-16.
- Wilson, T. E. (2007). Nonhomologous End-Joining: Mechanisms, Conservation and Relationship to Illegitimate Recombination. In: *Molecular Genetics of Recombination*. Heidelberg, Springer. **17**: 487-513.
- Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R. J., Shen, D., Boca, S. M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, J. K., Sukumar, S., Polyak, K., Park, B. H., Pethiyagoda, C. L., Pant, P. V., Ballinger, D. G., Sparks, A. B., Hartigan, J., Smith, D. R., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, S. D., Parmigiani, G., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E. und Vogelstein, B. (2007). "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science* **318**(5853): 1108-13.
- Wright, P. E. und Dyson, H. J. (1999). "Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm." *J Mol Biol* **293**(2): 321-31.
- Yang, Y., Ishino, S., Yamagami, T., Kumamaru, T., Satoh, H. und Ishino, Y. (2012). "The OsGEN-L protein from *Oryza sativa* possesses Holliday junction resolvase activity as well as 5'-flap endonuclease activity." *J Biochem* **151**(3): 317-27.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y. und Hunter, N. (2012). "Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase." *Cell* **149**(2): 334-47.
- Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C. D. und Eissenberg, J. C. (2000). "Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro." *J Biol Chem* **275**(36): 28332-8.
- Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. und Ira, G. (2008). "Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends." *Cell* **134**(6): 981-94.

9. Anhang

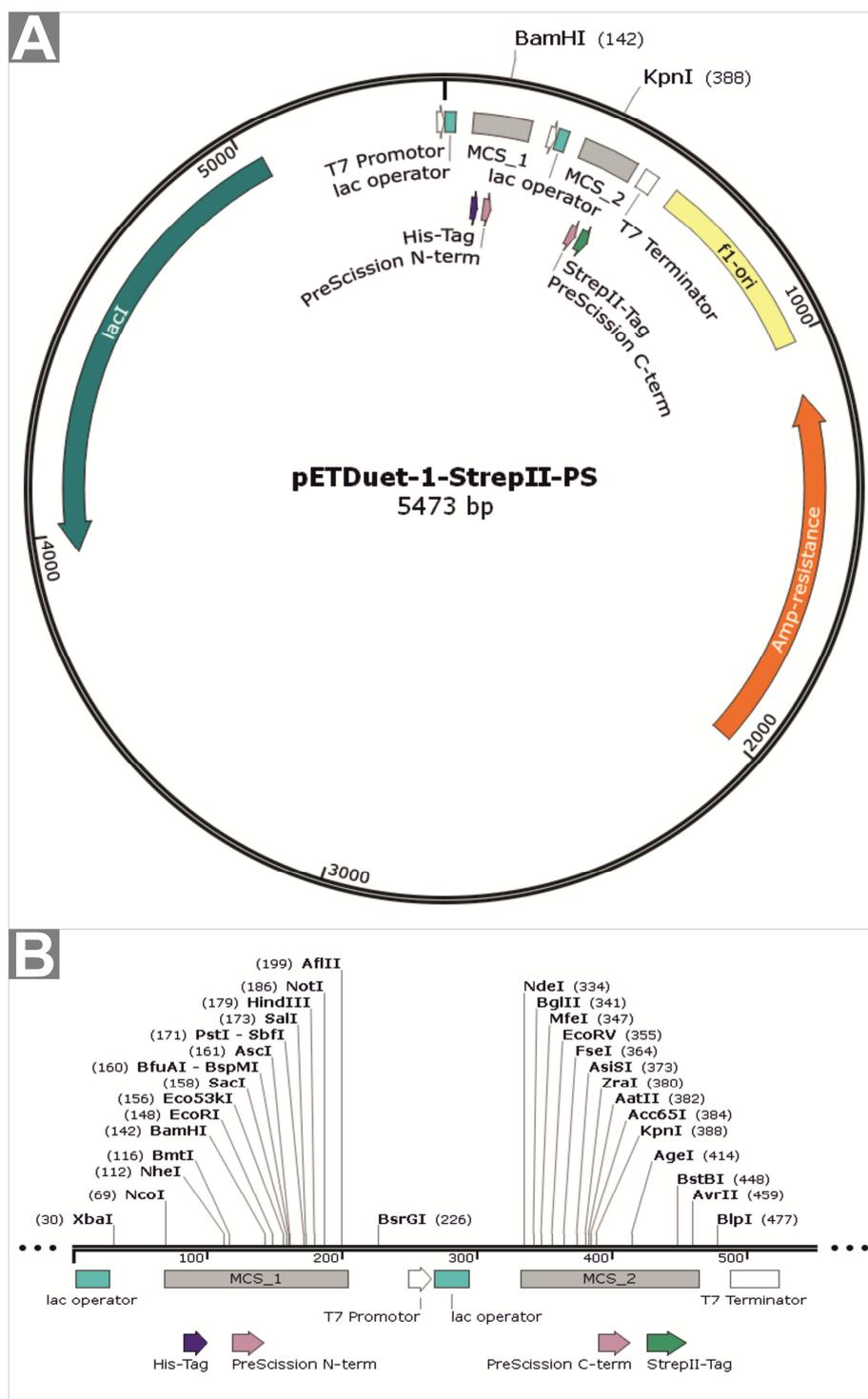


Abbildung 9.1: pETDuet1-StrepII-PS Vektorkarte

A: Gezeigt ist die Vektorkarte des Expressionsvektors pETDuet1-StrepII-PS, der in dieser Arbeit kloniert wurde. Er bietet die Möglichkeit rekombinante Proteine mit N-terminalen His-Tag und C-terminalem StrepII-Tag oder einem der beiden zu klonieren. Beide Tags können mit oder ohne der Erkennungssequenz für die PreScission Protease kloniert werden (PCS, siehe B). Die Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI wurden in dieser Arbeit für die Klonierungen verwendet. **B:** Übersicht über die beiden *multiple cloning sites* (MCS), die Organisation derer Elemente und die verfügbaren *single cutter* Restriktionsschnittstellen. Die Erkennungssequenz für NheI wurde zusammen mit der N-terminalen PCS eingebracht. Erstellt mit SnapGene.

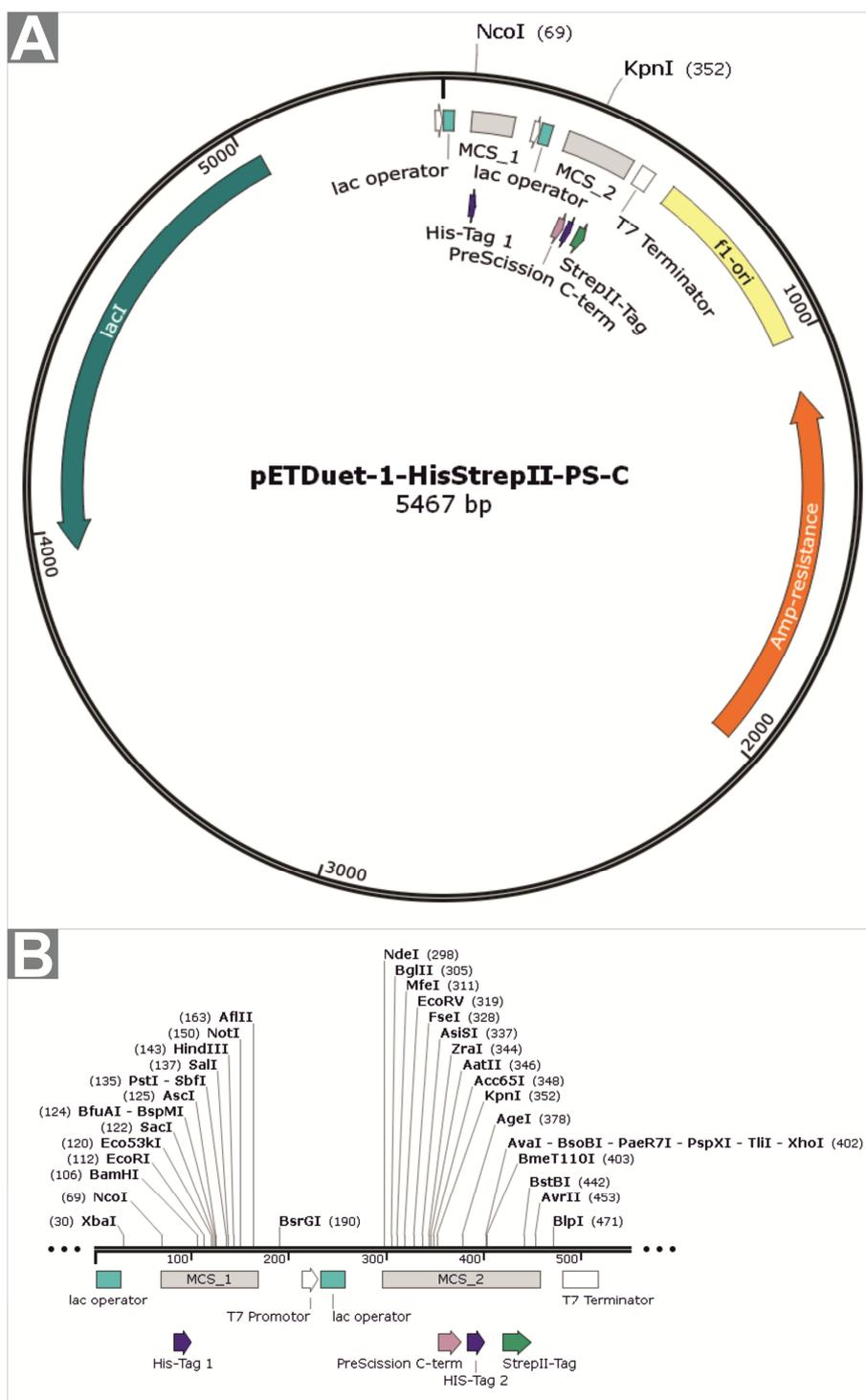


Abbildung 9.2: pETDuet1-HisStrepII-PS-C Vektorkarte

A: Gezeigt ist die Vektorkarte des Expressionsvektors pETDuet1-HisStrepII-PS, der in dieser Arbeit kloniert wurde. Über die Restriktionsschnittstellen NcoI und KpnI wurden die Zielgen-ORFs einkloniert, was in rekombinanten Proteinen mit natürlichen N-Terminus und C-terminalem His- und StrepII-Tag resultierte. Beide Tags sind durch die Erkennungssequenz für die PreScission Protease vom ORF getrennt. **B:** Übersicht über die beiden *multiple cloning sites* (MCS), die Organisation derer Elemente und die verfügbaren *single cutter* Restriktionsschnittstellen. Die Erkennungssequenz für Agel würde zusammen mit der codierenden Sequenz für den C-terminalen His-Tag neu eingebracht. Erstellt mit SnapGene.

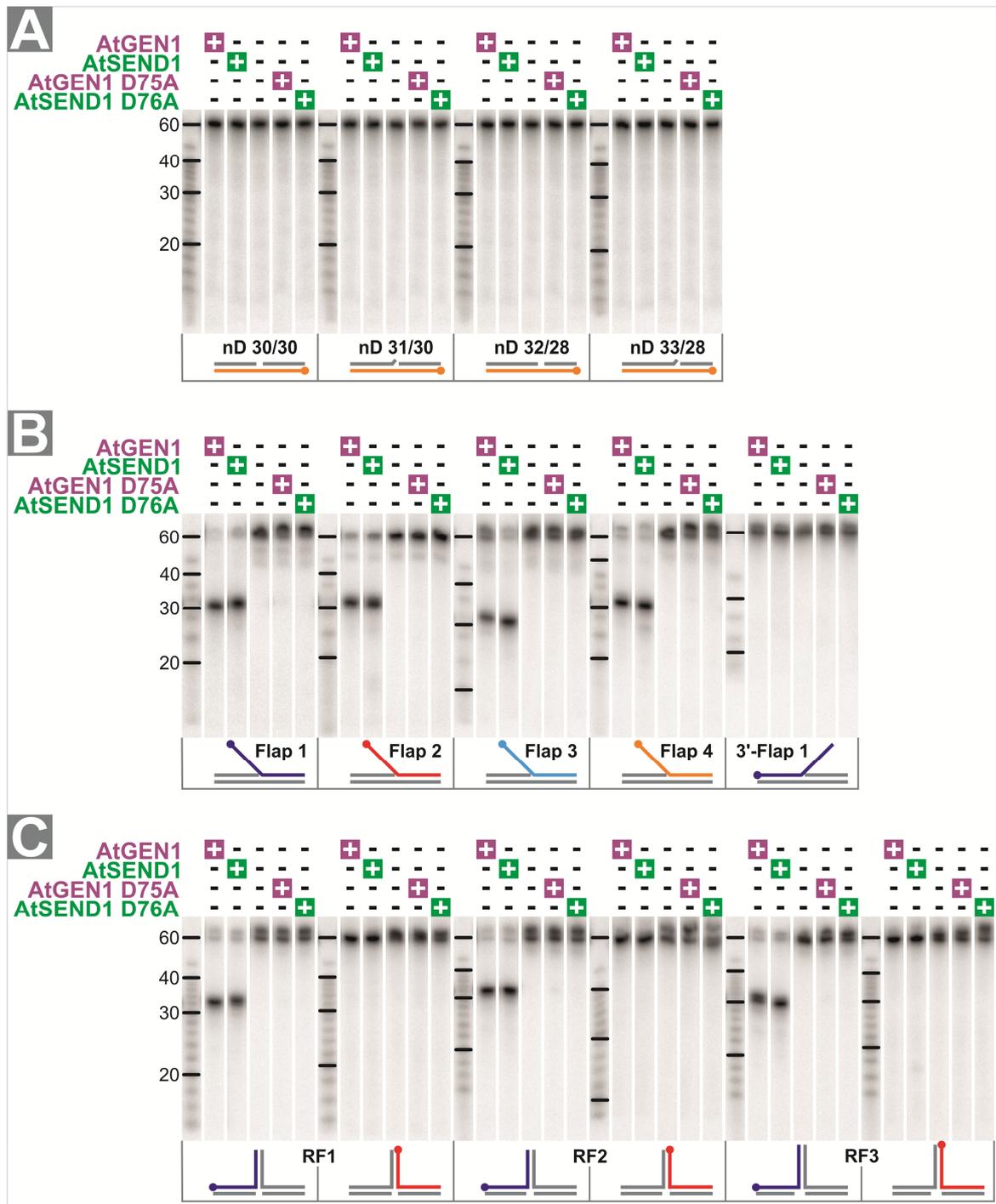


Abbildung 9.3: Übersicht der Negativkontrollen – 1

Gezeigt sind die AS-Austauschproteine AtGEN1 D75A und AtSEND1 D76A im Vergleich mit WT-Proteinen und Pufferkontrolle an **A**: genickten Duplices, **B**: Flap-Substraten und **C**: Replikationsgabeln. Die gezeigten Proben stammen aus den selben Ansätzen bzw. Experimenten wie die im Ergebnisteil präsentierten Proben, aufgetrennt über 20 %-7 M-Urea-TBE-PAGE Whatmangle. Die Autoradiogramme sind gammaverstärkt (Faktor 2,3 in AIDA) dargestellt, wodurch schwache Signale im Vergleich zu intensiven Signalen stärker hervorgehoben werden. Demnach besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Signalstärken in den gezeigten Aufnahmen.

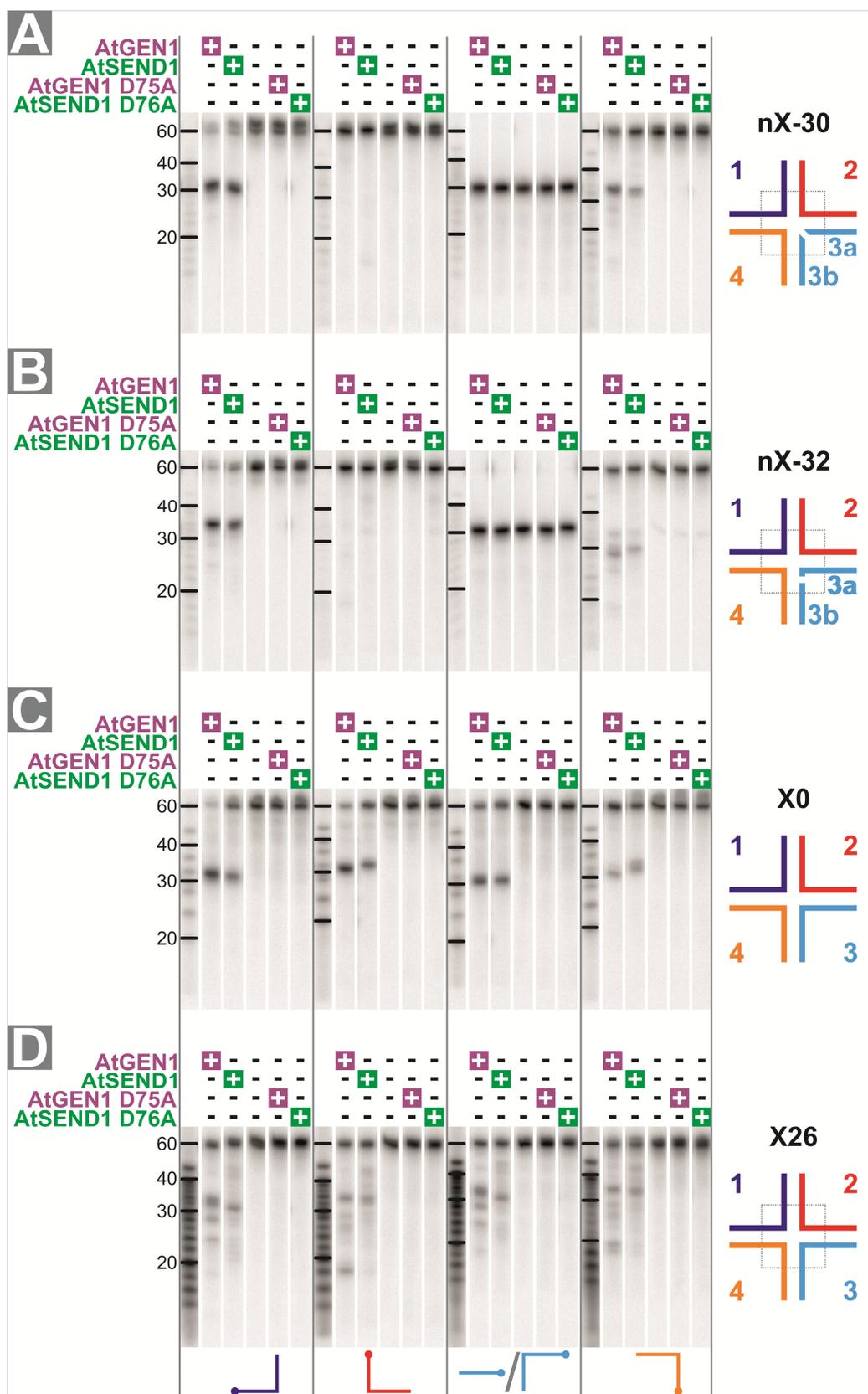


Abbildung 9.4: Übersicht der Negativkontrollen – 2 (HJs)

Gezeigt sind die AS-Austauschproteine AtGEN1 D75A und AtSEND1 D76A im Vergleich mit WT-Proteinen und Pufferkontrolle an den getesteten verschiedenen Modell-HJs. Die gezeigten Proben stammen aus den selben Ansätzen bzw. Experimenten wie die im Ergebnisteil präsentierten Proben, aufgetrennt über 20 %-7 M-Urea-TBE-PAGE Whatmangle. Die Autoradiogramme sind gammaverstärkt (Faktor 2,3 in AIDA) dargestellt, wodurch schwache Signale im Vergleich zu intensiven Signalen stärker hervorgehoben werden. Demnach besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Signalstärken in den gezeigten Aufnahmen.

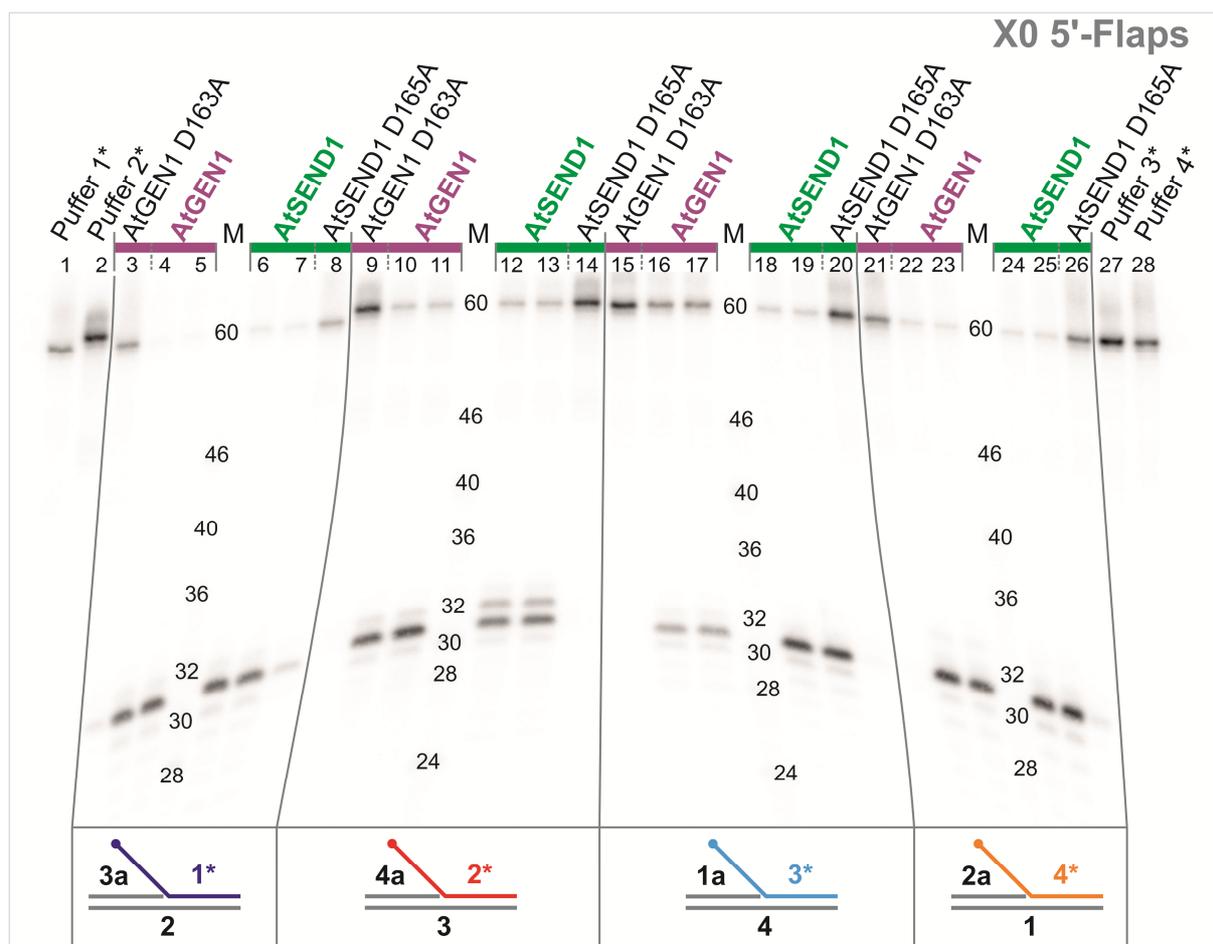


Abbildung 9.5: Schnittstellenbestimmung an X0-5'-Flaps

Gezeigt ist das Autoradiogramm der Schnittmusterbestimmung der vier 5'-Flap-Substrate, basierend auf der X0-HJ. Der Hauptschnitt von AtGEN1 ist in allen Substraten an Position 31 (31 nt lange Produkte), während AtSEND1 zusätzlich am 5'-Flap2 ein 32 nt-Produkt erzeugt. AtGEN1 zeigt am 5'-Flap3 eine niedrigere Aktivität als an 1, 2 und 4; AtSEND1 ist an 5'-Flap2 etwas weniger aktiv als an den übrigen Substraten. Die AS-Austauschproteine AtGEN1 D163A und AtSEND1 D165A zeigen am 5'-Flap1 (und AtSEND1 D165A zusätzlich an 5'-Flap4) eine schwache Aktivität mit dem gleichen Hauptschnittprodukt wie AtGEN1 bzw. AtSEND1. M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge. Die Markerbanden selbst sind in der hier gezeigten linearen Darstellung auf Grund ihrer schwachen Markierung nicht sichtbar.

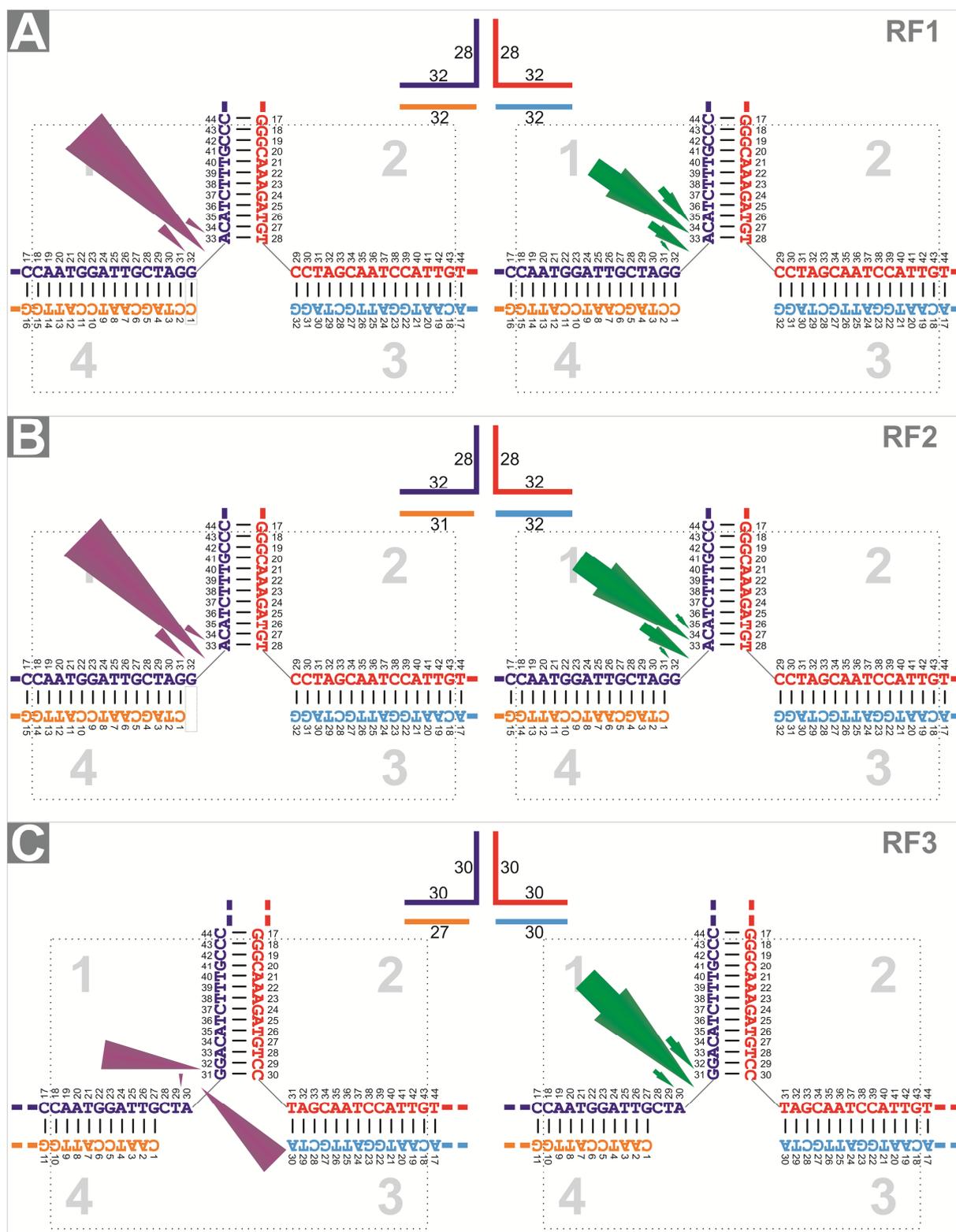


Abbildung 9.6: Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 an den X26-RFs

Gezeigt sind Struktur und Sequenzkontext der RF-Substrate. Die gepunkteten Linien zeigen den homologen Kernbereich an. Lila Pfeile symbolisieren die Schnittpositionen von AtGEN1, grüne Pfeile die von AtSEND1. Die Größe der Pfeile entspricht dem Anteil des Produkts am Gesamtsignal, also der Gesamtmenge an DNA (Substrat und Produkte, Werte in den Diagrammen in Abbildung 3.11). Es werden nur Schnittpositionen gezeigt, die mehr als 5 % am Gesamtprodukt ausmachen. **A:** Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 an der RF1 mit zwei 32 bp Armen und einem 28 bp Arm. **B:** Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 an der RF2. Die RF2 weist im Gegensatz zur RF1 eine 1 nt Einzelstranglücke im Folgestrang auf (grauer Kasten in A und B). **C:** Schnittmuster von AtGEN1 und AtSEND1 an der RF3 mit 30 bp Armen und einer Einzelstranglücke von 3 nt im Folgestrang.

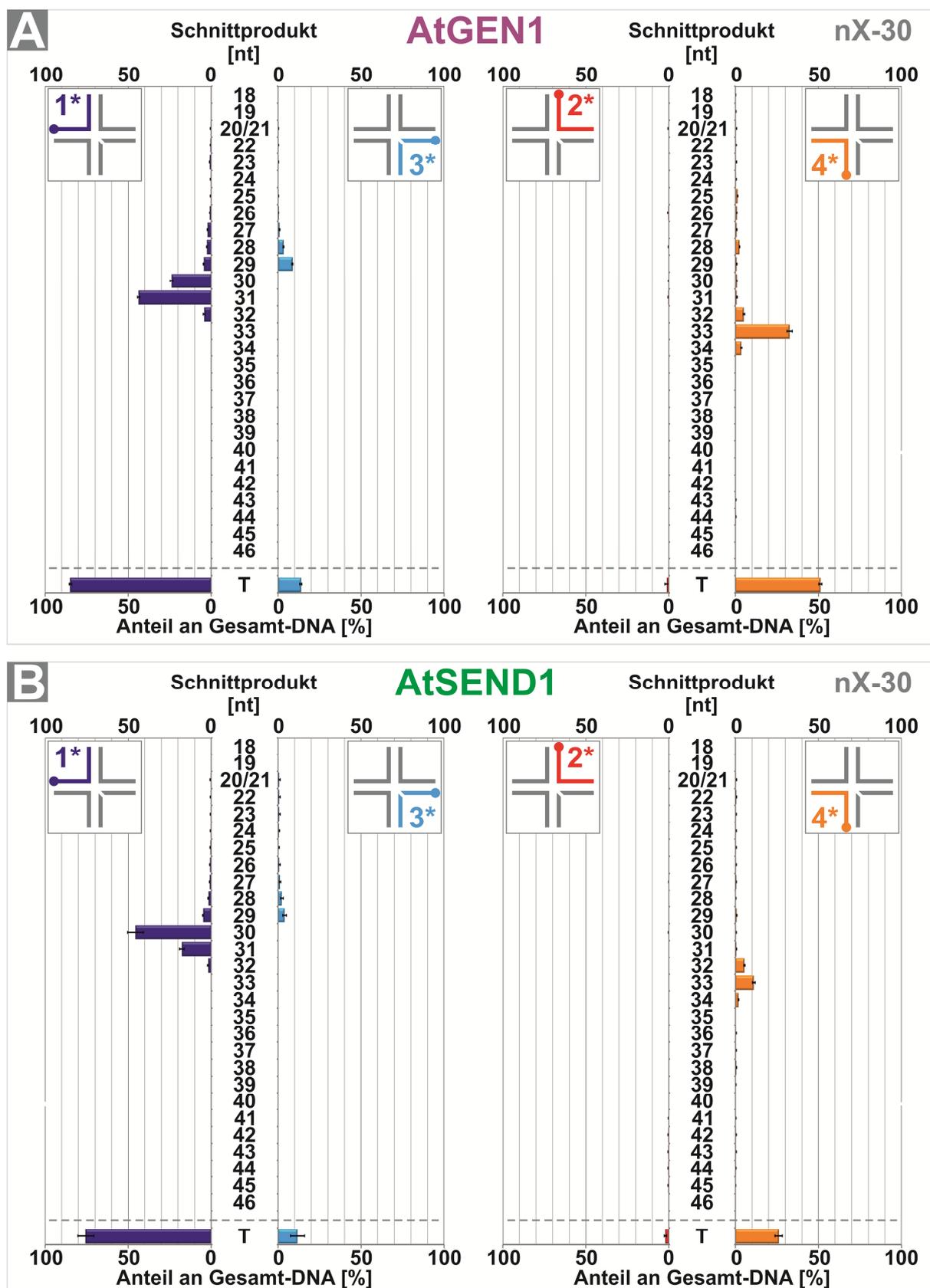


Abbildung 9.7: Quantifizierung der Schnittprodukte an der nX-30 – vollständiger Datensatz

Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte von AtGEN1 und AtSEND1 an den Strängen 1 – 4 der nX-30. Es werden alle im Sequenziergel unterscheidbaren Schnittprodukte 18 bis 46 nt gezeigt. T = Summe der Anteile aller Produkte am Gesamtsignal [%]

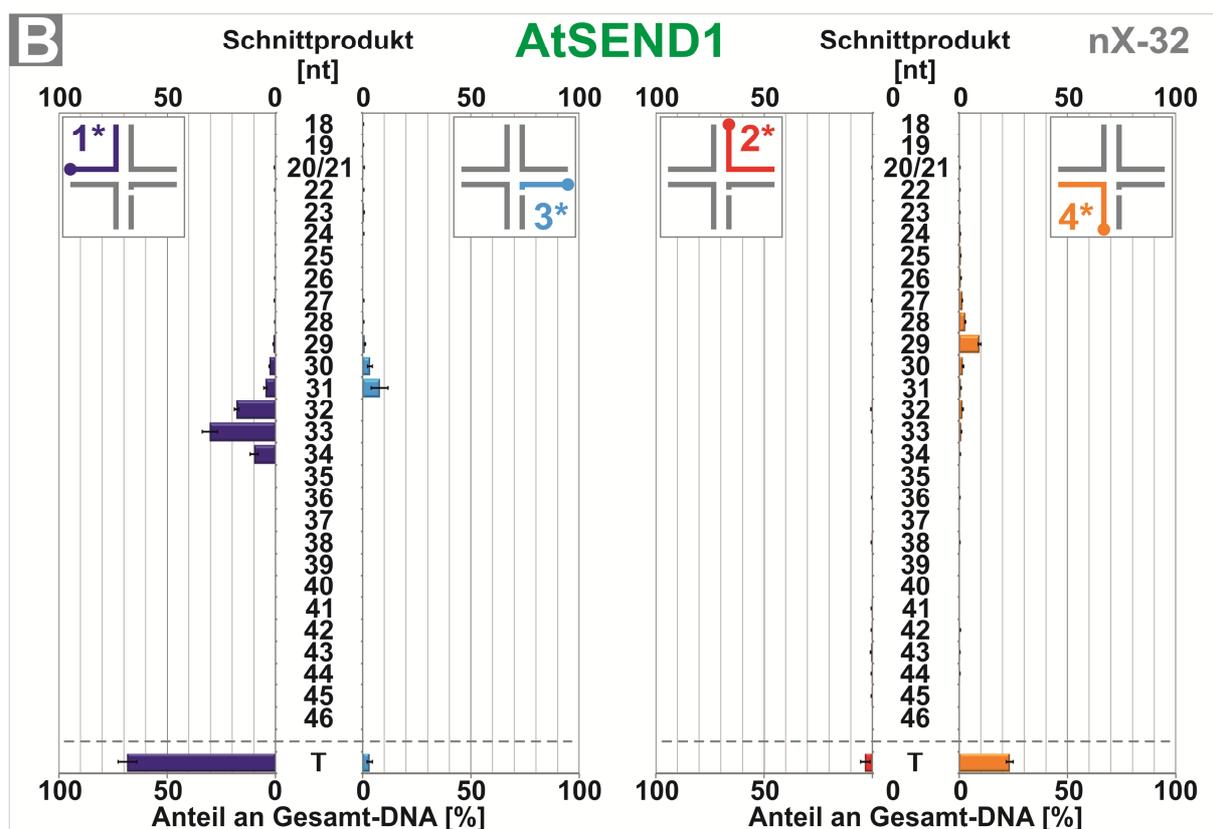
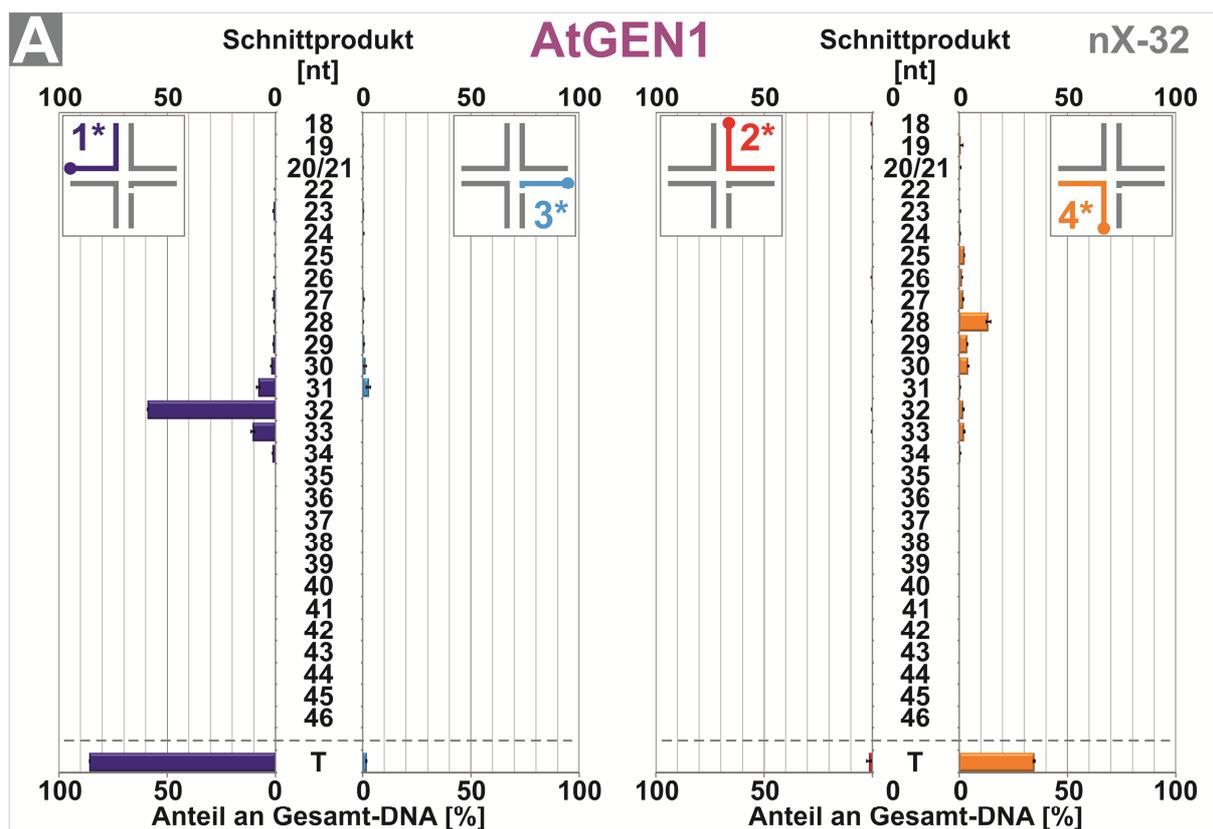


Abbildung 9.8: Quantifizierung der Schnittprodukte an der nX-32 – vollständiger Datensatz

Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte von AtGEN1 und AtSEND1 an den Strängen 1 – 4 der nX-32. Es werden alle im Sequenziergel unterscheidbaren Schnittprodukte 18 bis 46 nt gezeigt. T = Summe der Anteile aller Produkte am Gesamtsignal [%]

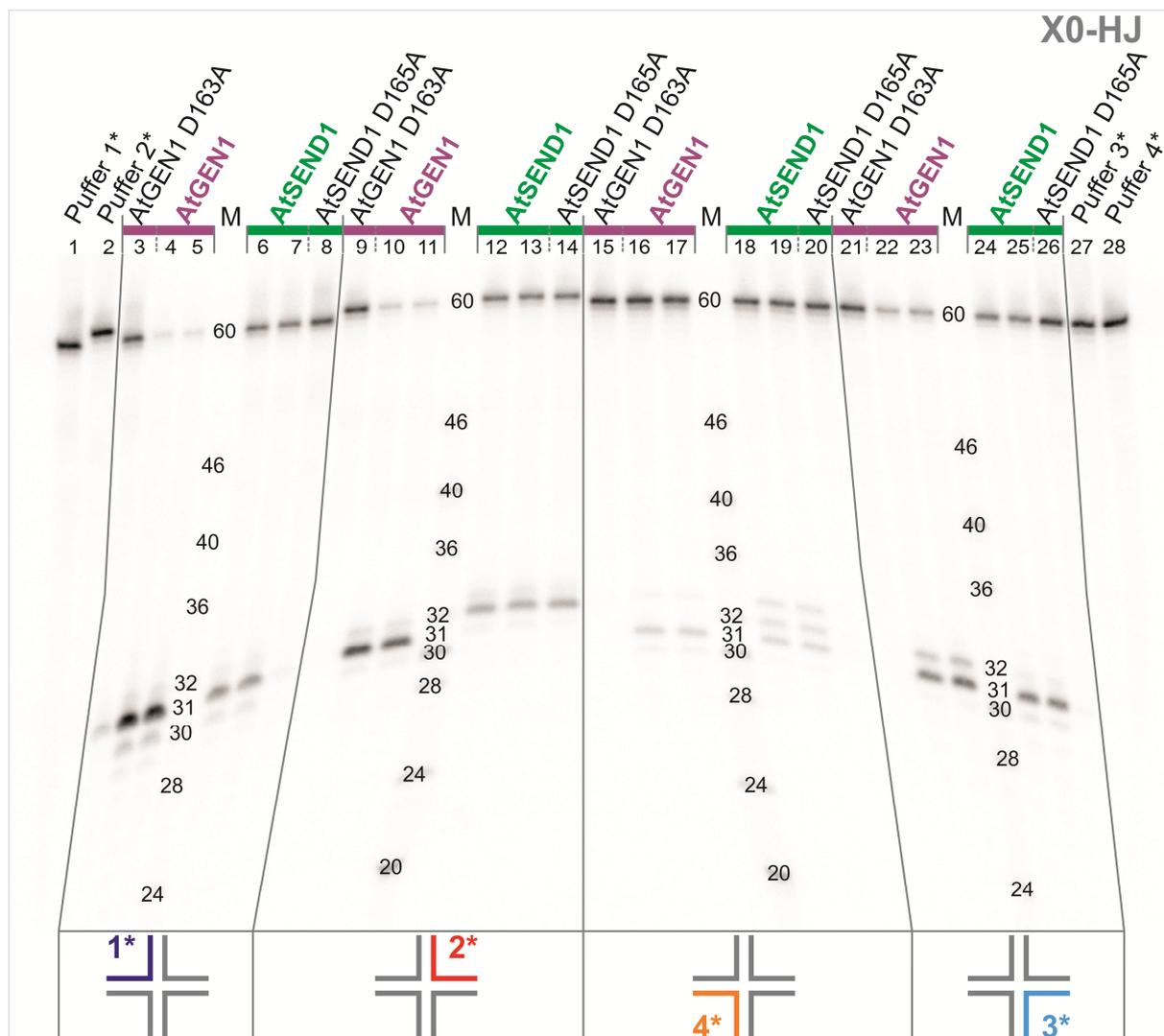


Abbildung 9.9: Schnittstellenbestimmung an X0-HJ

Gezeigt ist das Autoradiogramm der Schnittmusterbestimmung der statischen X0-HJ. AtGEN1 und AtSEND1 schneiden alle 4 Stränge bevorzugt 1 nt 3' des JP. Strang 4 wird von beiden Enzymen am uneffektivsten geschnitten, im Fall von AtSEND1 fächert das Schnittmuster zu drei Schnittpositionen auf. Die AS-Austauschproteine AtGEN1 D163A und AtSEND1 D165A zeigen in Strang 1 (AtSEND1 D165A auch in Strang 3) eine schwache Aktivität mit dem gleichen Hauptschnittprodukt von 31 nt wie AtGEN1 bzw. AtSEND1. M = Laufweite von Markeroligonukleotiden definierter Länge. Die Markerbanden selbst sind in der hier gezeigten linearen Darstellung auf Grund ihrer schwachen Markierung nicht sichtbar.

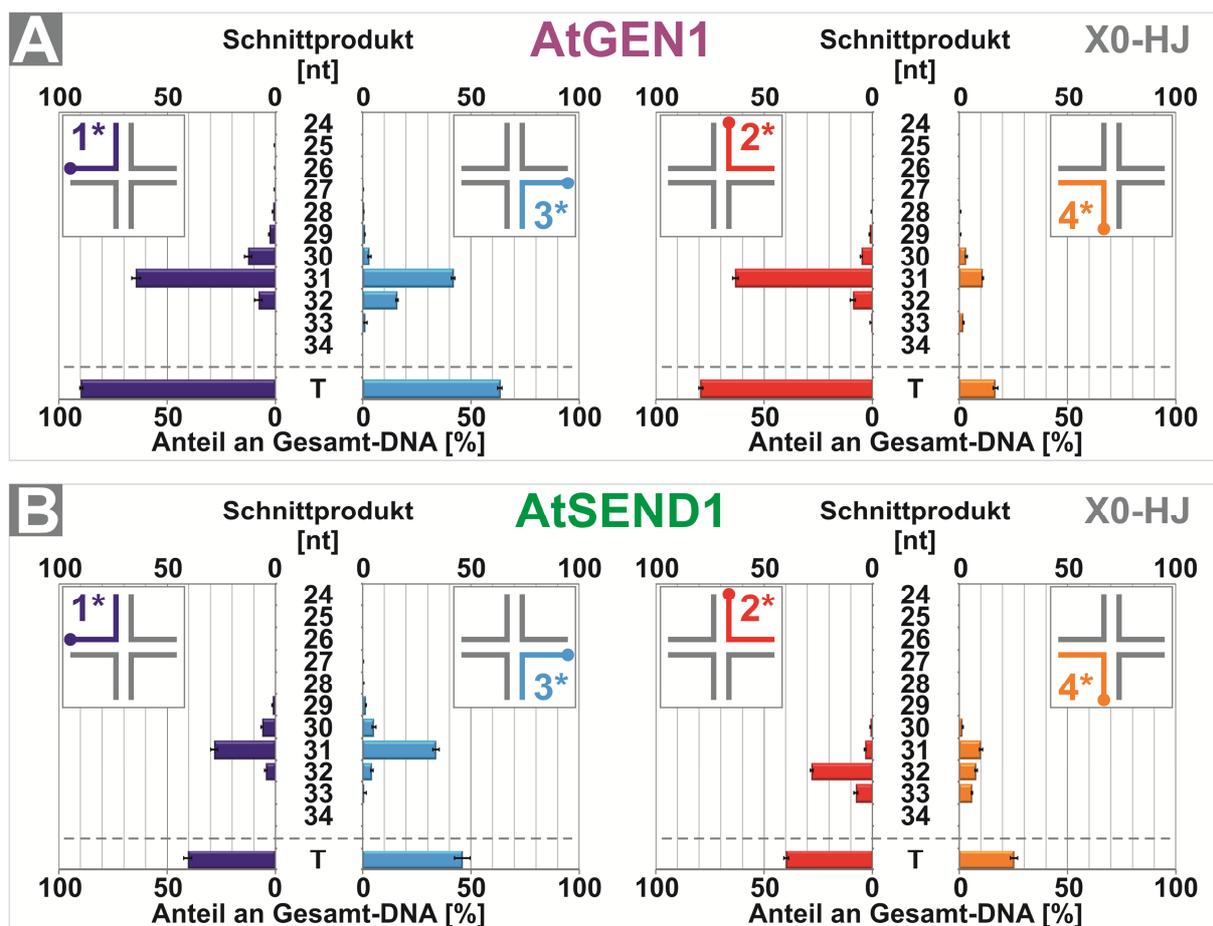


Abbildung 9.10: Quantifizierung der Schnittprodukte an der X0-HJ – vollständiger Datensatz

Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte von AtGEN1 und AtSEND1 an den Strängen 1 – 4 der statischen X0-HJ. Es wurden alle im Sequenziergel unter maximaler Gammaverstärkung erkennbaren Signale quantifiziert. T = Summe der Anteile aller Produkte am Gesamtsignal [%]

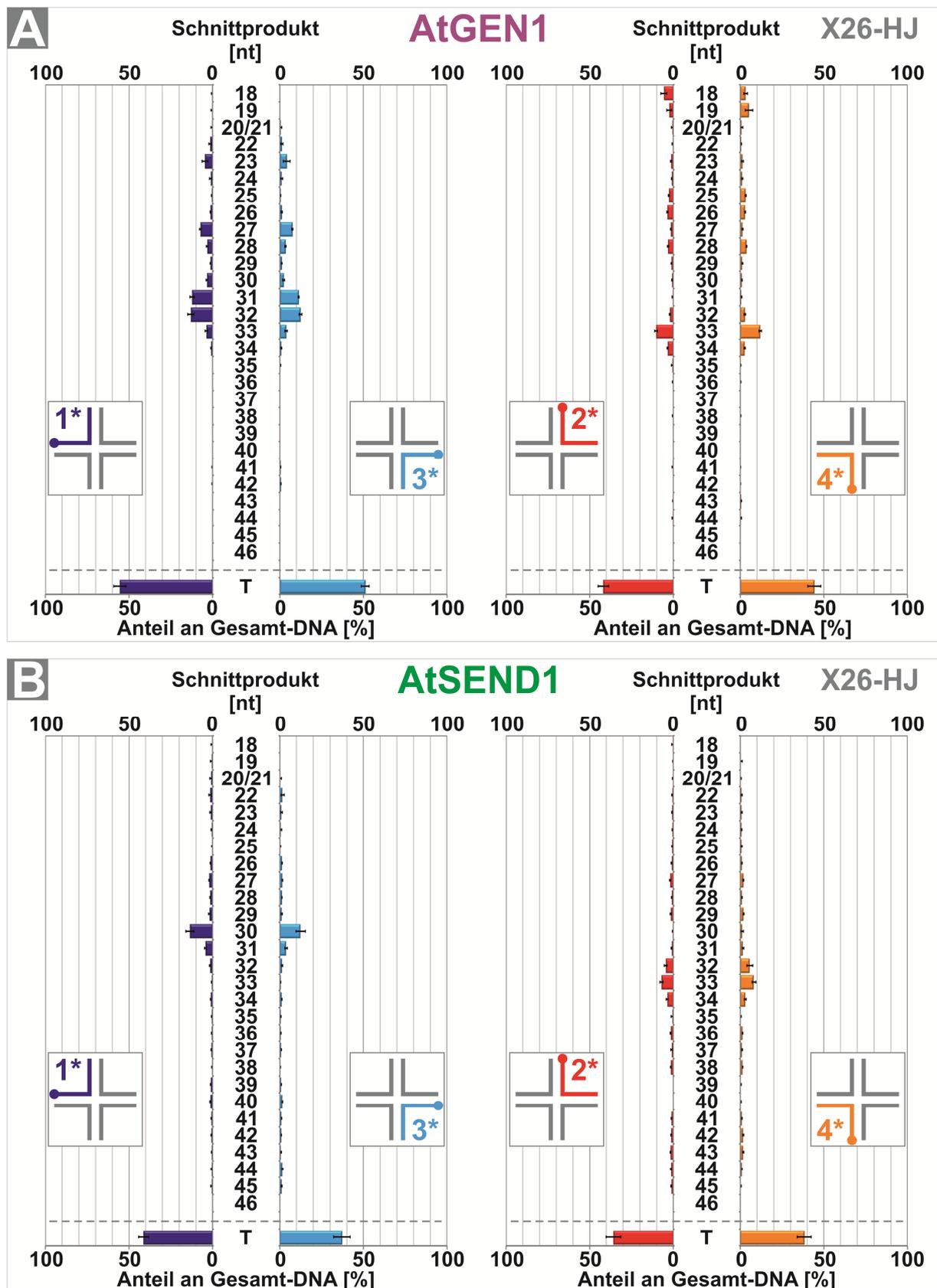


Abbildung 9.11: Quantifizierung der Schnittprodukte an der X26 – vollständiger Datensatz

Quantifizierung der einzelnen Schnittprodukte von AtGEN1 und AtSEND1 an den Strängen 1 – 4 der X26. Es werden alle im Sequenziergel unterscheidbaren Schnittprodukte 18 bis 46 nt gezeigt. T = Summe der Anteile aller Produkte am Gesamtsignal [%]

Publikationen

Knoll, A., Higgins, J. D., Seeliger, K., Reha, S. J., Dangel, N. J., Bauknecht, M., Schropfer, S., Franklin, F. C. und Puchta, H. (2012). „The Fanconi Anemia Ortholog FANCM Ensures Ordered Homologous Recombination in Both Somatic and Meiotic Cells in *Arabidopsis*.” Plant Cell, **24**(4):1448-64.

Erklärung

Die Experimente, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, wurden im Zeitraum vom Mai 2009 bis April 2013 am Botanischen Institut, Lehrstuhl II – Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen des Karlsruher Instituts für Technologie (ehemals Universität Karlsruhe (TH)) durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe alle Stellen, die dem Wort oder Inhalt nach aus anderen Werken stammen, durch die Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Des Weiteren habe ich die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 bzw. die der Universität Karlsruhe (TH) vom 15. Januar 2002 beachtet.

Ort, Datum

Markus Bauknecht