

Homologe archaeale Holliday-Struktur auflösende
Endonukleasen und ihre spezifischen Reaktionen
mit cruciformer DNA

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Klaus Neef

aus Jülich

2004

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Kemper
Prof. Dr. K. Schnetz

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Archaea	1
1.2	Rekombination	6
1.3	Struktur der cruciformen DNA	13
1.4	Ziel der Arbeit	17
2	Abkürzungen	18
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Chemikalien	21
3.1.1.1	Radioisotope	21
3.1.2	Enzyme und Proteine	21
3.1.3	Puffer und Lösungen	21
3.1.3.1	Lösungen für SDS-Gel Silberfärbungen	23
3.1.4	Kulturmedien	24
3.1.5	Bakterien- und Archaeen-Stämme	24
3.1.6	Bakteriophagen- / Viren-Stämme	24
3.1.7	DNA	25
3.1.7.1	Plasmide	25
3.1.7.2	Oligonukleotide	25
3.1.7.2.1	PCR-Primer	25
3.1.7.2.2	Substrate	27
3.1.8	Substrate	28
3.1.8.1	Synthetische cruciforme DNA	28
3.1.8.1.1	CFKla01	28
3.1.8.1.2	CFKla11	29
3.1.8.1.3	CFKla21	30
3.1.8.2	M13mp2IR62E-RF	31
3.1.9	Geräte und Apparaturen	32
3.1.10	Software	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Arbeiten mit DNA	33
3.2.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	33
3.2.1.2	Präparation von genomischer DNA	33
3.2.1.3	Präparation von Plasmid DNA	33
3.2.1.4	Fällung von DNA	33
3.2.1.5	Reinigung von DNA Oligonukleotiden	34
3.2.1.6	Radioaktive Endmarkierung von DNA Oligonukleotiden	34
3.2.1.7	Präparation von synthetischer cruciformer DNA	34
3.2.1.8	Präparation von M13mp2IR62E-RF DNA	35
3.2.1.9	PCR	35
3.2.1.9.1	Amplifikation der archaealen Hjc-Gene	35
3.2.1.9.2	Mutagenese der archaealen Hjc-Gene	36
3.2.1.10	DNA-Bandenelution	37

3.2.1.11	DNA-Sequenzierung	37
3.2.1.12	Restriktionsverdaus	38
3.2.1.13	Phosphorilierungen	38
3.2.1.14	Ligationen	38
3.2.2	Proteinreinigung	38
3.2.2.1	Reinigung nativer Hjcs	38
3.2.2.1.1	Polymin P-Fällung	38
3.2.2.1.2	Ammoniumsulfat-Fällung	38
3.2.2.1.3	Erhitzung	39
3.2.2.1.4	Hydroxyapatit-FPLC	39
3.2.2.2	Reinigung von Hjcs mit His-tag	39
3.2.2.2.1	Ni-NTA Spin-Säulen	39
3.2.2.2.2	Ni-NTA <i>Batch</i>	39
3.2.3	Arbeiten mit Proteinen	40
3.2.3.1	Überexpression in <i>E. coli</i>	40
3.2.3.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	40
3.2.3.3	Endonukleolytische Reaktionen	40
3.2.3.3.1	Nachweis der Aktivität	40
3.2.3.3.2	Bestimmung der Schnittpositionen	40
3.2.3.4	Dimerisierung	40
3.2.4	Gelelektrophoresen	41
3.2.4.1	DNA	41
3.2.4.1.1	PAA-Gelelektrophorese	41
3.2.4.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.4.2	Protein	42
3.2.4.2.1	SDS-PAA-Gelelektrophorese	42
3.2.5	Gelfärbung	42
3.2.5.1	Coomassie	42
3.2.5.2	Silberfärbung	42
3.2.6	Mikrobiologische Techniken	43
3.2.6.1	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	43
3.2.6.2	Transformationen	43
3.2.7	T4-Plaquetest	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Homologe X-Solvasen aus Archaeen	44
4.1.1	Identifikation und Sequenzvergleich	44
4.1.2	Klonierung der homologen archaealen Hjcs	48
4.1.3	Expression und Reinigung der rekombinanten Hjcs	50
4.1.4	Dimerbildung von Hjc	53
4.1.5	Endonukleolytische Aktivitäten der Hjcs mit cruciformer DNA	55
4.1.5.1	Cruciforme DNA CFKla11 mit fixiertem Kreuzungspunkt	57
4.1.5.2	Cruciforme DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt	60
4.2	Homologe Hjcs aus den archaealen Viren SIRV1 und SIRV2	64
4.2.1	Identifikation und Sequenzhomologie	64
4.2.2	Endonukleolytische Aktivität der viralen Hjcs mit cruciformer DNA	65
4.2.2.1	Cruciforme DNA CFKla11 mit fixiertem Kreuzungspunkt	65
4.2.2.2	Cruciforme DNA CFKla11 mit mobilem Kreuzungspunkt	67
4.2.2.3	Cruciforme DNA CFKla21 mit mobilem Kreuzungspunkt und Konsensus-Sequenz	68
4.3	Pfu-Afu-Hjc Chimären	70
4.3.1	Definition von DNA-Interaktions-Domänen	70

4.3.2	Mutagenese zur Konstruktion der chimären Hjcs	72
4.3.3	Reinigung von Hjcs mit C-terminalem <i>His-tag</i>	75
4.3.4	Endonukleolytische Aktivität der Hjc-Chimären	76
4.3.4.1	Cruciforme DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt	76
4.4	Komplementation von T4-Endonuklease VII mit archaealen Hjcs	79
5	<i>Diskussion</i>	83
5.1	Zelluläre archaeale Hjcs	83
5.2	Virale archaeale Hjcs	93
5.3	Komplementation von Endonuklease VII	97
5.4	Vorschläge für weiterführende Experimente	99
5.4.1	Zelluläre archaeale Hjcs	99
5.4.2	Virale Hjcs	100
5.4.3	Komplementation von Endonuklease VII	101
5.5	Ausblick	102
6	<i>Anhang</i>	104
6.1	Konformationsaufklärung von CFKla11	104
7	<i>Zusammenfassung</i>	106
8	<i>Abstract</i>	108
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	110

1 Einleitung

1.1 Archaea

Die Klassifizierung von Lebewesen (Taxonomie) ist ein grundlegendes Prinzip der Biologie und diente ursprünglich der Übersicht über die komplexe Vielfalt der belebten Welt. Die Einordnung von Arten in Gruppen, die sich durch bestimmte Merkmale unterscheiden und durch Abstufungen der Unterschiede dieser Merkmale, ließen ein hierarchisches System etablieren, das erstmals 1739 durch Carl von Linné konsequent niedergelegt wurde. Darwins Theorie zur Entstehung der Arten (1858) brachte die Erkenntnis, daß alle heute lebenden Arten Produkte eines historischen Entwicklungsprozesses und durch diesen in unterschiedlichem Maße miteinander verwandt sind. Bei Wahl geeigneter Merkmale können deren Unterschiede ein Maß für den Verwandtschaftsgrad der Arten sein. Die Klassifizierung stellt dann, neben der ursprünglich rein typologischen Katalogisierung, eine Ordnung nach stammesgeschichtlichen (phylogenetischen) Aspekten dar.

Seit der Entdeckung von Mikroorganismen durch von Leeuwenhoek (1673) wurden Kriterien zur Klassifizierung angelegt, die sich zunächst nur auf die äußere Form dieser Organismen bezogen (*cocci*: Kugeln; *bacilli*: Stäbchen). Später wurden auch ihre Lebens- und Ernährungsweisen, sowie ihre Stoffwechselprodukte als Unterscheidungsmerkmale mit herangezogen. Edouard Chatton führte 1937 die Einteilung aller zellulären Organismen in zwei fundamentale Gruppen ein: die Eukaryoten mit membranumbundenen Zellkern und die Prokaryoten ohne einen solchen Zellkern. Diese Klassifizierung geriet zunächst in Vergessenheit und wurde erst zwanzig Jahre später wieder aufgegriffen (Stanier and van Niel, 1962). Entdeckungen weiterer typischer Merkmale beider Gruppen unterstützten diese Unterscheidung. Dazu gehören vor allem die Kompartimentierung des Zellplasmas durch ein internes Membransystem und das Vorhandensein von endosymbiontisch entstandenen Organellen bei den Eukaryoten, sowie eine Vielzahl biochemischer und physiologischer Unterscheidungsmerkmale (zum Teil in Tabelle 1.1).

Die Klassifizierung von Organismen innerhalb der Gruppe der Prokaryoten basierte in der Folgezeit wieder hauptsächlich auf Morphologie, Lebensraum und

Metabolismus und führte, je nach herangezogenem Kriterium, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die Fortschritte der modernen Molekularbiologie, vor allem in der Bestimmung von DNA-Sequenzen, führten eine neue Methode zur phylogenetischen Klassifizierung ein. Grundlage war hier die Erkenntnis, daß die Sequenz der DNA einer bestimmten Art, als genetische Grundlage ihrer spezifischen Eigenschaften, die Geschichte ihrer evolutionären Entwicklung widerspiegelt. So sind Ähnlichkeiten und Unterschiede in der DNA-Sequenz ein Maß für den Grad der Verwandtschaft zwischen Arten (Zuckerkanndl and Pauling, 1965). Da aber nicht alle Bereiche der DNA einem gleichmäßigen und zwischen den Arten vergleichbaren Selektionsdruck unterliegen, mußte ein möglichst universell vorhandener und an grundlegenden Prozessen beteiligter DNA-Bereich ermittelt werden. Dieser fand sich in den Genen der rRNAs der Ribosomen, deren Funktion in allen Organismen mit der Proteinbiosynthese im Allgemeinen und nicht nur der bestimmter Proteine verbunden ist. Die rRNA-Sequenzen können also als eine Art molekularer Uhr der Evolution dienen. 1977 versuchte Carl Woese auf dieser Basis eine phylogenetische Klassifizierung von Arten aus den Reichen der Prokaryoten und Eukaryoten und kam zu dem überraschenden Ergebnis, daß sich neben den zwei erwarteten Übergruppen eine weitere Gruppe bildete, die bislang als methanogene Bakterien bezeichnet wurden. Diese Arten besaßen in etwa die gleiche phylogenetische Distanz zu den beiden klassischen Reichen (Woese and Fox, 1977). Diese Erkenntnis war die Grundlage der nicht unumstrittenen (Woese, 1998; Mayr, 1998), aber doch überwiegend akzeptierten, Einteilung allen Lebens in die drei Reiche *Eukarya*, *Eubacteria* und *Archaea* (Woese et al., 1990) (Abb. 1.1).

Diese Klassifizierung kann sich mittlerweile auf eine solide Basis an biochemischen, physiologischen und genomischen Daten stützen (Tab. 1.1). So zeigen die Archaeen neben Eigenschaften der Eubakterien, insbesondere durch ihren klar prokaryotischen Zellaufbau, auch typische Merkmale der Eukaryoten. Dazu gehören Ähnlichkeiten der archaealen zu den eukaryotischen Enzymen, die an den informationsverarbeitenden Prozessen (DNA-Replikation, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination und Transkription) beteiligt sind. Aber auch der Aufbau der Ribosomen (trotz 70S) mit Resistenzen gegenüber einigen translationshemmenden Antibiotika gehört dazu. Es gibt jedoch auch exklusiv archaeale Merkmale, wie den einzigartigen Aufbau ihrer Zellmembran auf Basis von Phospholipiden mit

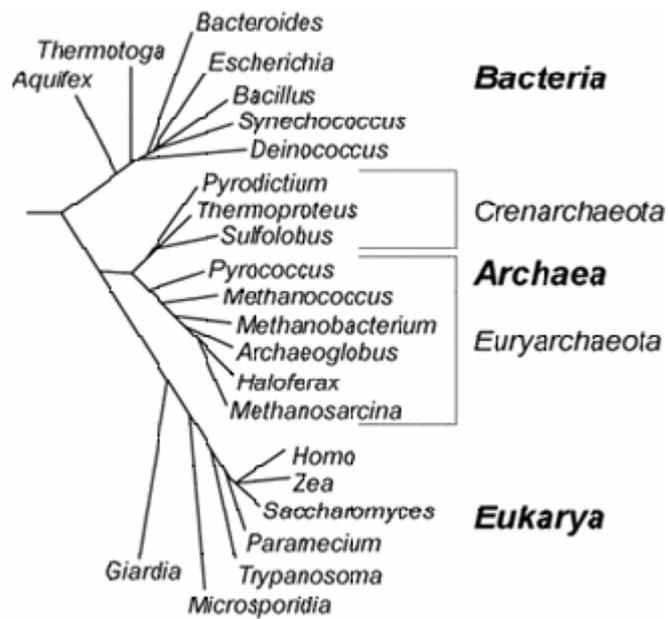


Abb. 1.1, Phylogenetischer Stammbaum der drei Reiche des Lebens. Erstellt auf Basis von 16S-rRNA-Sequenz Vergleichen.

verzweigten Fettsäuren auf Isoprenoid-Basis die über Etherbindungen verknüpft sind, sowie den Aufbau archaealer Zellwände. Die Parallelen der Archaeen zu den beiden anderen Reichen spiegeln sich auch in Übereinstimmungen bei Vergleichen gesamter Genome wieder, die eine etwas engere Verwandtschaft der Archaeen zu den Eukaryoten ergeben (Graham et al., 2000; Makarova and Koonin, 2003). Die phylogenetischen Positionen der drei Reiche zueinander sind immer noch umstritten, wobei gesamtgenomische Vergleiche durch den Nachweis horizontalen Gentransfers erschwert werden (Garcia-Vallve et al., 2000; Koonin et al., 2001).

Übereinstimmende Merkmale zwischen Eukaryoten und Archaeen legen eine Entstehung der Eukaryoten aus einer endosymbiontischen Verbindung von Archaeen und Bakterien nahe, was durch aktuelle Daten gestützt wird (Hartman and Fedorov, 2002; Horiike et al., 2001; Martin and Muller, 1998; Dacks and Doolittle, 2001).

Innerhalb des Reiches der *Archaea* lassen sich auf der Basis von 16S-rRNA-Sequenzen vier Stämme (*phyla*) unterscheiden: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* (Woese et al., 1990), *Korarchaeota* (Barns et al., 1994; Burggraf et al., 1997) und *Nanoarchaeota* (Huber et al., 2002). Die *Korarchaeota* konnten bislang nur auf Grund ihrer typischen RNA-Sequenzen identifiziert, aber noch nicht kultiviert werden. Bei

den *Nanoarchaeota* gelang dies nur in kombinierten Kulturen als Parasit oder Symbiont des Crenarchaeons *Ignicoccus*.

Typisch für die Archaeen ist die Anpassung an extreme Lebensräume, der sie ihren Namen als ursprüngliche Organismen verdanken. Sie existieren unter Bedingungen, die denen der frühen Erde bei der Entstehung des Lebens ähneln (Di Giulio, 2000; Forterre et al., 1992). Es lassen sich jedoch zunehmend mesophile Archaeen aus gemäßigten Lebensräumen nachweisen, so daß die Annahme einer überwiegenden und ursprünglich extremophilen Lebensweisen der Archaeen in Frage gestellt wird (DeLong, 1998; DeLong, 2001). Außerdem spricht ihre Position in phylogenetischen Stammbäumen (meistens als Verzweigung mit einem gemeinsamen eukaryotischen Vorfahren) gegen die Idee der Urzelle mit archaealem Charakter (Doolittle, 1999; Brochier and Philippe, 2002).

Die meisten Archaeen lassen sich auf Grund ihrer Lebensweise in eine von drei Gruppen einteilen: Methanogene, Halophile und (Hyper-) Thermophile. Crenarchaeen leben typischerweise als Hyperthermophile mit einem Energiehaushalt auf Basis von elementarem Schwefel, während Euryarchaeen hauptsächlich anaerobe, hyperthermophile Methanogene oder mesophile Halophile sind.

Es konnten für Archaeen eine Vielzahl von Viren nachgewiesen werden, die sowohl als vereinfachte Modelle genetischer Prozesse dienen können, als auch Potential zur Entwicklung genetischer Techniken haben, entsprechend den Erfahrungen mit Bakteriophagen und Viren und ihren Wirten. Besonders intensiv wurden Viren von hyperthermophilen Archaeen untersucht (Prangishvili, 2003; Zillig et al., 1998), die im Fall der Viren der Euryarchaeen auffällige Ähnlichkeiten zu Bakteriophagen (Nuttall and Dyall-Smith, 1993) und im Fall der Crenarchaeen zu eukaryotischen Viren zeigen (Peng et al., 2001).

	<i>Eubacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukarya</i>
Zellgröße	0,3 – 10 µm	0,3 – 10 µm	10 – 100 µm
Zellwand	Peptidoglycan	Polysaccharide, Proteine (<u>kein</u> Peptidoglycan)	- Cellulose (Pflanzen) - Chitin (Pilze) - keine (Tiere)
Verknüpfung der Membranlipide	Ester	Ether	Ester
Membranlipide mit verzweigten Fettsäureketten	Selten	Häufig (auf Isoprenoid-Basis)	Selten
Ribosomen	70S	70S	80S (70S in Organellen)
Diphtherietoxin als Translationsinhibitor	✗	✓	✓
Tetracyclin als Translationsinhibitor	✓	✗	✗
Cycloheximid als Translationsinhibitor	✗	✗	✓
Plasmide	✓	✓	Selten
Operons	✓	✓	✗
Introns in tRNA-Genen	Selten	✓	✓
<i>Capping</i> und PolyA-Schwanz von mRNA	✗	✗	✓
Initiator-tRNA	Formyl-Methionin	Methionin	Methionin
RNA-Polymerase	1 Typ (4 Untereinheiten)	Mehrere Typen (8 – 12 Untereinheiten)	3 Typen (12 – 14 Untereinheiten)

Tab. 1.1, Sammlung einiger Unterscheidungsmerkmale zwischen Bakterien (*Eubacteria*), Archaeen (*Archaea*) und Eukaryoten (*Eukarya*). ✗, nicht vorhanden, ✓, vorhanden.

Archaeen zeigen in ihren zellulären Prozessen sowohl eukaryotische als auch bakterielle Merkmale. Wie bereits erwähnt, haben die Prozesse der Informationsverarbeitung und des DNA-Metabolismus eher eukaryotischen Charakter, sind aber deutlich weniger komplex (Keeling and Doolittle, 1995). Besonders Replikation (Grabowski and Kelman, 2003), sowie Rekombination und Reparaturvorgänge (Seitz et al., 2001) entsprechen dieser Vorgabe. Dieses kann die archaealen Systeme zu Modellen der sehr komplexen Vorgänge der Informationsverarbeitung bei den Eukaryoten machen.

1.2 Rekombination

Die genetische Rekombination ist ein fundamentaler genetischer Prozeß und bezeichnet den physikalischen Austausch von genetischem Material zwischen zwei DNA-Molekülen (*intermolekulare R.*) oder zwei Bereichen eines DNA-Moleküls (*intramolekulare R.*). Seit langem wird ihre Bedeutung für das Auftrennen von Kopplungsgruppen und der daraus resultierenden Plastizität des Genoms zur Erzeugung von genetischer Diversität als Grundlage der Evolution anerkannt. Zunehmend rückt aber auch ihre Bedeutung für informationserhaltende Prozesse, wie der DNA-Reparatur, vor allem nach Doppelstrangbrüchen (Wolner et al., 2003; Pastink et al., 2001) und der Fortsetzung der DNA-Replikation nach Entstehung von arretierten Replikationsgabeln (Seigneur et al., 1998; Boddy et al., 2001; McGlynn and Lloyd, 2001; Courcelle et al., 2003) ins Blickfeld.

Grundsätzlich lassen sich verschiedene Arten von Rekombination nach ihren jeweiligen Sequenzanforderungen unterscheiden:

- allgemeine oder homologe Rekombination mit langen Homologien (>> 50 bp)
- sequenzspezifische oder ortsspezifische Rekombination mit kurzen Homologien (< 50 bp)
- illegitime Rekombination ohne Homologieanforderungen zwischen den rekombinierenden DNAs.



Abb. 1.2, Modelle zur Initiation der homologen Rekombination. A, Holliday; **B,** Meselson; **C,** Szostak; Die gepaarten Chromosomen sind als *graue* und *schwarze* Doppelbalken dargestellt, wobei ein einzelner Balken jeweils einem DNA-Einzelstrang entspricht. *gestrichelter Pfeil*, DNA-Synthese; Details und Zitate im Text. (aus Kupfer, 1993)

Für die Initiation des molekularen Mechanismus der homologen Rekombination gibt es unterschiedliche Modelle, die auf das ursprüngliche Modell von Holliday (Holliday, 1964) zurückgehen. Hollidays Modell (Abb. 1.2, A) besagt, daß nach Paarung zweier homologer Chromosomen in beide Stränge an übereinstimmender Position ein Einzelstrangbruch eingefügt wird. Die freien Enden der geschnittenen Einzelstränge trennen sich daraufhin von ihrem ursprünglichen Partnerstrang und hybridisieren über Kreuz mit dem jeweils komplementären Einzelstrang des homologen Chromosoms. Durch diesen symmetrischen Strangaustausch entsteht eine Verbindung zwischen den beteiligten DNA-Strängen, die als kreuzförmige Struktur (Holliday-Struktur, Abb.1.3) dargestellt werden kann. Bei entsprechender Homologie

der Chromosomen ist nach Ligation der Einzelstrangbrüche eine Verschiebung des Kreuzungspunktes möglich (Schenkelwanderung, *branch migration*), wodurch Einzelstrang-DNA zwischen beiden Chromosomen ausgetauscht wird.

Eine Abänderung von Hollidays Modell wurde von Meselson und Radding (Meselson and Radding, 1975) vorgeschlagen. Ihr Modell (Abb. 1.2, B) geht von nur einem Einzelstrangbruch in einem der gepaarten homologen Chromosomen aus. Das erzeugte 3'-Ende dient als Ansatzpunkt für eine einsetzende DNA-Synthese, die den ursprünglichen Teil des Einzelstranges verdrängt. Dieser verdrängte Einzelstrang wird in den homologen Bereich des gepaarten Chromosoms eingeführt und führt hier zur Verdrängung eines Einzelstranges und damit zur Ausbildung einer Schleife (*displacement loop*), die im Folgenden abgebaut wird. Es findet also asymmetrischer Strangaustausch statt: Die Sequenz des ausgetauschten Einzelstranges des einen Chromosoms wird durch DNA-Synthese wieder hergestellt, während im zweiten Chromosom ein Doppelstrangbereich aus zwei unterschiedlichen Elternsträngen (Heteroduplex) gebildet wird. Wie beim Holliday-Modell sind hier beide Chromosomen durch eine Holliday-Struktur miteinander verbunden.

Das dritte Modell zur Initiation der homologen Rekombination nach Szostak (Szostak et al., 1983; Orr-Weaver and Szostak, 1985; Abb.1.2, C) geht von einem Doppelstrangbruch in einem beteiligten Chromosom aus. Ein erzeugtes Doppelstrangende wird zu einem überhängenden freien 3'-Ende prozessiert, das in den homologen Doppelstrang eindringen kann und dort durch DNA-Synthese verlängert wird. Der verdrängte Einzelstrang bildet hier ebenfalls einen *displacement loop*, der mit dem nicht eingedrungenen Ende des Doppelstrangbruches hybridisieren und als Matrize zur Strangsynthese dienen kann. Dadurch wird der Bereich, der durch die Prozessierung des Doppelstrangbruches verloren wurde, durch die Sequenz des homologen Chromosoms ersetzt. Es kommt zur Ausbildung von zwei Holliday-Strukturen, die wieder das Potential zur *branch migration* besitzen und so genetisches Material symmetrisch, unter Bildung von Heteroduplex-DNA, austauschen können.

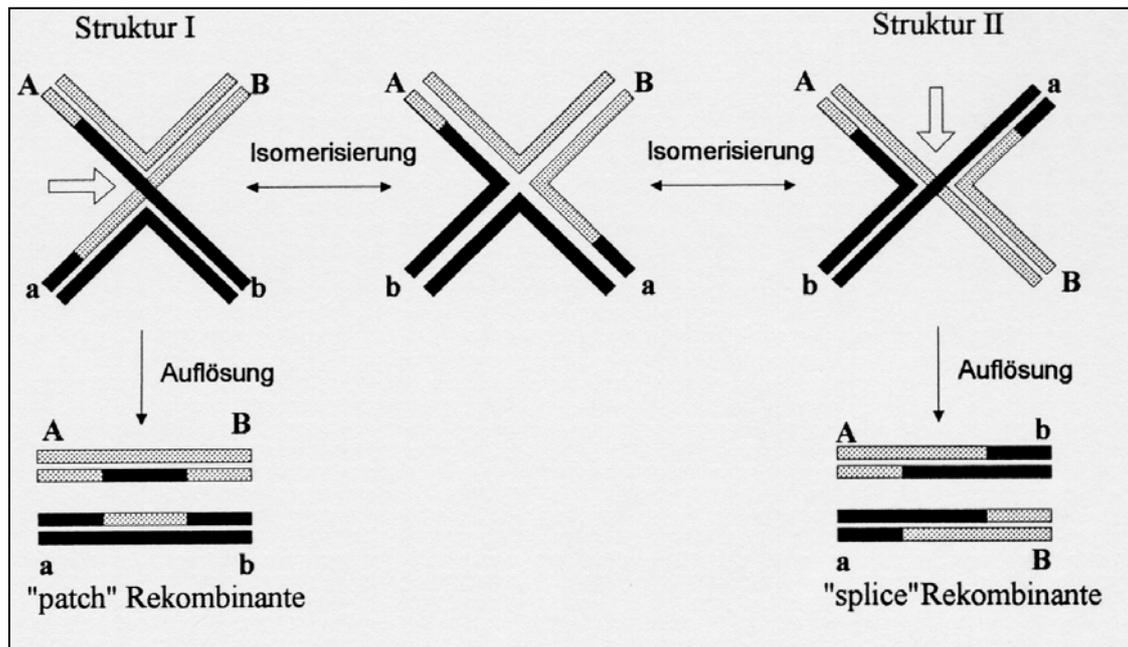


Abb. 1.3, Schema zu den alternative Auflösungen der Holliday-Struktur. Graue und schwarze Balken stellen DNA-Einzelstränge der rekombinierenden Chromosomen dar. A, B, a, b bezeichnen genetische Marker. Die zentrale Struktur läßt sich durch Drehung der a und b Arme um 180° in Struktur I und durch Drehung der a und B Arme um 180° in Struktur II überführen. Die Auflösung findet jeweils durch Schnitte in den überkreuzten Einzelsträngen statt. Bereiche der Rekombinanten mit hybridisierten Einzelsträngen aus beiden Chromosomen bilden Heteroduplex-DNA. Man beachte den Austausch der genetischen Marker in den *splice* Rekombinanten. (aus Kupfer, 1993)

In allen drei Modellen ergibt sich als Resultat eine verzweigte Struktur in der zwei Duplex-DNAs über eine oder zwei Holliday-Strukturen miteinander verbunden sind.

Zum Abschluß der Rekombination und zur Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes von zwei unabhängigen DNA-Molekülen muß diese Struktur wieder aufgelöst werden. Dieses geschieht durch das Einfügen von zwei Einzelstrangbrüchen und ist auf zwei alternative Arten möglich (Abb. 1.3), je nach Wahl der geschnittenen Einzelstränge. Die Produkte dieser Auflösungsreaktion unterscheiden sich erheblich im Ergebnis, d.h. im Ausmaß des ausgetauschten genetischen Materials. Sie tragen in einem Fall („Flicken“- oder patch-Rekombinante, Abb. 1.3, Struktur I) nur Heteroduplex-DNA über den Bereich in dem branch migration stattgefunden hat. Im zweiten Fall („Spleiß“- oder *splice*-Rekombinante, Abb. 1.3, Struktur II) kann sich ebenfalls durch *branch migration* Heteroduplex-DNA gebildet haben, die Abschnitte jenseits der aufgelösten Holliday-Struktur sind jedoch zwischen beiden Chromosomen vollständig ausgetauscht (Austausch von Aussenmarkern). Wird durch Reparatur eventuell fehlgepaarter Basen in der Heteroduplex-DNA ein Allel in ein anderes überführt, wird dieser Vorgang als Genkonversion bezeichnet.

Die der Rekombination zu Grunde liegenden enzymatischen Aktivitäten wurden zuerst in Bakteriophagen und *E. coli* identifiziert. Sie lassen sich grundsätzlich in verschiedene Gruppen einteilen, die an der Katalyse der beschriebenen Phasen der homologen Rekombination beteiligt sind: Erzeugung und Prozessierung von rekombinogenen DNA-Strängen (*E. coli*: RecBCD), Strangassimilation und –austausch (RecA), Prozessierung der verknüpften Stränge durch *branch migration* (RuvAB) und Auflösung der zur Holliday-Struktur verknüpften Stränge (RuvC).

Für die meisten Prozesse existieren in *E. coli* weitere Enzymaktivitäten, die zum Teil redundant sind (Amundsen and Smith, 2003) oder akzessorisch wirken. Vergleichbare Aktivitäten dieser zentralen Rekombinationsenzyme lassen sich inzwischen auch in eukaryotischen und archaealen Organismen finden (Paques and Haber, 1999; Seitz et al., 2001; Bianco et al., 1998). Sie sind zum Teil homolog, wie im Fall des Strangaustausch-Enzyms RecA, das in allen drei Reichen des Lebens konserviert ist. Zum Teil zeigen sie aber keine Sequenzähnlichkeit, was eine Entwicklung durch konvergente Evolution nahe legt. Beispiele hierfür sind die Enzyme zur Auflösung der Holliday-Struktur, die Holliday-Struktur Resolvasen oder X-Solvasen.

Die in unserer Arbeitsgruppe schwerpunktmäßig untersuchten X-Solvasen sind eine ubiquitäre, aber heterogene Gruppe von Enzymen (Kemper, 1997; Lilley and White, 2001; Sharples, 2001). Sie katalysieren den Abschluß des Rekombinationsvorgangs durch die Trennung der verbundenen DNA-Stränge zur Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands von zwei unabhängigen Chromosomen. Zum einen wird die für viele genetische Prozesse hinderliche kreuzförmige Struktur entfernt, zum anderen wird den Chromosomen ermöglicht, bei der Zellteilung zu segregieren.

Die charakteristische endonukleolytische Reaktion der X-Solvasen ist das Einfügen von symmetrischen Einzelstrangbrüchen in zwei im Kreuzungspunkt gegenüberliegenden Einzelsträngen. Diese Schnitte, an übereinstimmender Position bezüglich ihrer Entfernung und Orientierung zum Kreuzungspunkt, führen zu einer produktiven Auflösung der Holliday-Struktur zu zwei Doppelstrang-DNAs mit jeweils einem Einzelstrangbruch, der durch Ligation repariert werden kann, ohne

Einzelstrangüberhänge oder -lücken in den Doppelstrang-Produkten zu hinterlassen. Die beiden alternativen Rekombinationsprodukte (Abb. 1.3), mit deutlichen Unterschieden im Umfang des ausgetauschten genetischen Materials, kommen durch die Wahl der zu schneidenden gegenüberliegenden Einzelstrangpaare zustande. Welche Mechanismen die Orientierung der Auflösungsreaktion kontrollieren ist unklar. Ein wichtiger Faktor scheint aber die räumliche Struktur (siehe 1.3) der verzweigten DNA selbst zu sein (Cromie and Leach, 2000; Miick et al., 1997).

Bislang identifizierte X-Solvasen zeichnen sich durch eine hohe Dichte positiver Ladungen an ihrer Oberfläche aus, die vermutlich in Wechselwirkung mit ihrem DNA-Substrat steht. Für ihre Aktivität benötigen sie divalente Kationen, meistens Magnesium, die von konservierten sauren Aminosäuren im aktiven Zentrum komplexiert werden. Diese Kationen sind essentiell für die Schnittaktivität, jedoch nicht für die Bindung des Substrats. Alle bekannten X-Solvasen liegen in Lösung als Homodimere vor, so daß ihre aktiven Zentren symmetrisch ausgerichtet sind. Das wiederum ist die Grundlage für die symmetrische Auflösung des Substrats.

X-Solvasen wurden bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus den Bakteriophagen T4 (Mizuuchi et al., 1982) und T7 (de Massy et al., 1987), lamboiden Prophagen (Sharples et al., 1994), Bakterien (Connolly et al., 1991, Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae* (Kleff et al., 1992; Whitby and Dixon, 1997), Archaeen (Komori et al., 1999; Kvaratskhelia and White, 2000), archaealen Viren (Birkenbihl et al., 2001) und aus Pox-Viren (Garcia et al., 2000) isoliert.

Bei höheren Eukaryoten konnte bislang nur die Aktivität von X-Solvasen in Extrakten von HeLa-Zellen (Waldman and Liskay, 1988; Ciccina et al., 2003), Kalbsthymus-Zellen (Elborough and West, 1990) und B-Zellen der Maus (Solaro et al., 1995) nachgewiesen werden. In keinem dieser Fälle konnte das zugehörige Protein bzw. konnten die entsprechenden Gene ermittelt werden.

Neben der Präferenz Holliday-Strukturen aufzulösen, zeigen einige X-Solvasen auch Aktivitäten mit anderen, von der Duplex-Form abweichenden DNA-Strukturen (Pottmeyer and Kemper, 1992; Solaro et al., 1993; Dickie et al., 1987; Greger and Kemper, 1998). Alle X-Solvasen binden ihr Substrat sequenzunabhängig, zeigen aber

zum Teil eine sequenzabhängige Schnittreaktion (White and Lilley, 1996; Shah et al., 1994; Shida et al., 1996).

Phylogenetisch lassen sich die bislang identifizierten X-Solvasen in zwei Superfamilien einordnen (Lilley and White, 2000; Aravind et al., 2000). Zum einen bilden RuvC aus *E. coli*, Cce1 aus Hefe und A22R aus Pox-Viren zusammen mit RnaseH1, sowie Integrasen und Transposasen, die Integrase-Superfamilie. Die archaealen Hjcs lassen sich mit der Endonuklease I des Bakteriophage T7 und Typ I und Typ II Restriktionsendonukleasen, sowie MutH und *lambda*-Exonuklease zu einer Nuklease-Superfamilie zusammenfassen. Archaeale Hjcs zeigen in ihren Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten zu den Typ II Restriktionsendonukleasen (Daiyasu et al., 2000; Kvaratskhelia et al., 2000), was durch übereinstimmende strukturelle Details, durch die gewonnenen Kristallstrukturen der Hjcs aus *Pyrococcus furiosus* (Nishino et al., 2001) und *Sulfolobus solfataricus* (Bond et al., 2001) bestätigt werden konnte. Das bakterielle RusA und die Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 passen in keine der beiden Kategorien und stehen phylogenetisch noch isoliert da.

Im Gegensatz zum universellen Strangaustauschprotein RecA / Rad51, ist die Aktivität zur Auflösung des Rekombinations-Intermediats Holliday-Struktur also aus verschiedenen evolutionären Wurzeln hervorgegangen.

Neben der Aktivität von X-Solvasen zum Abschluß der Rekombination wird zunehmend auch die Möglichkeit der topologischen Auflösung von Holliday-Strukturen durch die Wirkung von Helikasen und Topoisomerasen in Betracht gezogen (Heyer et al., 2003; Nakagawa and Kolodner, 2002; Sekiguchi et al., 1996).

1.3 Struktur der cruciformen DNA

Die Struktur der cruciformen DNA ist entscheidend für die Erkennung, Bindung und Umsetzung durch X-Solvasen. Grundsätzlich entsteht cruciforme DNA aus der Verbindung von zwei doppelsträngigen DNAs durch Rekombination. Im Verbindungspunkt treffen also insgesamt vier Arme von Duplex-DNA aufeinander.

Die tatsächliche räumliche Struktur dieses Moleküls in Lösung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu gehört in erster Linie die Salzkonzentration des Lösungsmittels, wobei die Konzentration der divalenten Kationen eine wichtige Rolle spielt (Duckett et al., 1990) (Abb. 1.4). Bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen ($< 100 \mu M Mg^{2+}$) liegt die cruciforme DNA in einer ausgestreckten, planaren Form vor, so daß alle vier Arme in einer Ebene liegen und jeder Arm mit seinen beiden benachbarten Armen einen rechten Winkel bildet (Abb. 1.4, 1.5, A). Bei höheren Konzentrationen von divalenten Kationen bilden jeweils zwei benachbarte Arme der cruciformen DNA quasidurchgehende Helices, die im Kreuzungspunkt verbunden sind. In dieser Struktur mit koaxial gestapelten Armen (*stacked-X*) ist ein fast durchgängiges, energetisch günstiges Stapeln der Basen in beiden Helices möglich (siehe Abb.1.4, 1.5, B - E). Die divalenten Kationen im Lösungsmittel kompensieren hierbei elektrostatische Abstoßungen zwischen den angenäherten Zuckerphosphat-Strängen der Helices, die bei niedrigen Salzkonzentrationen zur Ausbildung der gestreckten Struktur führen.

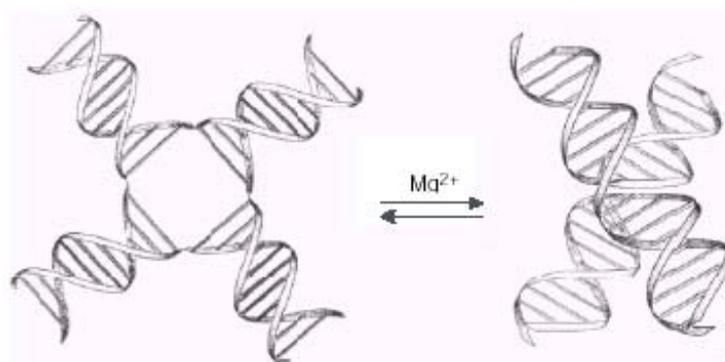


Abb. 1.4, Struktur cruciformer DNA bei unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen. Bei Konzentration von weniger als $100 \mu M$ liegt die cruciforme DNA in gestreckter, planarer Form vor (links). Bei Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration faltet sie sich zur Struktur mit koaxial gestapelten Armen (*stacked-X*, rechts). (Lilley, 2000)

Durch eine Drehung der Helices zueinander im Kreuzungspunkt werden sterisch unterscheidbare Konformere erzeugt, die im Extremfall parallel (siehe Abb. 1.4, B, C) oder antiparallel zueinander liegen (siehe Abb. 1.4, D, E). Die vierfache Symmetrie (zwei Symmetrieachsen) der planaren Form mit vier strukturell äquivalenten DNA-Einzelsträngen wird in der gestapelten Struktur zur zweifachen Symmetrie (eine Symmetrieachse) reduziert, mit der Folge, daß zwei Paare von strukturell unterscheidbaren Einzelsträngen entstehen, nämlich in jeder Helix ein durchgehender (*continuous strand*) und ein am Kreuzungspunkt in die benachbarte Helix wechselnder Einzelstrang (*exchange strand*). Bei der Ausbildung der *stacked-X* Struktur können grundsätzlich zwei Konformere gebildet werden, die sich durch die Wahl der zur durchgehenden Helix gestapelten Arme unterscheiden. Jeder Arm kann potentiell mit beiden Nachbaramen eine Helix bilden, so daß sich zwei sterisch gleichberechtigte, aber durch den strukturellen Charakter ihrer Einzelstränge unterscheidbare Strukturen ergeben (siehe Abb. 1.4, B, C und D, E). Bei Änderung der gestapelten Arme ändert sich der strukturelle Charakter der Einzelstränge:

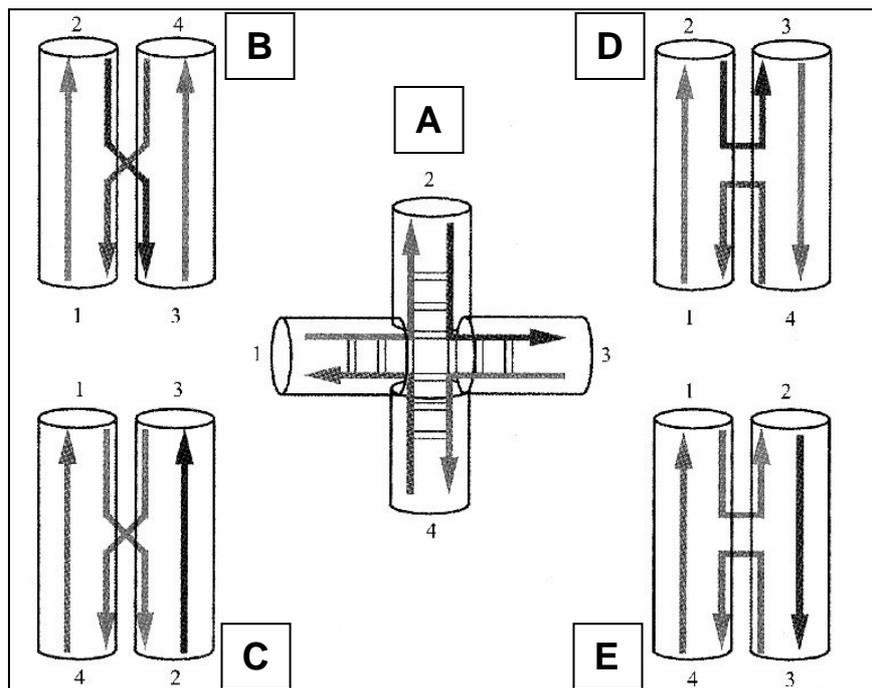


Abb. 1.5 Konformere einer cruciformen DNA. A, gestreckte Struktur, B-E, Konformere gestapelter Strukturen. Die vier Arme der cruciformen DNA sind von 1 bis 4 nummeriert. Die vier DNA-Einzelstränge sind als Pfeile dargestellt. Die Zylinder entsprechen DNA-Doppelhelices. In B und D sind die Arme 1 und 2, sowie 3 und 4 zur quasidurchgehenden Helix gestapelt. In C und E stapeln 1 und 4, sowie 2 und 3. B und D, sowie C und E lassen sich durch Drehung der Helices zueinander im Kreuzungspunkt ineinander überführen. In Struktur B und C sind die verbundenen Helices parallel, in D und E antiparallel. (Lilley, 2000)

durchgehende Einzelstränge werden zu ausgetauschten Einzelsträngen und umgekehrt (Abb. 1.5, Struktur B zu C und D zu E).

Experimentelle Daten deuten darauf hin, daß Holliday-Strukturen in Anwesenheit von divalenten Kationen eine im Uhrzeigersinn gedrehte, antiparallele, gestapelte Struktur ausbilden (Murchie et al., 1989; Clegg et al., 1992), deren Helices in einem Winkel von etwa 60° bzw. 120° zueinander stehen (von Kitzing et al., 1990). Das Vorhandensein beider Konformere, je nach Wahl der gestapelten Arme, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Chen et al., 1988; Murchie et al., 1989). Dabei hängt die Auswahl bzw. das Verhältnis der beiden Konformere von der Sequenz unmittelbar am Kreuzungspunkt ab (Grainger et al., 1998; Miick et al., 1997; Overmars and Altona, 1997). Diverse Kristallstrukturen von cruciformen DNAs bestätigten grundsätzlich die Konformation der antiparallelen *stacked-X* Struktur

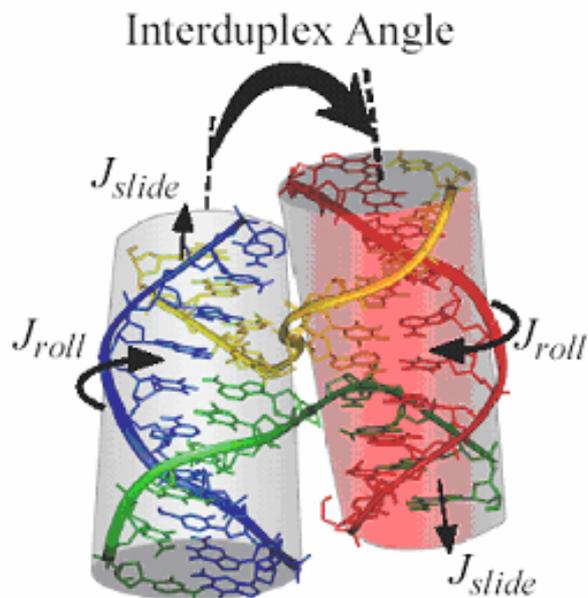


Abb. 1.5, Struktur cruciformer DNA. Die Struktur des Kreuzungspunkt einer cruciformen DNA auf Grundlage von Kristallstrukturen ist dargestellt. Erkennbar sind die außen liegenden durchgehenden und die im Kreuzungspunkt ausgetauschten Einzelstränge. Individuelle cruciforme DNAs unterscheiden sich in den dargestellten Parametern voneinander (*Interduplex Angle*, Winkel der Helix-Achsen zueinander; J_{roll} , Drehung der Helices zueinander; J_{slide} , Verschiebung der Helices zueinander). (Hays et al., 2003)

(Ortiz-Lombardia et al., 1999; Eichman et al., 2000), mit graduellen Unterschieden in der Orientierung der Helices zueinander (Abb. 1.5).

Die antiparallele Orientierung der beiden Helices ist für eine Verschiebung des Kreuzungspunktes jedoch eine ungünstige Konformation. Hierzu muß die *stacked-X* Struktur in einen Übergangszustand mit planarer, gestreckter Struktur überführt werden, was ein Aufbrechen des energetisch günstigen Stapelns der Arme erforderlich macht (Panyutin et al., 1995; Ortiz-Lombardia et al., 1999). Ein dynamischer Wechsel zwischen beiden Konformeren, ebenfalls mit planarem Übergangszustand, konnte nachgewiesen werden (Carlstrom and Chazin, 1996; Overmars and Altona, 1997; McKinney et al., 2003).

Biologisch bedeutsam werden die unterscheidbaren Konformere vor allem, wenn eine Holliday-Struktur durch rein strukturspezifische X-Solvase aufgelöst wird. Es ergibt sich je nach vorliegendem Konformer entweder das *patch-* oder das *splice-* Rekombinationsprodukt, wenn durch die gleiche Aktivität der X-Solvase jeweils Einzelstränge mit gleichem strukturellen Charakter geschnitten werden. Geht man von einer X-Solvase aus, die durchgehende Einzelstränge schneidet, führt das bei beiden Konformeren also zu den unterschiedlichen Rekombinationsprodukten. Das heißt, die Entscheidung des Rekombinationsausganges wäre abhängig von der Konformation der cruciformen DNA, die wiederum, bei vorliegender antiparalleler *stacked-X* Struktur, abhängig ist von der Sequenz am Kreuzungspunkt.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, eine vergleichende Analyse spezifischer Reaktionen von homologen archaealen Holliday-Struktur auflösenden Enzymen (Hjcs) durchzuführen. Acht homologe Hjcs aus hyperthermophilen Archaeen, sowie zwei Hjcs aus archaealen Viren sollten kloniert, gereinigt und mit geeigneten Substraten auf ihre Aktivität und auf eventuelle Unterschiede in ihren Schnittspezifitäten hin untersucht werden. Bei Nachweis möglicher Unterschiede sollten auf Grundlage der homologen Aminosäure-Sequenzen Bereiche identifiziert werden, die potentiell für die charakteristischen Eigenschaften der Hjcs verantwortlich sind. Hiermit war die Hoffnung verbunden, Hinweise auf strukturelle Grundlagen der spezifischen Erkennung und Umsetzung von cruciformer DNA durch Hjcs zu erhalten, um damit erstmals eine Substratspezifität vermittelnde Domäne in einer X-Solvase nachzuweisen.

2 Abkürzungen

A	Adenin
Afu	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
abs.	absolut
Ape	<i>Aeropyrum pernix</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
βME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius / Cytosin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCE1	cruciform cutting enzyme 1 aus <i>S. cerevisiae</i>
Ci	Curie
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
d	desoxy-
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoVII	Endonuklease VII des Bakteriophagen T4
EPL	Einzelplaquelysat
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FPLC	Niedrigdruck-Flüssigkeitschromatographie
g	Erdbeschleunigung, Gramm
G	Guanin
gp	Genprodukt
h	Stunde
HAc	Essigsäure
His-tag	Peptid-Anhänger aus sechs Histidinen zur Reinigung von Proteinen über Ni-NTA Affinitätschromatographie
Hjc	<i>Holliday junction cutting enzyme</i>
kb	Kilobasenpaare

min	Minuten
Mja	<i>Methanococcus janashii</i>
MeOH	Methanol
Mth	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
NaAc	Natriumacetat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat, Affinitätschromatographie-Matrix
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotid-Triphosphat (ATP, TTP, CTP, GTP)
OD _{xxx}	optische Dichte bei XXX nm
Oligo	Oligonukleotid
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
Pab	<i>Pyrococcus abyssi</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pho	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pxx	<i>Pyrococcus ssp.</i>
RF	replikative Form, DNA-Struktur während der Replikationsphase
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SIRV	<i>Sulfolobus islandicus</i> rodshaped virus
Sis	<i>Sulfolobus islandicus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
Sso	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
T	Thymin
T4	Bakteriophage T4
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VFS-DNA	very fast sedimenting DNA der gp49-T4-Mutante
v / v	Volumenprozent

wt	Wildtyp
w / v	Gewichtsprozent
XC	Xylencyanol
YE	Yeast-Extract (Hefe-Extrakt)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bis- / Acrylamid	Serva (Heidelberg) / Biorad (München)
Agarose	Biorad (München)
Bacto-Agar	Difco (Augsburg)
Bacto-Trypton	Difco
IPTG	Biomol (Hamburg)
Yeast-Extract	Difco
Didesoxy-Nukleotide	Amersham (Freiburg)

Alle anderen Chemikalien wurden in *p.a.* Qualität von der Firma Sigma (Seelze) bezogen.

3.1.1.1 Radioisotope

³²P- γ -dATP Amersham (Freiburg)

3.1.2 Enzyme und Proteine

Pwo Polymerase	Roche (Mannheim)
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Proteinmarker für SDS-Gelelektrophoresen	Biorad (München)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
Endonuklease VII	laboreigene Reinigung

Alle anderen Enzyme wurden von der Firma „New England Biolabs“ (Frankfurt am Main) bezogen.

3.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer A	50	mM	Tris, pH 8
	0,1	mM	EDTA
	0,5	mM	DTT
	10	%	Glycerin
Puffer AL	50	mM	Tris, pH 8
	5	mM	EDTA
	100	mM	NaCl
Puffer B	0,1	M	Kalium-Phosphat, pH 6,8
	10	mM	β ME
	10	%	Glycerin

Bradfordreagenz-Lösung	Biorad (München)		
Coomassie-Färbelösung	0,2	%	CBB R 250
	20	%	HAc
	40	%	MeOH
Coomassie-Entfärbelösung	10	%	HAc
	10	%	MeOH
Crosslink-Puffer	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,3
	100	mM	NaCl
	0,1	%	βME
	10	%	Glycerin
DNA-Probenpuffer (5x)	30	mM	Tris, pH 8
	50	mM	EDTA
	0,01	%	BPB
	0,01	%	XC
	50	%	Glycerin
Puffer E	1	mM	Tris, pH 8,5
Puffer L	50	mM	Tris, pH 8
	0,1	mM	EDTA
	0,5	mM	DTT
	1	M	KCl
	10	%	Glycerin
	1	mM	PMSF
NiLyse	50	mM	Tris, pH 8
	10	mM	βME
	500	mM	NaCl
NiWasch	wie NiLyse		
	25	mM	Imidazol
NiElu100	wie NiLyse		
	100	mM	Imidazol
NiElu250	wie NiLyse		
	250	mM	Imidazol
NiElu500	wie NiLyse		
	500	mM	Imidazol
Hjc Reaktionspuffer (10x)	200	mM	Tris, pH 7,5
	100	mM	MgCl ₂
	1	M	NaCl
	10	mM	DTT

MG-Stop (5x)	90	%	Formamid
	0,1	%	BPB
	0,1	%	XC in 1x TBE
Mini-Stop (3x)	10	mM	EDTA
	0,1	%	BPB
	0,1	%	XC
	50	%	Glycerin
PK-Stop-Mix	10	mM	Tris, pH 8
	25	mM	EDTA
	0,1	%	BPB
	0,1	%	XC
	30	%	Glycerin
	7,5	mg / ml	Proteinase K
SDS-Probenpuffer (3x)	50	mM	Tris, pH 6,8
	2	%	SDS
	5	%	β ME
	0,5	%	BPB
	30	%	Glycerin
SDS-Laufpuffer	25	mM	Tris
	192	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
TBE	89	mM	Tris
	89	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
TE	10	mM	Tris, pH 8
	1	mM	EDTA

3.1.3.1 Lösungen für SDS-Gel Silberfärbungen

Lösung I	10	%	HAc
	30	%	MeOH
Lösung II	30	%	MeOH
	0,5	M	NaAc, pH 6
	0,5	M	Glutaraldehyd
	0,2	%	Na ₂ S ₂ O ₃
Lösung III	0,1	%	AgNO ₃
	0,01	%	Formaldehyd

Lösung IV	2,5 %	NaCO ₃
	0,01 %	Formaldehyd

3.1.4 Kulturmedien

NZC	10 g	NZ-Amine
	5 g	NaCl
	5 g	Yeast-Extract
	1 g	Casamino-Acids (Difco)
	2 g	MgSO ₄
		mit NaOH auf pH 7 einstellen
		ad 1l H ₂ O

NZC amp	NZC mit 100 µg Ampicillin / ml
NZC cam	NZC mit 10 µg Chloramphenicol / ml
NZC Platten	NZC mit 15 g Agar / l
NZC Top-Agar	NZC mit 6,5 g Agar / l

3.1.5 Bakterien- und Archaeen-Stämme

<i>Escherichia coli</i> DH5α	Stratagene (Cedar Creek, USA)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus	Stratagene
<i>Sulfolobus islandicus</i> Lal 14	Geschenk, AG Zillig, MPI Martinsried
<i>Pyrococcus abyssi</i>	Geschenk, AG Suck, EMBL
Heidelberg	

Die folgenden Archaeenstämme wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, erworben. Die DSMZ-Stammnummer ist angegeben.

<i>Pyrococcus furiosus</i>	3638
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	12428
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	4304
<i>Aeropyrum pernix</i>	11879
<i>Methanococcus janaschii</i>	2661
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1053
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1616

3.1.6 Bakteriophagen- / Viren-Stämme

T4-gp49 ^{am} (E727)	laboreigene Präparation
SIRV1 / SIRV2	Geschenk, AG Prangishvili, Uni Regensburg

Archaeale Hjcs, *His-tag*; antisense Primer

Afu.C-His.as

Übh	BamHI		KpnI
TCCTAC	GGATCC	TCATCAGTGATGGTGATGGTGATGACCACGTGC	GGTACC.AAC TTT CTC
TCC	AAA CCT CTC C		

	Übh	KpnI	
Pfu.Hjc.NoStop.as	ATACGA	GGTACC.TGA	TTT CCC CTC CAA CGT TTT TTG
Ape.Hjc.NoStop.as	ATACGA	GGTACC.GCC	CTC GAG ATA GCT GTC AAT C
Mja.Hjc.NoStop.as	ATACGA	GGTACC.GAT	TAA ATC ATC TAT TTT TAA CTG
TTT			
Sso.Hjc.NoStop.as	ATACGA	GGTACC.TCT	GAG ACG GGT CTG CCT GTG
Mth.Hjc.NoStop.as	ATACGA	GGTACC.GAG	AAA ATT ATC TAG CGT TCT ACT T
SIRV.Hjc.NoStop.as		TCC	GGTACC.GCT GTT AAT TCC GTA TTT AAA TTT
GAT			

Archaeale Hjcs, Pfu-Afu-Hjc Chimären

Die Sequenzen in 3'-Richtung vom Punkt sind komplementär zu der Sequenz auf dem Pfu-Hjc Plasmid-*template*. Die grau unterlegten Sequenzen jedes Primer Paares ergeben in Kombination die (Aminosäure-) Sequenz der Afu-Domänen.

Afu1-Austausch

sense Primer

PFU:AFU1:1 TTT CAT.CCG CGG AAC CAG GGA TCC GTG A

antisense Primer

PFU:AFU1:2 TCC AAA GGT.GCC CAG GCA GAG AGA GAA TTG AT

Afu2-Austausch

sense Primer

	Übh	SmaI
PFU:AFU2:1	TCTAT	CC CGG GAA CGG GGA AAC ACC GGA ACC AGC AAC.CCT
CAC	CAC AGC AAA TCC ATG CTT T	

antisense Primer

	Übh	PmlI
PFU:AFU2:2	GGCCA	C ACG TGC CCG.GAC TTA GTT GCA GGT AAT GGA AAG AA

Afu3-Austausch

sense Primer

	Übh	SacI
PFU:AFU3:1	TGATCT	GAG CTC TTT CCG.AACCTTAACTTCTATGC

antisense Primer

	Übh	SacI
PFU:AFU3:2	GGAAT	GAG CTC CCC.TTG TACGTGGGAAAGAGAGA

3.1.7.2.2 Substrate

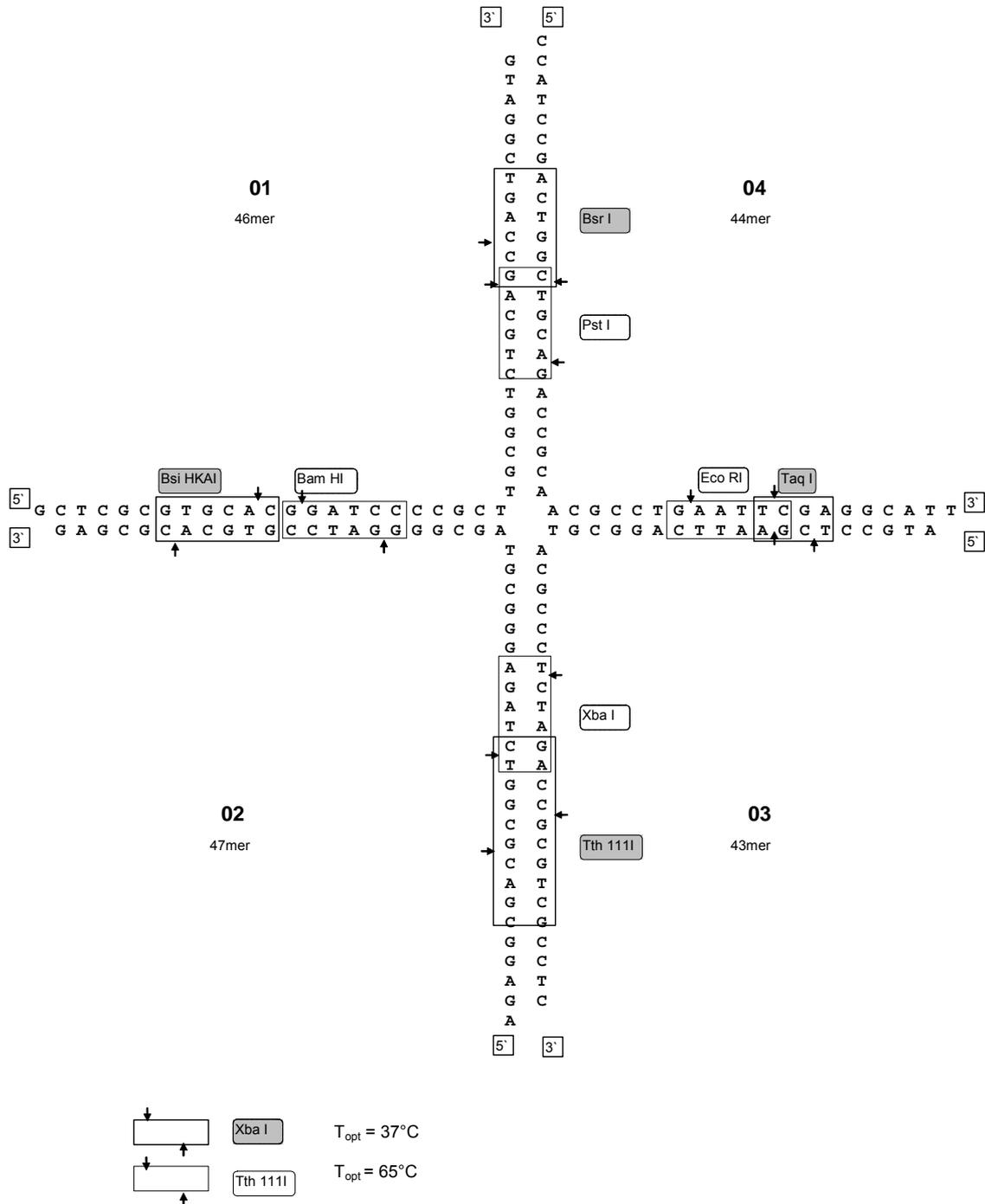
Oligos X.KN.01 - 04 hybridisieren zur synthetischen cruciformen DNA CFKla01 (3.1.9.1.1)

Oligos X.KN.11, 12, 03 und 14 hybridisieren zur synthetischen cruciformen DNA CFKla11 (3.1.9.1.2)

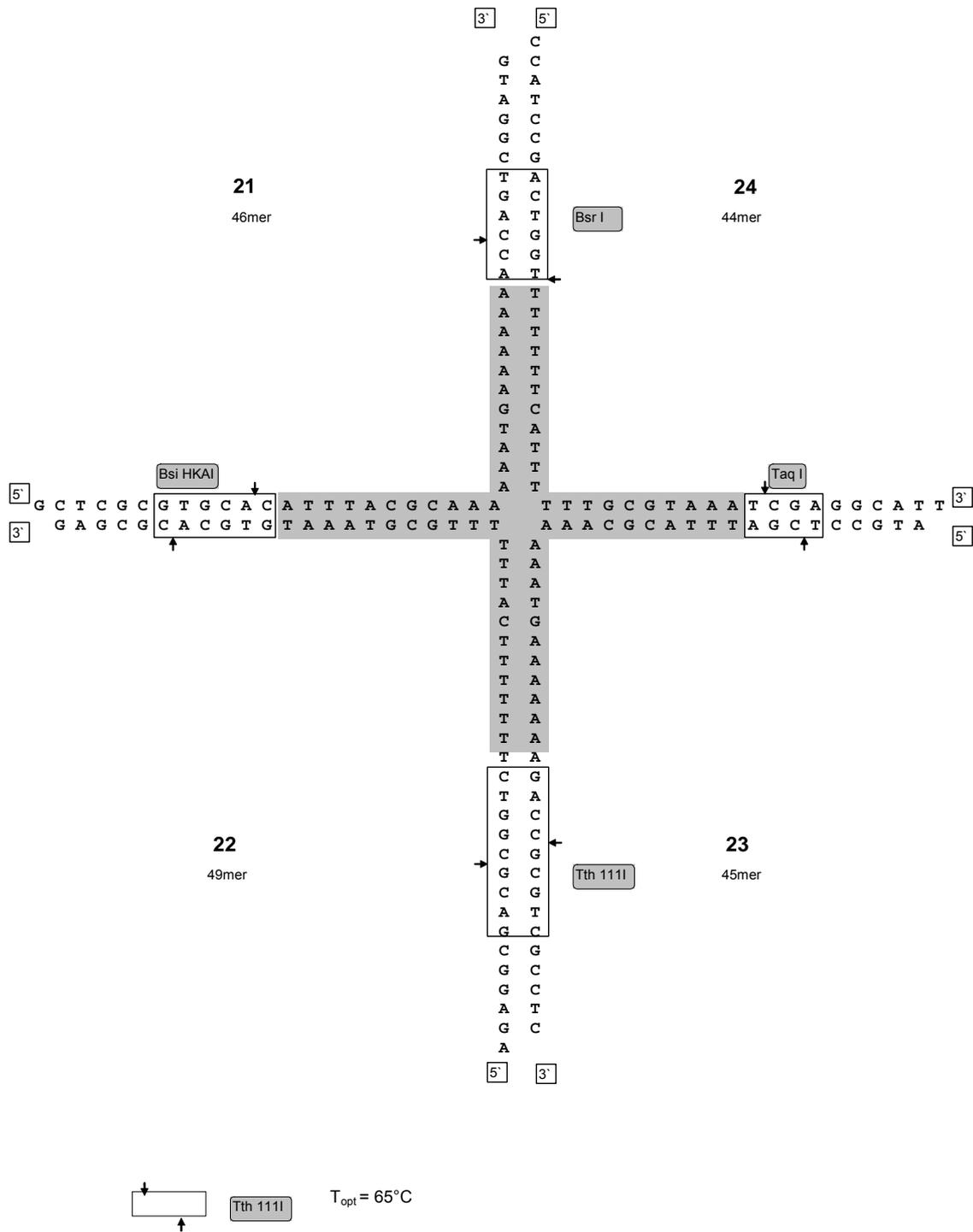
Oligos X.KN.21 - 24 hybridisieren zur synthetischen cruciformen DNA CFKla21 (3.1.9.1.3)

X.KN.01	GCTCGCGTGCACGGATCCGGCGTACGCCACTGCAGCCAGTCGGATG
X.KN.02	AGAGGCGACGCGGTCTAGAGGGCGTACGCCGGATCCGTGCACGCGAG
X.KN.03	ATGCCTCGAATTCAGGCGTACGCCCTCTAGACCGCGTCGCCTC
X.KN.04	CCATCCGACTGGCTGCAGTGGCGTACGCCTGAATTCGAGGCATT
X.KN.11	GCTCGCGTGCACGGATCCCCGCATGCGGACTGCAGCCAGTCGGATG
X.KN.12	AGAGGCGACGCGGTCTAGAGGGCGTTGCGGGGATCCGTGCACGCGAG
X.KN.14	CCATCCGACTGGCTGCAGTCCGCAACGCCTGAATTCGAGGCATT
X.KN.21	GCTCGCGTGCACATTTACGCAAAAAATGAAAAAACCAGTCGGATG
X.KN.22	AGAGGCGACGCGGTCTTTTTTTCATTTTTTGCGTAAATGTGCACGCGAG
X.KN.23	ATGCCTCGATTTACGCAAAAAATGAAAAAAGACCGCGTCGCCTC
X.KN.24	CATCCGACTGGTTTTTTTTTCATTTTTTGCGTAAATCGAGGCATT

3.1.8.1.2 CFKla11

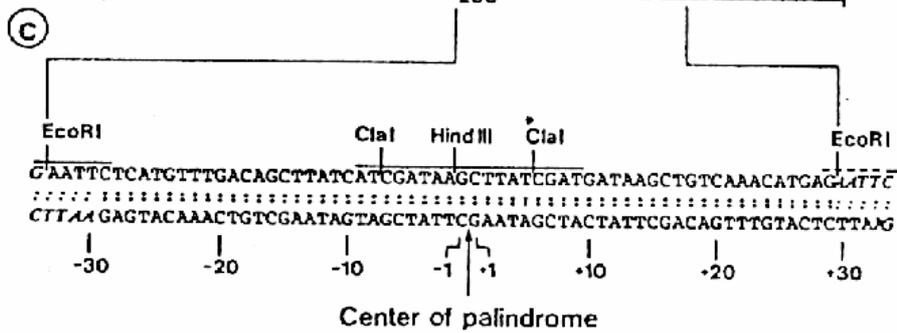
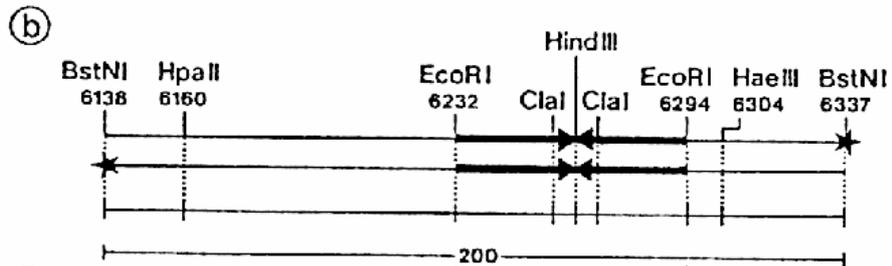
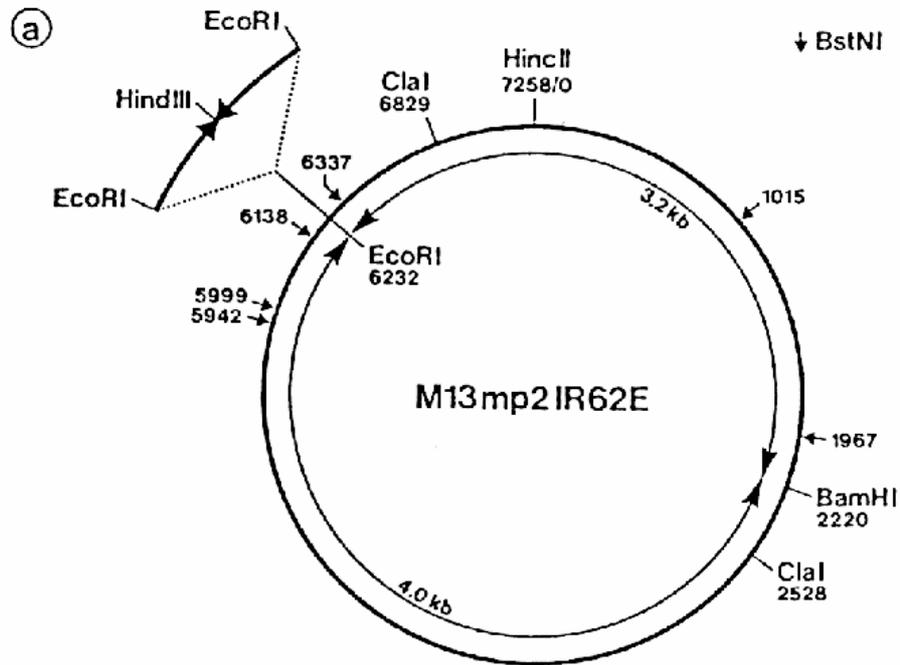


3.1.8.1.3 CFKla21



Die grau unterlegten Sequenzen kennzeichnen das homologe Zentrum mit der Fähigkeit zur *branch migration*.

3.1.8.2 M13mp2IR62E-RF



3.1.9 Geräte und Apparaturen

Dialyseschläuche	Biomol (Hamburg)
DNA-Agarose-Gelkammern	Anfertigungen der Universitätswerkstatt
DNA-kb-Leiter	Gibco (Paisley, Schottland)
DNA Banden-Elutions-Kits	Macherey-Nagel (Düren)
Einmalküvetten	Ratiolab (Dreieich)
Elektrophoresekammer	Biorad / BRL (Neu-Isenburg)
Entsalzungs-Säulen „NAP10“	Amersham (Freiburg)
Faltenfilter	Schleicher und Schüll (Dassel)
FPLC-Anlage	Amersham
FPLC-Säulen (diverese)	Amersham
FPLC-Säule (Hydroxyapatit)	Biorad (München)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Inkubationsschrank	WTB Binder (Tuttlingen)
Leersäulen für <i>batch</i> -Chromatographie	Biorad
Netzgeräte	Amersham / Biorad
Ni-NTA Spin Säulen	Qiagen (Hilden)
Ni-NTA Agarose	Qiagen
PCR-Cycler	MJ Research (Waltham, USA)
PCR-Produkt Reinigungs-Kits	Qiagen
Petrischalen	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
pH-Meter	Beckmann (München)
Phosphorimager Fujix BAS 1000	Fuji (Düsseldorf)
Phosphorimagerplatten	Fuji
Photoentwicklungsmaschine	Agfa (Köln)
Photometer Ultrospec III	Amersham
Plasmid Reinigungs-Kits	Qiagen
Quarzküvetten	Helma
Röntgenfilme	Fuji / Kodak (Stuttgart)
Szintillationszähler	Beckmann
Sonifizierer	Branson (Dietzenbach)
Tischzentrifugen	Eppendorf
UV-Transilluminator	Herolab (Wiesloch)
Vakuumkonzentrator Speed-Vac	Uniequip (München)
Video-Printer	Seikosha (Hamburg)
Zentrifugen	Sorvall (Hanau) RC-5B Heraeus (Hanau) Megafuge 1.0 R

3.1.10 Software

Vector NTI	Informax (Bethesda)
BasReader	Raytest (Straubenhardt)
TINA	Raytest
AIDA	Raytest

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit DNA

3.2.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch in einer Quarzglasküvette durch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entsprach $OD_{260}=1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ einzelsträngiger DNA.

3.2.1.2 Präparation von genomischer DNA

Archaeale Starterkulturen wurden entweder als flüssige Aktivkultur (Mth) oder lyophilisiert (Pfu, Pho, Afu, Ape, Mja, Sso) von der DSMZ bezogen. Die Flüssigkultur wurde für 10 min bei RT mit 6000 g abzentrifugiert. Das Mth-Zellpellet, die lyophilisierten archaealen Zellen, sowie 5 mg Sis- und Pab-Zellen wurden in 100 μl AL Puffer resuspendiert.

Zur Präparation der genomischen DNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde ein Volumen (100 μl) Phenol den resuspendierten Zellen zugefügt, kräftig geschüttelt und anschließend bei RT mit 14.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert. Die Prozedur wurde mit je einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), sowie Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Die resultierende wässrige Phase enthielt chromosomale DNA in einer nicht näher bestimmten Konzentration, die ausreichend war um als Matrize für die folgende Amplifikation der Hjc-Gene mittels PCR (3.2.1.9) zu dienen.

3.2.1.3 Präparation von Plasmid DNA

Plasmid DNA Präparationen wurden mit „QIAprep Spin Miniprep“ oder „QIAfilter Plasmid Midi“ Kits, nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Die resultierenden DNA Pellets wurden in Puffer E entsprechend einer Endkonzentration von etwa 0,5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ resuspendiert.

3.2.1.4 Fällung von DNA

Um den Gehalt an monovalenten Kationen zu erhöhen, wurde der DNA Lösung 0,2 Volumen 3 M Natriumacetat zugegeben. Zur Fällung der DNA wurden 3 Volumen EtOH (abs.) zugegeben und anschließend mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation mit 16.000 g bei 4°C für 45 min pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 250 μl 70 % EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das DNA Pellet entweder 30 min bei RT oder 5 min in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und in dem gewünschten Volumen Puffer aufgenommen.

3.2.1.5 Reinigung von DNA Oligonukleotiden

Bei der Verwendung von Oligonukleotiden zur Herstellung von DNA-Substraten, die eine basengenaue Analyse von endonukleolytischen Schnitten ermöglichen sollen, ist es entscheidend, keine verkürzten Oligonukleotide durch unvollständige Synthese bzw. Strangabbrüche zu verwenden. Deshalb wurden die Oligonukleotide von verkürzten Anteilen gereinigt.

Dazu wurden 4 nmol Oligonukleotide auf einem denaturierenden 12,5 % PAA Gel bei 45 W für 3 h aufgetrennt. Unter UV-Licht ließen sich die Oligonukleotide und eventuelle Verunreinigungen als Banden erkennen. Die deutlichste obere Bande wurde ausgeschnitten und in 1 ml TE bei 65°C unter Schütteln ÜN resuspendiert. Das Eluat wurde über eine „NAP10“ Säule entsalzt und wieder auf TE eingestellt (Elutionsvolumen: 1,5 ml). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und betrug in der Regel ~2 pmol/µl, was einer Gesamtstoffmenge von 3 nmol, also 75 % der eingesetzten Stoffmenge entspricht.

Um höhere Konzentrationen zu erzielen, wurden die Oligonukleotidlösungen in einem Vakuumkonzentrator eingeeengt.

3.2.1.6 Radioaktive Endmarkierung von DNA Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden durch Übertragung eines des γ -Phosphats von ^{32}P - γ -ATP auf das nicht phosphorylierte 5'-Ende, durch die Aktivität der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK), radioaktiv markiert.

Eingesetzt wurden 5 pmol gereinigte Oligonukleotide mit 5 μCi ^{32}P - γ -ATP und 5 U PNK. Die Reaktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Nach Beendigung der Reaktion wurde die DNA gefällt (3.2.1.4).

3.2.1.7 Präparation von synthetischer cruciformer DNA

Synthetische cruciforme DNA (3.1.9.1) wird durch Hybridisierung von vier Oligonukleotiden mit geeigneten komplementären Sequenzen gebildet. Hierbei ist jede Hälfte eines Oligonukleotids jeweils einer Hälfte eines benachbarten Oligonukleotids komplementär.

Zu dem gefällten und getrockneten radioaktiv markierten Oligonukleotid wurden die drei weiteren notwendigen Oligonukleotide in dreifachem molarem Überschuß zugegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt in TBE mit 10 mM MgCl_2 , zur Stabilisierung der sich ausbildenden cruciformen Struktur, in einem Volumen von 50 μl . Um das gefällte Pellet ausreichend in Lösung zu bringen, wurde der Ansatz für 30 min bei RT geschüttelt und wiederholt kurz gevortext. Anschließend wurde der Ansatz 2 min auf 95°C in einem Heizblock erhitzt, der danach ausgeschaltet wurde. Durch Isolation mit Alufolie und einem Plexiglasdeckel kühlte der Heizblock in 3 h bis auf 35°C ab. Der Hybridisierungsansatz wurde dann mit 15 μl Mini-Stop versetzt, auf ein natives 8 % PAA Gel mit 10 mM MgCl_2 aufgetragen und ÜN bei 150 V aufgetrennt. Dem Laufpuffer wurde ebenfalls 10 mM MgCl_2 zugesetzt. Nach der Elektrophorese wurde eine Autoradiographie des Gels erstellt. Der entwickelte Film diente als Schablone zum Ausschneiden der Banden der viersträngigen Hybridisierungsprodukte, die eine geringere Laufweite hatten als eventuell vorkommende drei-, zwei- oder einzelsträngige Nebenprodukte. Die Radioaktivität der ausgeschnittenen Gelstücke wurde bestimmt und pro 10.000 cpm 1 μl TE (10 mM

MgCl₂) zugesetzt. Die Elution der DNA aus den Gelstücken erfolgte unter Schütteln bei RT für 6 h. Die eluierte cruciforme DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.2.1.8 Präparation von M13mp2IR62E-RF DNA

M13mp2IR62E-RF DNA wurde nach der Methode von Jensch et al., 1989, präpariert.

3.2.1.9 PCR

PCRs wurde in Reaktionsvolumen von 100 µl in 0,5 ml Eppendorf „safelock“ Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein typischer Ansatz beinhaltete:

200	ng	Matrizen (Template) DNA
100	pmol	sense-Primer
100	pmol	antisense-Primer
10	µl	10x Polymerase-Puffer
200	µM	dNTP
1- 10	U	Polymerase (-Mix)

Die Länge der Primer wurde so gewählt, daß beide einen berechneten Schmelzpunkt im Bereich von 68-72°C haben.

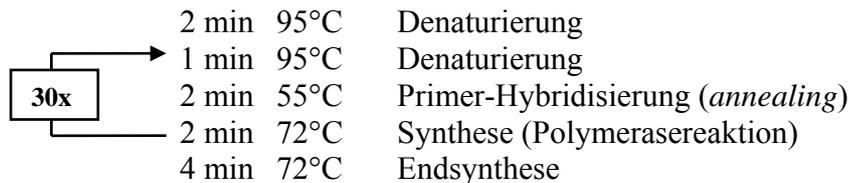
Die Ansätze wurden nach der Reaktion mit dem „PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen aufgearbeitet. Die Reaktionsprodukte gereinigten lagen danach in 30 µl Puffer E vor. Zur Isolation eines bestimmten, von mehreren Produkten, wurden die Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende Bande eluiert (3.2.1.10).

3.2.1.9.1 Amplifikation der archaealen Hjc-Gene

I.) Zur Amplifikation der archaealen Hjc-Gene wurden 2 µl der präparierten chromosomalen DNA-Lösung (3.2.1.2) als Matrize (*template*) eingesetzt. Die Synthesereaktion wurde durch 5 U Pwo-Polymerase ermöglicht. Es kamen jeweils 100 pmol der folgenden sense- / antisense-Primer (1.1.7.2.1) Kombinationen zum Einsatz:

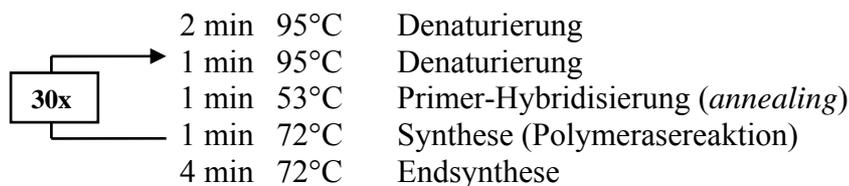
	sense	antisense
Pfu	KN100	KN107
Pho	KN101	KN108
Pab	KN114	KN115
Afu	KN102	KN109
Ape	KN103	KN110
Mja	KN104	KN111
Mth	KN105	KN112
Sso	KN106	KN113

Die PCR verlief nach folgendem Programm:



II.) Die Klonierung der archaealen Hjcs mit C-terminalem *His-tag* machte eine erneute PCR notwendig. Hierbei wurden die Stop-Codons der Hjc-Gene entfernt und eine *KpnI*-Schnittstelle zur Ligation in das entsprechende Expressionsplasmid (3.2.1.9.1, I) eingefügt.

Als *template* dienten 20 ng „Midi Prep“ DNA der Expressionsplasmide der Hjcs (Ergebnisse 5.1.2). Die sense-Primer entsprachen den Primern der oben beschriebenen PCRs zur Amplifikation der Hjc-Gene. Als antisense-Primer dienten XXX.Hjc.NoStop.as (1.1.7.2.1), wobei XXX der Abkürzung des jeweiligen Archaeons entspricht, z.B. Pfu.Hjc.NoStop.as zur Amplifikation des Pfu-Hjc ohne Stop-Codon. Für die Synthese-Reaktion wurde Pwo-Polymerase eingesetzt. Die PCR verlief nach folgendem Programm:



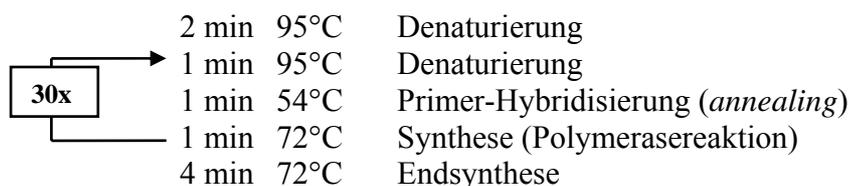
3.2.1.9.2 Mutagenese der archaealen Hjc-Gene

I) Afu-Hjc mit C-terminalem *His-tag*

Zur Klonierung der archaealen Hjcs mit C-terminalem *His-tag* wurde zunächst an das Afu-Hjc-Gen im Expressionsplasmid pKN103 ein C-terminaler *His-tag* angefügt. Dies erfolgte durch die Verwendung des antisense Primers Afu.Chis.as, der außerdem das ursprüngliche Stop-Codon eliminierte und eine neue *BamHI*-Schnittstelle am 5'-Ende, eine *KpnI*-Schnittstelle zwischen Hjc-Gen und *His-tag*-Sequenz, sowie eine Thrombin-Schnittstelle zwischen Hjc und dem *His-tag* erzeugte.

In einer ersten PCR wurde das Afu-Hjc Gen des Expressionsplasmids pKN103 amplifiziert. Als *template* für die PCR dienten 20 ng pKN103 „Midi Prep“ DNA. Diese Reaktion verlief wie in 3.2.1.9.1 beschrieben.

Das Produkt dieser PCR diente als *template* für eine zweite Reaktion. Hier wurden 100 ng des ersten PCR Produkts als *template*, sowie je 100 pmol KN102 sense Primer und Afu.Chis.as antisense Primer eingesetzt. Die Synthesereaktion erfolgte durch 5 U „Expand High Fidelity PCR Mix“ (Roche, Mannheim). Die PCR verlief nach folgendem Programm:



Das Reaktionsprodukt der zweiten PCR wurde gereinigt, mit *NdeI* und *BamHI* verdaut (1.2.1.12), wieder gereinigt und in ebenfalls *NdeI* / *BamHI* verdauten Vektor pRB371 ohne Insert ligiert (1.2.1.14). Das resultierende Plasmid war pKNch103.

II) Pfu-Afu-Hjc Chimären

Chimäre Hjcs mit wurden durch PCR basierte *in-situ*-Mutagenese konstruiert. Hierbei wurde das Pfu-Hjc Expressionsplasmid vollständig durch zwei Primer amplifiziert. Die Primer lagerten sich direkt benachbart im Bereich der auszutauschenden Domäne und der flankierenden Sequenzen an. Die 5'-Enden der Primer entsprachen hierbei in Kombination der Sequenz der zu inserierenden Afu-Domäne und waren somit nicht komplementär zum Pfu-Hjc *template* (siehe Material 1.1.7.2.1 / Ergebnisse 5.3.2).

Die Synthesereaktion erfolgte durch 5 U „Expand High Fidelity PCR Mix“ (Roche, Mannheim). Für die PCRs wurden 20 ng pKN100 „Midi-Prep“ DNA als *template* und je 100 pmol der folgenden Primer Kombinationen eingesetzt:

	sense	antisense
Afu1	PFU:AFU1:1	PFU:AFU1:2
Afu2	PFU:AFU2:1	PFU:AFU2:2
Afu3	PFU:AFU3:1	PFU:AFU3:2

Die PCRs verliefen nach folgendem Programm:

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">30x</div>	2 min 95°C	Denaturierung
	1 min 95°C	Denaturierung
	1 min 55°C	Primer-Hybridisierung (<i>annealing</i>)
	2 min 72°C	Synthese (Polymerasereaktion)
	4 min 72°C	Endsynthese

Durch Ligation der beiden Enden des linearen PCR-Produktes mit sich selbst, ergab sich wieder ein zirkuläres, transformierbares Plasmid (siehe Ergebnisse 5.3.2).

3.2.1.10 DNA-Bandenelution

PCR- und Restriktionsschnitt-Produkte wurden aus Agarose-Gelen mit Hilfe des „NukleoSpin“ Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren), nach Angaben des Herstellers präpariert. Die eluierte DNA lag in Puffer E vor.

3.2.1.11 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden im Haus mit einem „ABI Sequencer 3100“ durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit „ABI Cycle BigDye-Mix“ und 200 ng „Midi-Prep“ DNA, nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.12 Restriktionsverdau

Alle Restriktionsverdau wurden unter geeigneten Pufferbedingungen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei kombinierten Reaktion mit mehreren Enzymen wurden die Pufferbedingungen so gewählt, daß mindestens 75 % der optimalen Schnitteffizienz der Enzyme gewährleistet war.

3.2.1.13 Phosphorilierungen

Zur Phosphorilierung von PCR-Produkten und DNA-Oligonukleotiden wurde T4-Polynukleotidkinase nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.2.1.14 Ligationen

DNA-Fragmente wurden mit T4-Ligase nach Angaben des Herstellers ligiert. Um PCR-Produkte oder andere Inserts in Vektoren zu integrieren, wurden diese in dreifachem molaren Überschuß eingesetzt.

3.2.2 Proteinreinigung

Grundlage der Reinigung der Hjcs waren *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Überexpressionskulturen. Die Zellen einer 500 ml Kultur wurden mit 5000 g bei 4°C für 30 min abzentrifugiert und in 10 ml kaltem Puffer L resuspendiert. Das resuspendierte Zellpellet wurde zur Unterstützung der Lyse bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Durch Sonifizierung wurden die Zellen lysiert. Dies erfolgte auf Eis mit einem Ultraschallgenerator Sonifier 450 der Firma Branson und einer ½''-Standard-Resonator Sonde für 1 min auf Intensitätsstufe 4 bei einem Impulsanteil von 80%. Diese Prozedur wurde mit zwischenzeitlichen Abkühlungsphasen dreimal wiederholt. Die Effizienz der Lyse wurde photometrisch kontrolliert. Dem Zelllysat wurden erneut 10 ml Puffer L zugefügt, bevor durch Zentrifugation mit 30.000 g bei 4°C für 45 min Zelltrümmer und andere unlösliche von den gelösten Bestandteilen getrennt wurden. Der Überstand, das geklärte Lysat, wurde für die folgende Proteinreinigung eingesetzt.

3.2.2.1 Reinigung nativer Hjcs

3.2.2.1.1 Polymin P-Fällung

Zur Fällung der im geklärten Lysat verbliebenen DNA wurde Polymin P (pH 8, in Wasser) langsam unter Rühren bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % (w/v) zugesetzt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation mit 30.000 g bei 4°C für 30 min pelletiert, und der Überstand über Nacht gegen Puffer A dialysiert.

3.2.2.1.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Fällung des Gesamt-Proteins wurde dem dialysierten Überstand der Polymin P Fällung, langsam unter Rühren fein gemörseretes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80 % zugesetzt. Nach Zentrifugation mit 30.000 g bei 4°C für 30 min

wurde das Präzipitat in Puffer B resuspendiert und über Nacht gegen Puffer B dialysiert.

3.2.2.1.3 Erhitzung

Das Dialysat der beschriebenen Ammoniumsulfat-Fällung wurde für 30 min bei 80°C in einem Ölbad unter Schütteln erhitzt. Das ausgefallene Protein wurde mit 30.000 g bei 4°C für 30 min abzentrifugiert und verworfen.

3.2.2.1.4 Hydroxyapatit-FPLC

Eine 5 ml Hydroxyapatit-Säule (Biorad, München) wurde mit Puffer B äquilibriert. Der Überstand der beschriebenen Erhitzung wurde auf diese Säule mit einer Flußrate von 2 ml / min aufgetragen. Die Durchflußfraktion wurde aufgefangen und die Säule bis zum Erreichen der Basislinie der UV-Detektion gewaschen. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flußrate von 2 ml / min mit einem Gradienten von 0,1 M bis 1 M Kaliumphosphat in Puffer B über ein Volumen von 50 ml. Die aufgefangenen Fraktionen hatten ein Volumen von 2 ml. Vor dem Einsatz in funktionellen Untersuchungen wurden die Fraktionen in einer Durchflußkammer gegen Puffer A dialysiert.

3.2.2.2 Reinigung von Hjcs mit His-tag

Zur Reinigung von Hjcs mit *His-tag* wurden die Zellen einer 500 ml Expressionskultur in 10 ml NiLyse Puffer resuspendiert und wie beschrieben lysiert.

3.2.2.2.1 Ni-NTA Spin-Säulen

Alle Schritte der folgenden Reinigung wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei RT mit 1.800 upm für 1 min durchgeführt.

Ni-NTA Spin Säulen wurden mit 700 µl NiLyse Puffer äquilibriert. Anschließend wurde dreimal 700 µl geklärtes Lysat aufgetragen. Die Säulen wurden fünfmal mit 700 µl NiWasch Puffer gewaschen. Zur Elution wurde zweimal 200 µl NiElu100 Puffer und jeweils viermal 200 µl NiElu250 und NiElu500 Puffer eingesetzt.

Die Reinigungsfraktionen wurden bei -20°C gelagert.

3.2.2.2.2 Ni-NTA Batch

Die 50 % Ni-NTA-Agarose Suspension wurde durch fünfmalige Zentrifugation mit 500 g für 1 min bei 4°C und jeweils anschließender Resuspension des Pellets in NiLyse Puffer äquilibriert.

Zu 10 ml geklärtem Lysat wurden 3 ml äquilibrierte 50 % Ni-NTA-Agarose Suspension zugefügt und bei 4°C auf einem Roller für 2 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Leersäule überführt, die die Matrix zurückhielt und die flüssige Phase abfließen ließ. Der Durchfluß wurde aufgefangen. Die Säule wurde mit 20 ml NiWasch Puffer gewaschen. Elutionsfraktionen wurden durch Auftragen von zweimal 500 µl Elu100 Puffer sowie je viermal 500 µl Elu250 und Elu500 Puffer erhalten.

Die Reinigungsfraktionen wurden bei -20°C gelagert.

3.2.3 Arbeiten mit Proteinen

3.2.3.1 Überexpression in *E. coli*

Zur Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde 500 ml NZC Medium, mit geeigneten Antibiotika, mit einer über Nacht inkubierten Starterkultur auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft. Bei 37°C und unter Schütteln (220 upm) wurde die Kultur bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ wachsen gelassen und dann mit 1 ml 0,5 M IPTG induziert. Zur Expression des Proteins wurde die Kultur weitere 2 h unter Schütteln inkubiert.

3.2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dazu wurde 950 µl Bradfordreagenz-Lösung mit 50 µl der zu untersuchenden Probe vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD_{595} bestimmt. Für jede frisch angesetzte Bradfordreagenz-Lösung wurde mit definierten Proteinmengen eine Eichgerade angefertigt.

3.2.3.3 Endonukleolytische Reaktionen

Zwei Substrattypen wurden für die Untersuchung von Holliday-Struktur spezifischer Schnittaktivität eingesetzt.

3.2.3.3.1 Nachweis der Aktivität

Zum Nachweis der spezifischen Schnittaktivität wurde M13mp2IR62E-RF DNA eingesetzt. Ein Standardreaktionsansatz von 10 µl enthielt 100 ng M13 DNA in Hjc-Reaktionspuffer. Nach Inkubation bei 75°C für 45 min in einem PCR-Cycler mit beheiztem Deckel, wurde nach Abkühlung 10 U BamHI zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl PK-Stop-Mix und Inkubation bei 37°C für 5 min wurde die Reaktion abgestoppt. Die Produkte wurden auf einem 0,6 % Agarosegel bei 80 V für 1 h aufgetrennt.

3.2.3.3.2 Bestimmung der Schnittpositionen

Zur Ermittlung der Schnittpositionen der Reaktionen von Hjcs mit cruciformer DNA wurden synthetische 5'-³²P-markierte Substrate eingesetzt. Ein Standardreaktionsansatz von 10 µl enthielt 10 nM Substrat in Hjc-Reaktionspuffer. Nach Inkubation bei 75°C für 45 min in einem PCR-Cycler mit beheiztem Deckel wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl MG-Stop Puffer beendet. Nach Erhitzen auf 95°C für 1 min wurden die Reaktionsprodukte auf einem denaturierenden 12,5 % PAA-Gel aufgetrennt.

3.2.3.4 Dimerisierung

Die Dimerbildung der Hjcs in Lösung wurde durch chemische Quervernetzung (*crosslink*) untersucht. Hierzu wurde 1 µg Hjc in 23 µl Crosslink-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1,5 µl einer 25 % Glutaraldehyd-Lösung wurde 2 min bei RT inkubiert und dann mit 1,5 µl 2 M Glycin (pH 7,3) abgestoppt. Die

Ansätze wurden mit 14 µl 3x-SDS-Probenpuffer versetzt. 20 µl der Ansätze wurden auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt.

3.2.4 Gelelektrophoresen

3.2.4.1 DNA

3.2.4.1.1 PAA-Gelelektrophorese

PAA-Gel-Elektrophoresen wurden in vertikalen Gelkammern durchgeführt. Die Gele wurden zwischen zwei 33 x 40 cm großen Glasplatten, die durch zwei Abstandhalter voneinander getrennt und an drei Seiten abgedichtet waren, gegossen. Zur Ausbildung von Probenaschen wurde nach dem Gießen ein Kamm in die nicht abgedichtete Seite eingeführt.

Ein Ansatz für ein natives (denaturierendes) 12,5 % PAA-Gel beinhaltete:

10	ml	10x TBE
25	ml	50 % PAA
0,5	ml	10 % APS
50	µl	TEMED
(42	g	Harnstoff)
ad 100 ml H ₂ O		

Als Laufpuffer wurde TBE verwendet. Denaturierende Elektrophoresen erfolgten bei 50 W für 3 h. Hierbei wurde eine Aluminiumplatte auf die vordere Glasplatte aufgelegt, um eine gleichmäßige Hitzeverteilung im Gel zu gewährleisten. Native Gelelektrophoresen wurden bei 150 V für 15 h durchgeführt.

3.2.4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für Agarose-Gelelektrophoresen wurde Agarose in TBE durch Erhitzen gelöst und vor dem Gießen 5 µg Ethidiumbromid / ml Gel zugefügt. Als Laufpuffer diente TBE. Proben wurden vor dem Auftragen mit einer entsprechenden Menge 5x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Analyse der Gele erfolgte unter UV-Licht.

3.2.4.2 Protein

3.2.4.2.1 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht wurden SDS-PAA-Gelelektrophoresen nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Es wurde das „Mini-Protean-III“ System (Biorad, München) verwendet. Für zwei Gele wurden folgende Lösungen angesetzt.

	Sammelgel (5%)	Trenngel (15%)
50% PAA	1 ml	4 ml
1M Tris/HCl	1,25 ml (pH 6,8)	3,75 ml (pH 8,8)
H ₂ O	7,6 ml	2,1 ml
10% APS	50 µl	50 µl
10% SDS	100 µl	100 µl
TEMED	15 µl	15 µl

Zuerst wurde das Trenngel gegossen, bis etwa $\frac{3}{4}$ der Gelkammer zwischen den Glasplatten gefüllt war. Die Lösung wurde dann mit etwas Wasser überschichtet und für 1 h polymerisieren gelassen. Das überschichtete Wasser wurde entfernt und die Gelkammer mit Sammelgel-Lösung aufgefüllt. Nach Einsetzen eines Kamm zur Probenaschen Bildung wurde das Sammelgel 1 h polymerisieren gelassen.

Proben wurden mit entsprechendem Volumen 3x Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, bis der Blaumarker die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte und im Folgenden bei 200 V.

3.2.5 Gelfärbung

3.2.5.1 Coomassie

Zum sichtbar machen von Proteinbanden auf SDS-PAA-Gelen wurden diese einer Coomassie-Färbung unterzogen. Dazu wurde das Gel unter leichtem Schütteln für 1 h in Coomassie-Lösung imprägniert. Danach wurde es für 1 h in Coomassie-Entfärbelösung und anschließend ÜN in Wasser entfärbt.

3.2.5.2 Silberfärbung

Zur Visualisierung von Banden auf SDS-PAA-Gelen, die Proteinmengen von weniger als 0,2 µg entsprachen, wurden diese einer Silberfärbung unterzogen. Dazu wurden die Gele zunächst 10 min in 50 ml Lösung I fixiert. Darauf in 50 ml Lösung II für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in H₂O wurden die Gele 15 min in 50 ml Lösung III getränkt. Danach wurde in 50 ml Lösung IV entwickelt. Wurden Banden sichtbar (nach 5 – 15 min), wurde die Entwicklung in 50 ml 50 mM EDTA abgestoppt. Nach Waschen in H₂O wurden die Gele in 20 % Glycerin für 30 min inkubiert und abschließend erneut mit H₂O gewaschen.

3.2.6 Mikrobiologische Techniken

3.2.6.1 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurde 1 l NZC mit einer Starter Kultur von *E. coli* auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ wachsen gelassen. Diese Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 20 min bei 4°C mit 3000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und 20 min auf Eis kalt gestellt. Danach wurde bei 4°C für 30 min bei 2000 g abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ / 15 % Glycerin resuspendiert. Dieses 100x *E. coli* Konzentrat wurde als 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bei -80°C gelagert.

3.2.6.2 Transformationen

Für Transformationen wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. 50 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis mit 100 ng DNA für 5 min inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 45 sec auf 44°C erhitzt und anschließend für 5 min bei RT abkühlen gelassen. Nach Zusatz von 50 µl NZC Medium wurde der Ansatz auf NZC Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.7 T4-Plaquetest

Zur Titerbestimmung von Bakteriophage-T4-Suspensionen, wurden Plaquetests durchgeführt. Es wurden 100 µl von Verdünnungen der T4-Suspensionen mit 2 ml flüssigem Top-Agar, dem zuvor 100 µl einer exponentiell wachsenden *E. coli* Wirtskultur zugefügt wurden, vermischt, und bei 37°C für 5 min inkubiert. Diese Mischung wurde auf Agarplatten ausplattiert und bei RT aushärten gelassen. Nach 30 min wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

4 Ergebnisse

4.1 Homologe X-Solvasen aus Archaeen

4.1.1 Identifikation und Sequenzvergleich

In meiner Diplomarbeit (Neef, 1999) beschreibe ich den Nachweis einer X-Solvase Aktivität aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. Im Verlauf meiner weiteren Arbeiten zur Isolierung des zu Grunde liegenden Proteins und der Identifikation des entsprechenden Gens, wurde die Klonierung einer X-Solvasen Aktivität (Hjc, *Holliday junction cutting enzyme*) aus dem Euryarchaeon *Pyrococcus furiosus* publiziert (Komori et al., 1999). Dieses veranlaßte mich zu einer breiter angelegten Suche nach ähnlichen Enzymen, auf Basis von Hjc.

Zur Identifikation weiterer mutmaßlicher X-Solvasen wurde die Aminosäuresequenz von Hjc als Vorgabe für eine Datenbanksuche mittels BLAST (Altschul et al., 1997) eingesetzt. Die sieben höchstbewerteten Ergebnisse waren Sequenzen aus hyperthermophilen Archaeen. Hier fanden sich neben ORFs aus Organismen des Stammes *Euryarchaeota*, *Pyrococcus horikoshii* (Pho), *Pyrococcus abyssi* (Pab), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth), *Methanococcus janashii* (Mja), *Archaeoglobus fulgidus* (Afu), auch zwei Spezies des Stammes *Crenarchaeota*, *Sulfolobus solfataricus* (Sso) und *Aeropyrum pernix* (Ape), und deckten damit die gesamte Breite des phylogenetischen Spektrums des biologischen Reiches der Archaeen ab. Aktuell finden sich in allen 14 komplett sequenzierten archaealen Genomen Hjc-Homologe, unabhängig von ihrer phylogenetischen Verwandtschaft und ihrer spezifischen Lebensweise als hyperthermophile, methanogene oder halophile Mikroben.

Die Datenbank Identifikations Nummern (*accession numbers*) der hypothetischen Hjcs-Sequenzen sind: Mth, gp:AE000893; Afu, gb:AE000967; Pho, gb:AP000006; Pab, gb:AJ248285; Pfu, gb:AB023635; Mja, sp:Y497_METJA; Ape, gb:AP000059; Sso, gb:Y18930.

Die identifizierten hypothetischen Proteine bestanden aus 121 – 143 Aminosäuren (AS) mit einem berechneten Molekulargewicht von 13,4 bis 16,0 kDa. Die berechneten pI-Werte lagen in einem bemerkenswert basischen Bereich von 9,2 bis 10,8.

Die Homologie der hypothetischen Proteine zum Pfu-Hjc ist mit einer Sequenzidentität / -ähnlichkeit von 62 % / 76 % und 60 % / 74 % für die Sequenzen aus Pho und Pab am höchsten. Innerhalb der untersuchten Gruppe ist die Homologie für das hypothetische Protein aus Sso mit 27 % / 42 % am niedrigsten. Tabelle 4.1 faßt Ergebnisse der einzelnen Sequenzanalysen zusammen.

	Länge (AS)	Molekulargewicht (kDa)	pI	Homologie zu Pfu-Hjc (% Identität / % Ähnlichkeit)
Pfu	123	13,7	10,05	100 / 100
Pho	124	13,6	9,83	62,4 / 76,8
Pab	121	13,4	9,64	60,2 / 74
Afu	136	15,4	9,24	32,9 / 47,9
Ape	143	15,8	10,83	30,9 / 47,7
Mja	133	15,2	9,49	40,3 / 53,7
Sso	143	16,0	9,99	27,2 / 42,4
Mth	136	15,4	9,47	33,3 / 52,1
SIRV1	121	14,2	9,46	22,0 / 39,0
SIRV2	121	14,1	9,17	22,1 / 38,6

Tabelle 4.1, Sequenzanalyse der homologen Hjcs.

Biochemische Eigenschaften berechnet mit dem Programm „Vektor NTI“; Homologien berechnet mit dem Programm „Needle“ (www.ebi.ac.uk/emboss/align; Needleman and Wunsch, 1970).

Der multiple Sequenzabgleich (*alignment*) in Abb. 4.1, A, zeigt deutlich, daß ein etwa 50 AS umfassender N-terminaler Teil besonders hohe Ähnlichkeit aufweist. Hier liegen die Homologien der identifizierten mutmaßlichen Hjcs zu Pfu-Hjc zwischen 84 % / 90 % (Pho) und 39 % / 49 % (Sso). Zwölf von vierzehn in allen Sequenzen konservierten AS liegen in diesem Bereich. Sechs dieser konservierten AS bilden das Motiv G-X₃-E-X₁₀-G-X₁₁₋₁₈-D-X₁₂-E-X-K, das charakteristisch für die Familie der archaealen Holliday Junction Resolvasen (AHJR) ist. Die AHJRs sind Teil einer Superfamilie von DNasen mit einer typischen Nuklease-Faltung (Aravind et al., 2000). Das AHJR-Motiv beinhaltet das Submotiv D-X₆₋₃₀-D/E-X-K, das bei Typ II Endonukleasen konserviert ist (Daiyasu et al., 2000) und direkt an der, für die Nuklease-Aktivität notwendigen Komplexierung von Mg²⁺ beteiligt ist (Kostrewa and Winkler, 1995). Einige der konservierten AS, darunter das AHJR-Motiv für Pfu-Hjc und das Submotiv für Sso-Hjc konnten als essentiell für die Aktivität der Hjcs nachgewiesen werden (Komori et al., 2000a; Kvaratskhelia et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Mutationsanalyse sind in Abb. 4.1, A eingefügt. Nicht alle der in Pfu-Hjc als essentiell gezeigten AS waren jedoch in allen homologen Sequenzen konserviert. Der Austausch von Phenylalanin F72 zu Alanin führte bei Pfu-Hjc zu einer Inaktivierung durch die Verhinderung der Dimerbildung. Die F72 in Pfu-Hjc entsprechende AS in der Ape-Sequenz ist jedoch ein Alanin (A81) und für Sso-Hjc ein Serin (S82). Zwei andere AS die als essentiell für Pfu-Hjc gezeigt wurden (F68 und K81) unterschieden sich in den Sequenzen von Ape-Hjc (W77 und R90), wobei die Veränderungen hier konservativ waren und so die chemischen Eigenschaften an diesen Positionen erhalten blieben.

In Abb. 4.1, A stellen Pfeile über der Sequenz von Pfu-Hjc die entsprechenden Sekundärstrukturen, basierend auf einer Kristallstruktur des Enzyms (Nishino et al., 2001), dar. Die Kristallstruktur von Sso-Hjc zeigte eine ähnliche Struktur (Bond et al., 2001). Eine Sekundärstrukturvorhersage mit *PredictProtein* (Abb. 4.1, B), ergab für die anderen hypothetischen Hjcs ebenfalls übereinstimmende Sekundärstrukturen in korrespondierenden Bereichen (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>).

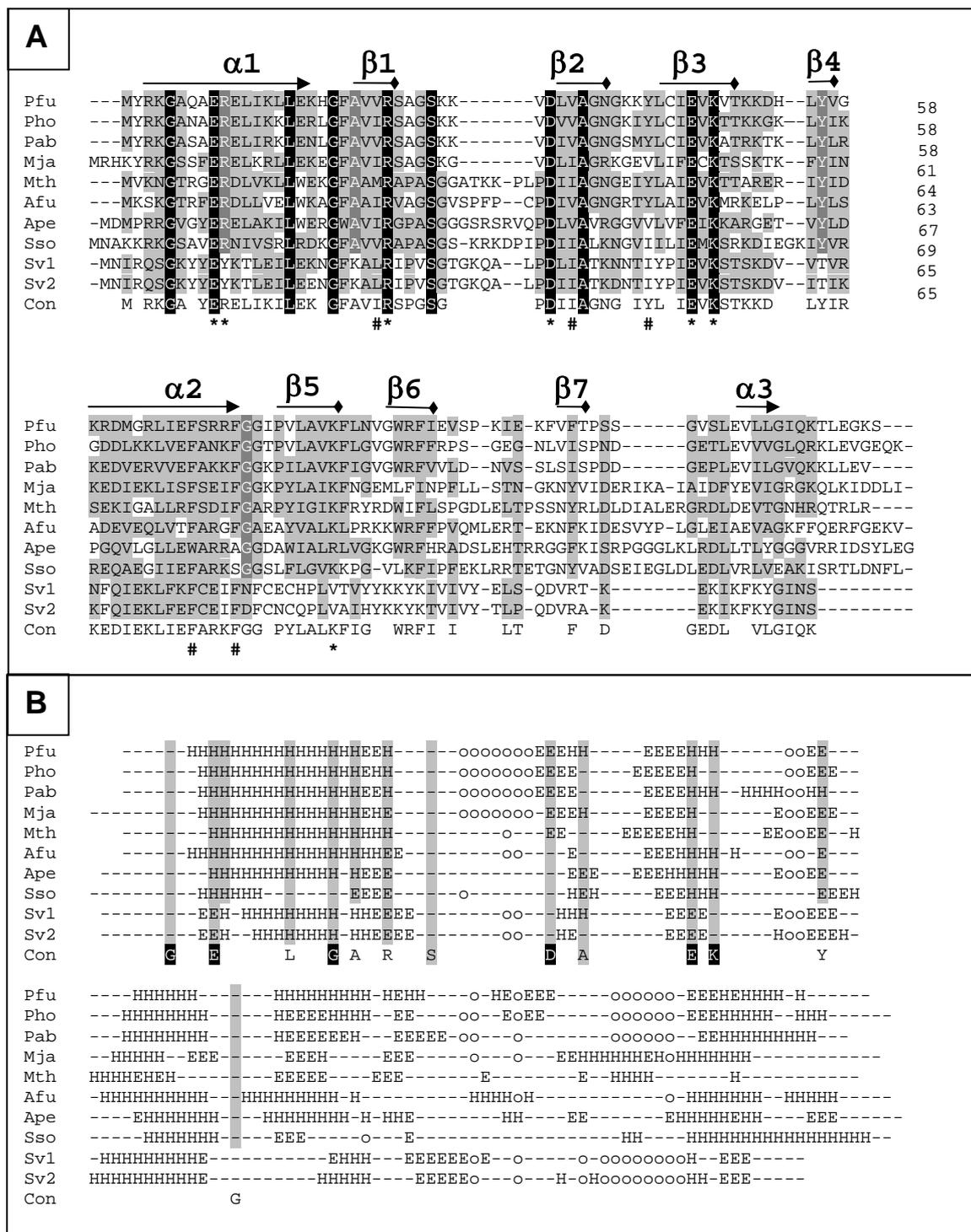


Abb. 4.1, A, Multiples Sequenz-Alignment der archaealen Hjcs. Berechnet mit dem Programm „Vector NTI“ über den „ClustalW“ Algorithmus (Thompson et al., 1994); *weiß auf schwarz*, in allen Hjcs konservierte Aminosäuren (AS); *weiß auf grau*, in den zellulären Hjcs konservierte AS; *schwarz auf grau*, konservativ ausgetauschte AS; *Pfeile* über dem Alignment, Positionen der Sekundärstrukturelemente in Pfu-Hjc; *Sterne bzw. Doppelkreuze* unter der Sequenz, Positionen essentieller AS für Schnittaktivität bzw. Dimerbildung in Pfu-Hjc.

B, Sekundärstruktur-Vorhersage für die archaealen Hjcs, berechnet mit „PredictProtein“; H, Region mit α -Helix-Struktur; E, Region mit β -Faltblatt-Struktur; *grau unterlegt*, konservierte AS; Abkürzungen der Archaeen wie in 4.1.1; Sv1 / 2, SIRV1 / 2-Hjc; Con, Konsensus-Sequenz.

Auffällig sind Unterschiede zwischen den Sequenzen vor allem in Bereichen ohne definierte Sekundärstrukturen, wie dem N-Terminus bis zur α_1 -Helix, dem Bereich zwischen β_1 - und β_2 -Strang, sowie zwischen β_3 - und β_4 -Strang. Diese variablen, strukturell flexiblen und exponierten Bereiche (*loops*) beinhalten viele basische AS und machen sie so zu Kandidaten für DNA-Interaktions-Domänen. Diese Vermutung wird durch das Modell eines Hjc-Dimers mit gebundener cruciformer DNA, basierend auf der Kristallstruktur von Pfu-Hjc (siehe Diskussion 5.1, Abb. 5.3, Nishino et al., 2001), bestärkt. Im Vergleich der homologen Sequenzen ist vor allem der Bereich zwischen den β_1 - und β_2 -Strängen, mit einer charakteristischen sieben AS umfassenden Deletion bei den pyrococcalen (Pxx) und Mja Sequenzen, hervorzuheben. Neben einer ausgeprägten Dichte an basischen AS in diesem Bereich bei den Pxx-Hjcs und Sso-Hjc und dem Vorkommen einzelner positiver Ladungen bei den übrigen Hjcs, fehlen diese bei der Afu-Sequenz in diesem Bereich völlig. Die Verteilung und Häufung von basischen AS innerhalb der α_1 -Helix ist im Vergleich der einzelnen Sequenzen ebenfalls markant.

Diese Beobachtungen waren der Auslöser zu einer vergleichenden Untersuchung der spezifischen Schnittaktivitäten der einzelnen hypothetischen Hjcs.

4.1.2 Klonierung der homologen archaealen Hjcs

Die codierenden Sequenzen der hypothetischen Hjcs sollten über PCR direkt aus genomischer DNA der unterschiedlichen Archaeen amplifiziert und dann in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden, die eine heterologe Expression in *E. coli* ermöglichen.

Von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) wurden Starterkulturen der Archaeen mit den homologen Sequenzen bezogen. Die *Pyrococcus abyssi* Kultur war ein Geschenk der Arbeitsgruppe Suck (EMBL, Heidelberg). Außerdem wurde eine laboreigene *Sulfolobus islandicus* (Lal 14) Kultur verwendet.

Aus den Starterkulturen wurde genomische DNA präpariert. Diese dienten als Matrize für PCRs mit Primern, die zwischen 24 und 28 Nukleotiden komplementäre

Sequenzen zu den Anfangs- oder Endsequenzen der identifizierten offenen Leseraster der hypothetischen Hjcs enthielten. Die 5'-Enden der Primer enthielten Sequenzen, die Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt einfügten, die es in einen geeigneten Expressionsvektoren klonierbar machten. Durch den Einsatz der in 3.1.7.2.1 beschriebenen Primer trugen die PCR-Produkte Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NdeI* am 5'-Ende und *KpnI* am 3'-Ende des Gens. Im Fall von Pho wurde auf Grund einer internen *KpnI*-Schnittstelle eine *SacI*-Schnittstelle am 3'-Ende des Gens erzeugt.

Die PCRs ergaben Produkte der erwarteten Längen von etwa 400 bp. Aus präparativen Agarose-Gelen wurden die Banden der PCR-Produkte ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Nach Verdau mit *NdeI* und *KpnI* (Pho: *SacI*) wurden die Produkte in ebenfalls *NdeI* / *KpnI* (Pho: *NdeI* / *SacI*) verdauten Vektor ligiert. Als Vektor diente ein pET11a (Studier et al., 1990) Derivat namens pRB371 (eigenes Labor).

Die resultierenden Expressionsvektoren, mit den eingefügten codierenden Sequenzen der hypothetischen archaealen Hjcs, wurden in folgender Weise benannt:

Pfu-Hjc: pKN101; Pho-Hjc: pKN102; Pab-Hjc: pKN110; Afu-Hjc: pKN103;
Ape-Hjc: pKN104; Mja-Hjc: pKN105; Sso-Hjc: pKN106; Mth-Hjc: pKN107

Die in den Expressionsvektoren integrierten codierenden Sequenzen der hypothetischen Hjcs wurden von beiden Seiten sequenziert und entsprachen den in Datenbanken enthaltenen Sequenzen. Im Fall des PCR-Produktes aus der Reaktion mit genomischer DNA aus *Sulfolobus islandicus* als Matrize ergab sich für das amplifizierte Gen die gleiche Sequenz wie für Sso-Hjc, so daß dieses Hjc nicht weiter untersucht wurde.

4.1.3 Expression und Reinigung der rekombinanten Hjcs

Mit den Expressionsvektoren pKN101 – 107 und pKN110 wurden kompetente *E. coli* (DE3) CodonPlus Zellen transformiert. Einzelne Kolonien dieser Transformationen dienten zur Inokulation von Starterkulturen für 500 ml Expressionskulturen. Nach Induktion der Expression und weiterem Wachstum für 2 h wurden deutliche Banden der zu erwartenden Laufweite auf SDS-PAGE sichtbar, die vor Induktion nicht zu erkennen waren (Abb. 4.2, A, K- und K+).

Die in Methoden (1.2.2.1) beschriebene Reinigung führte zur Isolierung des Proteins der induzierten Bande und somit zur Reinigung der rekombinanten Hjcs.

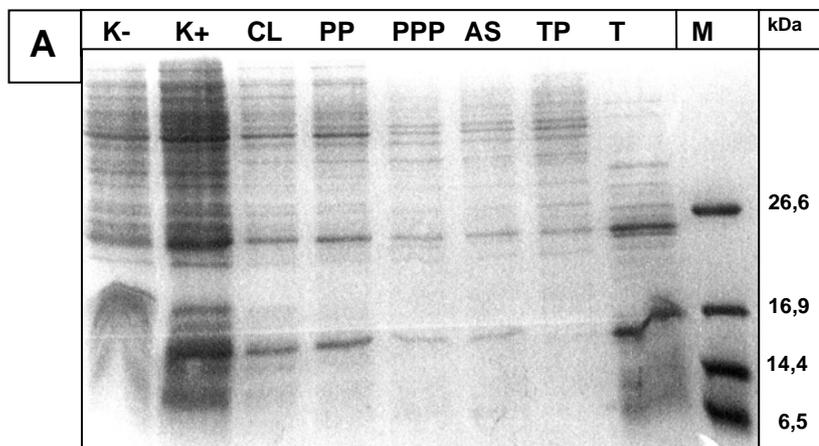


Abb. 4.2, A, Reinigungsfractionen von Mja-Hjc vor FPLC. SDS-PAGE (15 %) von Reinigungsfractionen einer Mja-Hjc Expressionskultur; aufgetragen sind 10 μ l der unverdünnten Reinigungsfractionen, mit Ausnahme von CL und PPP: 1:20 verdünnt, AS: 1:50 verdünnt, T: 1:5 verdünnt; nach der Elektrophorese wurde das Gel Coomassie gefärbt; K- / +, Expressionskultur vor / nach Induktion; CL, geklärtes Lysat; PP / PPP, Überstand / Pellet nach Polymin P-Fällung; AS, resuspendiertes Pellet der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung; TP, Pellet nach Erhitzen; T, Fraktion gelöster Proteine nach Erhitzen; M, Marker mit Proteinen definierter Molekulargewichte.

Hierbei wurde zunächst die noch in Lösung befindliche DNA der geklärten Lysate durch eine Fällungsreaktion mit Polymin P entfernt (Abb. 4.2, A, PP und PPP), um mögliche kompetitive Effekte bei der Hydroxyapatit-Affinitätschromatographie, dem letzten Schritt der Reinigung, auszuschließen. Die anschließende Gesamtproteinfällung wurde durch eine 80 % Sättigung mit Ammoniumsulfat erreicht und führte, nach Resuspendierung, zur Konzentration und Umpufferung der Proteinfraction (Abb. 4.2, A, AS). Eine Umpufferung von Polymin-P haltigen Lösungen durch Dialyse ist durch den hohen Vernetzungsgrad problematisch. Die

Proteinlösungen wurde durch eine Erhitzung auf 80°C für 30 min weiterbehandelt. Hierbei fällt bis zu 70 % des in Lösung verbliebenen Proteins aus, wobei das archaeale Zielprotein überwiegend in Lösung blieb (Abb. 4.2, A, T und TP). Dieser effiziente Reinigungsschritt ist durch die Thermostabilität der archaealen Proteine möglich und ist ein genereller Vorzug bei der heterologen Expression dieser Proteine in dem mesophilen *E. coli* System.

Durch die Fällungsreaktionen wurde der Anteil an induziertem Protein von etwa 5 % im geklärten Lysat auf über 50 % in der letzten Reinigungsfraction angereichert. Die Fraction nach dem Erhitzen erhielt noch 20 % des Gesamtproteins des geklärten Lysats und keine nachweisbare DNA. Zur weiteren Reinigung der rekombinanten Hjcs, wurde eine Hydroxyapatit-Chromatographie durchgeführt (Abb. 4.2, B), die eine Isolierung des induzierten Proteins in Elutionsfractionen ermöglichte. Die zur Elution der hypothetischen Hjcs notwendigen Bedingungen variierten jedoch in den

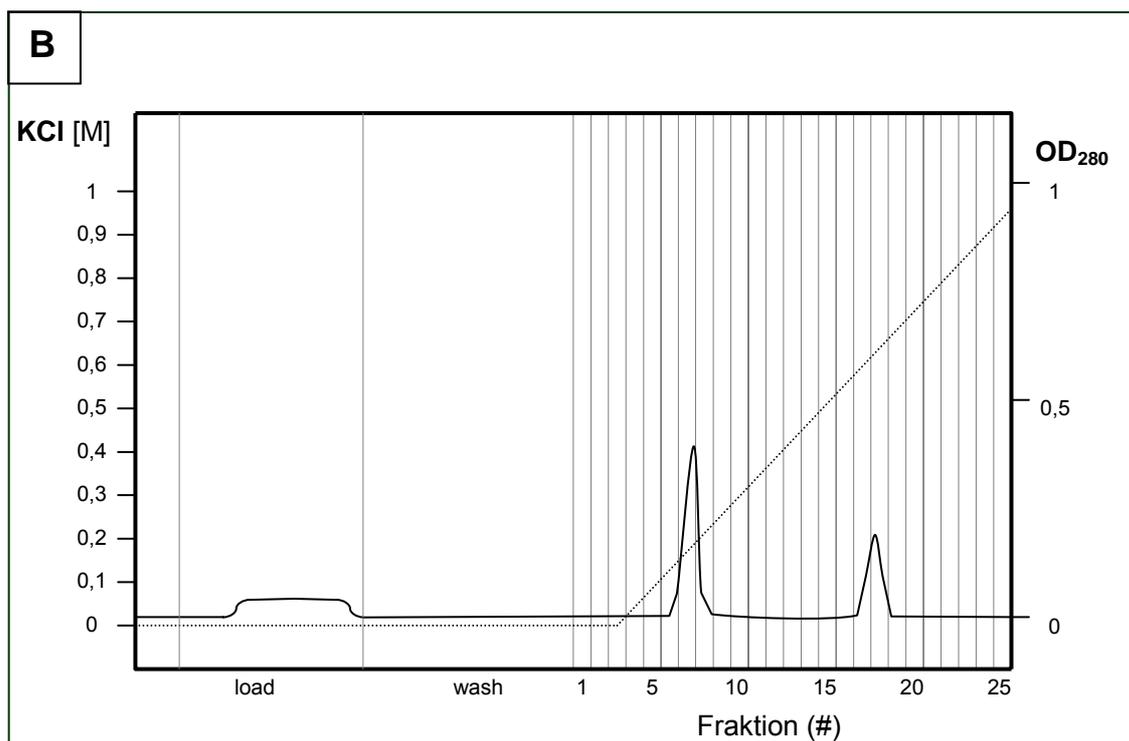


Abb. 4.2, B, Elutionsprofil der Reinigung von Mja-Hjc über FPLC. 10 ml des Überstands nach Erhitzen (Abb. 4.2, A, Spur T) wurden auf eine 5 ml Hydroxyapatit-Säule aufgetragen; die Reinigung erfolgte unter den beschriebenen Bedingungen (3.2.2.1).

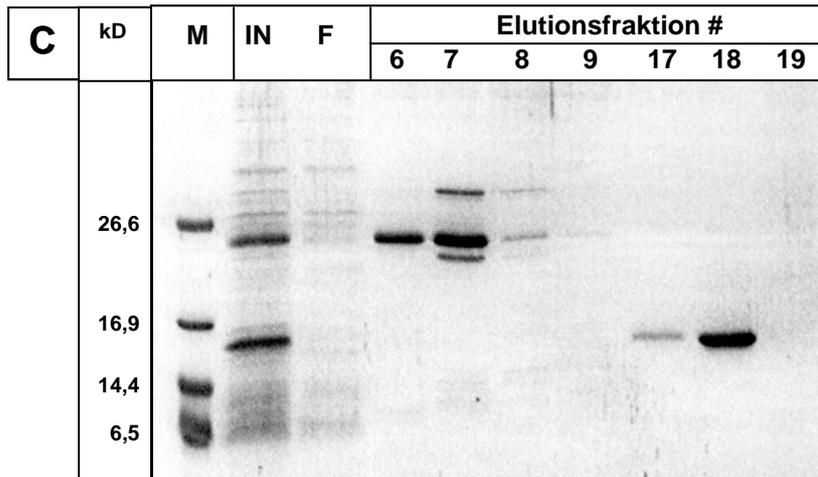


Abb. 4.2, C, Fraktionen der Reinigung von Mja-Hjc über FPLC. 10 μ l der Fraktionen (IN: 1:5 verdünnt; entspricht Abb. 4.2, A, Spur T) wurden über SDS-PAGE (15 %) aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt; IN, Input; F, Durchflußfraktion; Elutionsfraktionen, siehe Elutionsprofil (Abb. 4.3, B); M, Markerspur mit Proteinen definierter Molekulargewichte.

einzelnen Fällen. Fraktionen mit mehr als 90 % reinem Hjc wurden bei 0,2 M KCl für Sso-Hjc und Mth-Hjc, bei 0,5 M KCl für Pxx-Hjc, Ape-Hjc und Afu-Hjc und 0,6 M KCl für Mja-Hjc (Abb. 4.2, C), eluiert.

Der Reinigungserfolg wurde durch SDS-PAGE der Fraktionen mit anschließender Coomassie Färbung verfolgt und ihre Aktivität mit Hilfe des M13-Substrat-Tests kontrolliert.

Abbildungen 4.2, A-C zeigen exemplarisch die Reinigung von Mja-Hjc.

Die Ausbeute an sauberem Hjc lag in einem Bereich von 0,5 mg bis 5 mg pro 500 ml Expressionskultur. Die Positionen der Banden der gereinigten Hjcs bei Analyse durch SDS-PAGE stimmten nicht mit ihrem berechneten Molekulargewicht überein (Abbildung 4.3). Alle Proteine zeigten ein verzögertes Laufverhalten, jedoch in unterschiedlichen Ausmaßen. Dieses aberrante Laufverhalten wurde auch schon bei den gereinigten Pfu-Hjc und Sso-Hjc beobachtet (Nishino et al., 2001; Kvaratskhelia and White, 2000), und für andere Proteine mit hoher Polarität beschrieben (Lee, 1991; Query, 1989). Die Nachweisgrenze der Färbung der Proteingele läßt auf eine Reinheit der Hjcs in den höchstangereinigten Fraktionen von mehr als 95 % schließen, wobei jedoch im Fall von Mth-Hjc zwei zusätzliche schwache Banden auf dem Gel erkennbar waren.

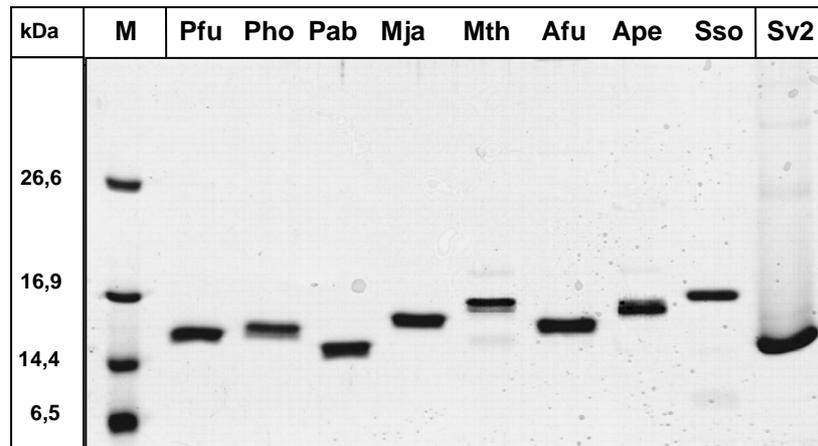


Abb. 4.3, Gereinigte archaeale Hjcs. Pro Spur wurden 1 μ g gereinigtes Hjc aufgetragen und über SDS-PAGE (15 %) aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt; M, Spur mit Markerproteinen definierten Molekulargewichts.

4.1.4 Dimerbildung von Hjc

Alle bislang bekannten Holliday-Struktur auflösenden Resolvasen liegen in aktiver Form als Homodimere vor. Dieses wurde für Pfu-Hjc und Sso-Hjc bereits bestätigt. Im Fall von Pfu-Hjc wurden außerdem essentielle Aminosäuren für die Dimerisierung nachgewiesen. Die in 4.1.1 beschriebene Sequenzanalyse, ergab jedoch teils deutliche Unterschiede auf diesen Positionen in den Sequenzen der hypothetischen Hjcs.

Zur Analyse des nativen Zustandes in Lösung befindlicher Hjcs wurde eine chemische Quervernetzung (*cross-link*) mittels Glutaraldehyd durchgeführt. Hierbei werden Proteine oder Peptide über ihre primären Aminogruppen kovalent miteinander verknüpft, wenn sie in einer dauerhaften räumlichen Nähe zueinander vorliegen. Das ist bei moderat konzentrierten Proteinlösungen nur möglich, wenn die verknüpften Proteine als Untereinheiten in einem Komplex verbunden waren. Bei Analyse auf denaturierenden SDS-Gelen bleibt der Multimerkomplex erhalten und läßt sich auf Grund seiner Laufweite im Vergleich zum Monomer einordnen.

In Abbildung 4.4 läßt sich für alle gereinigten Hjcs in den mit Glutaraldehyd versetzten Ansätzen eine deutliche Bande in einer Laufweite, die dem doppelten Molekulargewicht des Monomers entspricht, erkennen. Dieses bestätigt den

erwarteten Homodimer-Zustand gelöster Hjcs. Auch für Ape-Hjc bleibt, trotz des Austauschs auf der Position des für Pfu-Hjc essentiellen Phenylalanin F72, die Fähigkeit zur Dimerisierung erhalten.

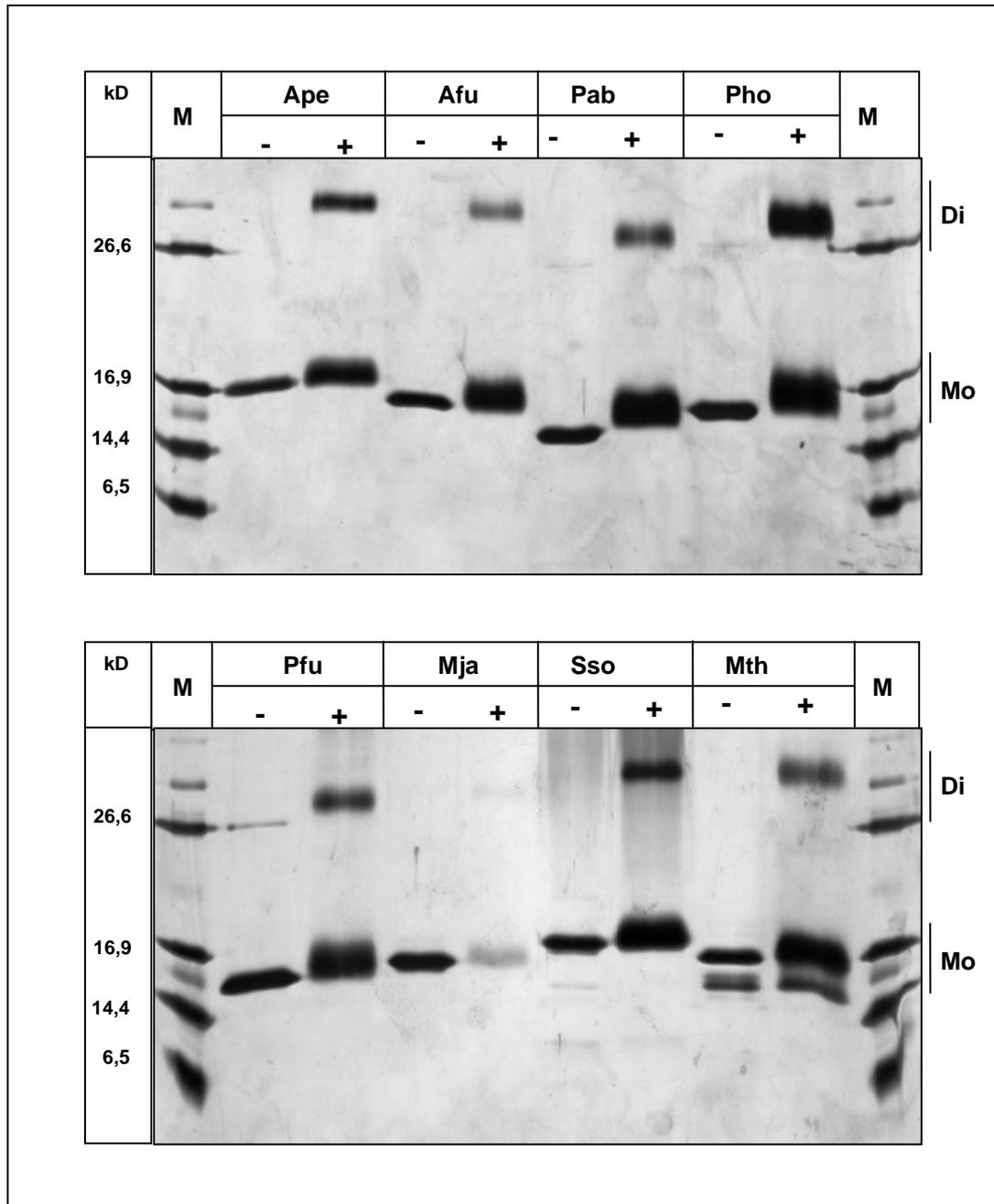


Abb. 4.4, Cross-link der archaealen Hjcs mit Glutaraldehyd. Die kompletten 20 μ l Ansätze des *cross-link* Experiments, mit 1 μ g eingesetzten Hjc, wurden aufgetragen und über SDS-PAGE (15 %) analysiert; Proteinbanden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht; -, Kontrollansatz ohne Glutaraldehyd; +, *cross-link* Ansatz mit 0,15 % Glutaraldehyd; M, Markerspur mit Proteinen definierter Molekulargewichte; *Mo* und *Di* zeigen Positionen monomerer und dimerer Hjcs an.

4.1.5 Endonukleolytische Aktivitäten der Hjcs mit cruciformer DNA

Holliday-Junction-Resolvasen (X-Solvasen) schneiden ihr Substrat durch das paarweise symmetrische Einfügen von Brüchen in gegenüber liegenden Einzelsträngen der cruciformen DNA. Die Spezifität des jeweiligen Enzyms bestimmt die Position und Effizienz dieser Einzelstrangbrüche im umgesetzten Substrat.

Die Schnittspezifitäten der archaealen Hjcs wurden für zwei synthetische cruciforme DNA Substrate bestimmt:

1. die cruciforme DNA CFKla01 (3.1.8.1.1) mit partieller Sequenzhomologie über 10 bp im Zentrum der Struktur, die eine Verschiebung des Kreuzungspunktes innerhalb dieses Bereiches ermöglicht (Schenkelwanderung, *branch migration*)
2. das von CFKla01 abgeleitete Substrat CFKla11 (3.1.8.1.2) mit fixiertem Kreuzungspunkt.

Beide Substrate sind bis 80°C thermisch stabil (Neef, 1999). Dieses ermöglicht Reaktionsbedingungen nahe den natürlichen Umgebungstemperaturen hyperthermophiler Organismen.

Das Substrat mit mobilem Kreuzungspunkt wurde eingesetzt, um unterschiedliche Sequenzen unmittelbar an der Kreuzung der DNA-Stränge bereitzustellen. Bei einer Sequenzspezifität der Hjcs erhöht dies die Wahrscheinlichkeit des Nachweises der Aktivität, und kann dabei mögliche Präferenzen für bestimmte Sequenzen ermitteln.

Cruciforme DNA liegt unter physiologischen Bedingungen mit Mg^{2+} -Konzentrationen von 10 mM in einer spezifischen Konformation vor, der *stacked-X* Struktur (siehe Einleitung, 1.3). Hierbei stapeln sich jeweils zwei Arme der cruciformen DNA zu insgesamt zwei quasi-durchgängigen Helices, zwischen denen im Kreuzungspunkt Einzelstränge ausgetauscht werden. Es ergeben sich also zwei strukturell unterscheidbare Paare von Einzelsträngen: die in jeweils einer Helix

durchgehenden (*contiuous*) und die zwischen den Helices wechselnden (*exchange*) Einzelstränge.

Für jede cruciforme DNA können zwei Konformere existieren, die sich durch die Wahl der benachbarten Arme, die zu Helices in der *stacked-X* Struktur gestapelt sind, unterscheiden. Hierbei ist die Sequenz am Kreuzungspunkt Ausschlag gebend für die Bildung eines Konformers bzw. für das Verhältnis, in dem beide Konformere vorliegen. Eine mögliche Sequenzspezifität von X-Solvasen muß also immer auch unter dem Gesichtspunkt der Strukturspezifität betrachtet werden, da die Sequenz am Kreuzungspunkt direkt Einfluß auf die Struktur der cruciforme DNA ausübt.

Das Substrat CFK1a11 mit fixiertem Kreuzungspunkt lag demnach in allen Reaktionsansätzen in einer charakteristischen Mischung von zwei Konformeren vor, die von der invarianten Sequenz am Kreuzungspunkt bestimmt wird.

Im Fall der mobilen cruciformen DNA CFK1a01 ergaben sich durch die Fähigkeit zur Schenkelwanderung zehn mögliche, strukturell unterscheidbare DNAs, die jeweils in zwei möglichen, durch die jeweilige Sequenz am Kreuzungspunkt bestimmten Konformationen vorliegen können. Das sind also potentiell zwanzig verschiedene strukturell unterscheidbare Zustände.

Für die Reaktionen der Hjcs wurden beide Substrate aus jeweils einer Präparation eingesetzt. Die Verteilung und die Verhältnisse der Konformere, die Substrat-Population, ist also in den Reaktionsansätzen mit unterschiedlichen Hjcs identisch. Die Ergebnisse ließen sich aber auch mit weiteren Substratpräparationen reproduzieren, was die Determinierung einer bestimmten DNA für eine bestimmte Struktur bestätigt und eine zufällige Ausbildung und Verteilung von Konformeren während der Präparation ausschließt.

Die Reaktionen wurden mit 10 nM Substrat und 30 nM gereinigtem Hjc bei 75°C für 45 min unter für Sso-Hjc und Pfu-Hjc optimierten Bedingungen durchgeführt. Variable Enzymkonzentrationen führten nicht zu Veränderungen in der Schnittposition, sondern nur zur Abschwächung der Effizienz der Reaktion.

Alle archaealen Hjcs führten in Reaktionen mit beiden Substraten Paare von symmetrischen Einzelstrangbrüchen in gegenüberliegenden Einzelsträngen ein (Abb.4.5 und 4.7). Die gegenüberliegenden Einzelstränge sind 01/03 und 02/04 für CFKla01 und 11/13 und 12/14 für CFKla11. Schnitte an symmetrischen Positionen in diesen Paaren definieren somit jeweils die beiden möglichen Schnittachsen diagonal über die zentrale Kreuzung des Substrats.

Die eingeführten Einzelstrangbrüche lagen in jedem Fall in 3'-Richtung vom Kreuzungspunkt (Abb. 4.6 und 4.8). Bei beiden Substraten waren die Schnittpositionen in gegenüberliegenden Einzelsträngen identisch. Die Produkte der Auflösungsreaktion über eine Schnittachse waren somit in allen Fällen Doppelstränge mit versetzt eingefügten Einzelstrangbrüchen, ohne Einzelstrangüberhänge oder Einzelstranglücken.

4.1.5.1 *Cruciforme DNA CFKla11 mit fixiertem Kreuzungspunkt*

Alle acht zellulären Hjcs schnitten CFKla11 an identischen Positionen, drei Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkt (Abb. 4.5 und 4.6). Dies ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Schnittpositionen von Pfu-Hjc und Sso-Hjc mit anderen cruciformen Substraten ohne mobilem Kreuzungspunkt (Komori et al., 1999; Kvaratskhelia and White, 2000c). Alle Hjcs zeigten eine deutliche Präferenz für die Schnittachse 12/14, mit einer Schnitteffizienz von mehr als 80 % (Abb. 4.5, A, B), im Vergleich zur Schnittachse 11/13, mit maximal 10 % Schnitteffizienz (Abb. 4.5, C, D) bei den pyrococcalen Hjcs (Spuren 1-3). Da die Sequenz der geschnittenen Nukleotidstränge für beide Schnittachsen identisch war, kann man schließen, daß die Struktur des Substrats Ausschlag gebend war für die Auswahl der zu schneidenden Einzelstränge und somit der Schnittachse des Substrats. Für Sso-Hjc, einer weiteren Holliday-Struktur spezifischen Resolvase aus *S. solfataricus*, wurde bereits für ein Substrat mit definierter *stacked-X* Konformation gezeigt, daß ausschließlich die durchgehenden Einzelstränge der cruciformen DNA geschnitten wurden (Kvaratskhelia and White, 2000c), diese jedoch nur zwei Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkt entfernt. Die gleiche Publikation beschreibt Sso-Hjc als nicht präferentiell für eine der Schnittachsen, sondern als ebenso nukleolytisch aktiv in den

durchgehenden, wie den wechselnden Einzelsträngen. Dieses steht im Widerspruch zu der Reaktion von Sso-Hjc mit CFK1a11 (Abb. 4.5, Spuren 8).

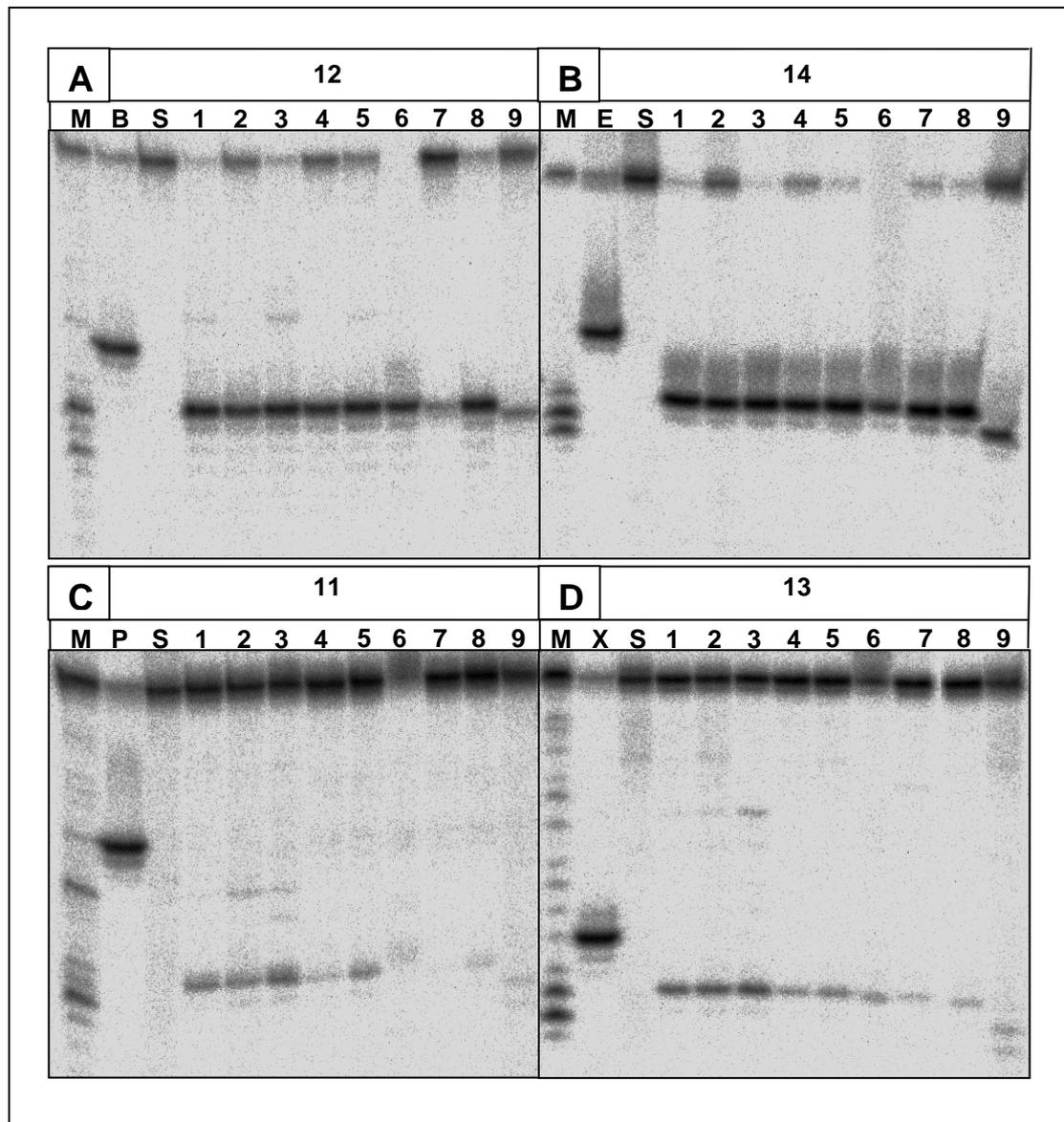


Abb. 4.5, A-D, Schnittreaktionen der archaealen Hjcs mit der fixierten cruciformen DNA CFK1a11. 10 nM des Substrats CFK1a11 wurden mit 30 nM der archaealen Hjc für 45 min bei 75°C inkubiert und anschließend auf einem denaturierenden PAA-Gel (12,5 %) aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. Das Substrat war an den angezeigten DNA-Oligonukleotiden (A, Strang 12; B, Strang 14; C, Strang 11; D, Strang 13) am 5'-Ende radioaktiv markiert;

1, Pfu-Hjc; 2, Pho-Hjc; 3, Pab-Hjc; 4, Mth-Hjc; 5, Ape-Hjc; 6, Mja-Hjc; 7, Afu-Hjc; 8, Sso-Hjc; 9, SIRV2-Hjc; M, Markerspur mit DNaseI verdautem Substrat; S, nur Substrat; B, E, P, X, Spuren mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Xba*I verdautem Substrat zur Kontrolle des Substrats und als Längenmarker zur Bestimmung der Schnittpositionen in Verbindung mit M.

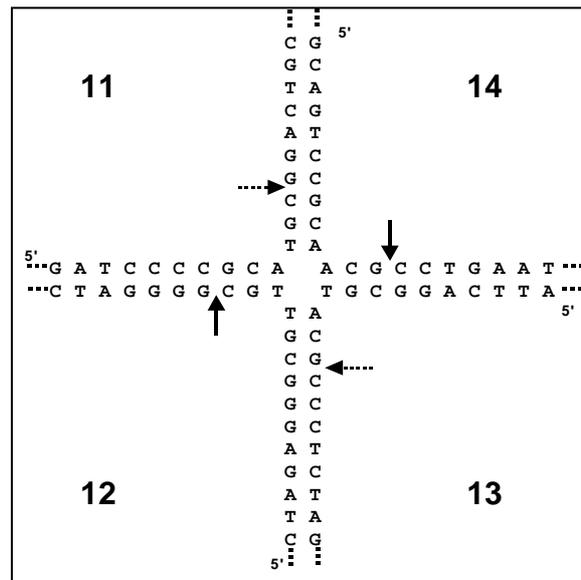


Abb. 4.6, Positionen der Schnitte der archaealen Hjcs in der fixierten cruciformen DNA CFKla11. Dargestellt ist die Sequenz im Zentrum der cruciformen DNA; die Pfeile bezeichnen die Positionen der durch die Hjc eingefügten Einzelstrangbrüche (siehe Abb. 4.5, A-D); *durchgehender Pfeil*, Hauptschnittpositionen; *gestrichelter Pfeil*, Nebenschnittpositionen (Effizienz < 10 %); 11-14, DNA-Einzelstränge der cruciformen DNA.

4.1.5.2 *Cruciforme DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt*

Mit dem Einsatz der cruciformen DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt änderten sich die Ergebnisse der Reaktionen der einzelnen Hjcs deutlich (Abb. 4.7). Zum einen unterschieden sich Schnittpositionen der Hjcs, die bei CFKla01 noch übereinstimmend waren, deutlich voneinander, zum anderen zeigten auch die, bei CFKla11 noch übereinstimmenden Präferenzen für eine Schnittachse deutliche Unterschiede. Afu-Hjc zeigte eine starke Präferenz für Schnittachse 01/03 (Abb. 4.7, A, B, Spur 7) und kaum erkennbare Aktivität für 02/04 (Abb. 4.7, C, D, Spur 7). Im Kontrast hierzu schnitt Mja-Hjc mit großer Vorliebe Schnittachse 02 / 04 (Abb. 4.7, A-D, Spur 6). Bei den anderen Hjcs zeigte sich in der Summe der Effizienzen der einzelnen Schnitte in etwa ein Gleichgewicht für beide Schnittachsen.

Alle Schnittpositionen der Hjcs für CFKla01 sind in Abb. 4.8, A-D, zusammengefaßt. Bei Auflösung des Substrats über die Schnittachse 01/03 lagen alle Einzelstrangbrüche in einem Bereich von sechs Nukleotiden, beginnend zwei Nukleotide vom Zentrum der Homologie entfernt. Die pyrococcalen (Pxx-), Mth- und Ape-Hjc schnitten an den gleichen vier Positionen, jedoch mit unterschiedlichen Effizienzen (Abb. 4.8, A). Mja-Hjc schnitt gleichmäßig schwach an drei Positionen (Abb. 4.8, B). Afu-Hjc schnitt an drei Positionen, jedoch an anderen als Mja-Hjc, mit zweimal mit niedriger und einmal mit sehr hoher (ca. 60 %) Schnitteffizienz (Abb. 4.8, C). Sso-Hjc zeigte zwei deutliche und einen schwachen Schnitt (Abb. 4.8, D). Bei Analyse der Schnittachse 02/04 zeigte sich die gleiche Gruppierung der Hjcs bezüglich der Positionen der eingefügten Einzelstrangbrüche. Alle Schnitte wurden an zwei Positionen, vier und fünf Nukleotide 3' des Zentrums der Homologie eingefügt (Abb. 4.8). Die Pxx-, Mth- und Ape-Hjcs schnitten beide Positionen, jedoch mit unterschiedlichen Effizienzen (Abb. 4.8, A). Mja schnitt mit hoher Effizienz (> 90 %) nur an einer Position, vier Nukleotide 3' vom Homologiezentrum entfernt (Abb. 4.8, B). Sso-Hjc schnitt ausschließlich fünf Nukleotide 3' vom Zentrum entfernt (Abb. 4.8, C). Bei Afu-Hjc ließ sich kein Schnitt über die Achse 02/04 nachweisen (Abb. 4.8, D). Bei der Auswertung wurden Nebenschnitte mit einer Effizienz von weniger als 5 % nicht berücksichtigt.

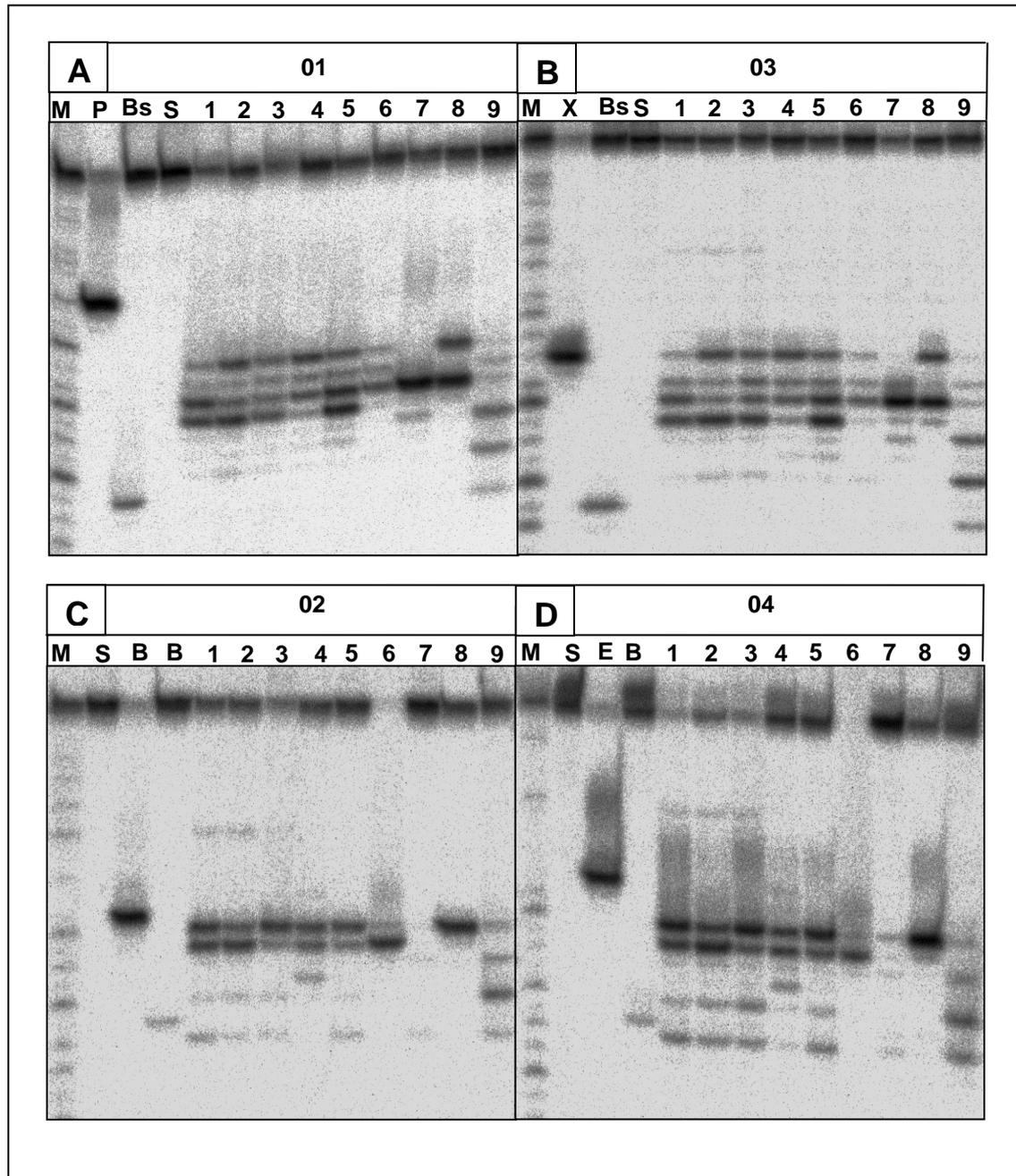


Abb. 4.7, A-D, Schnittreaktionen der archaealen Hjcs mit der cruciformen DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt. 10 nM des Substrats CFKla01 wurden mit 30 nM der archaealen Hjc für 45 min bei 75°C inkubiert und anschließend auf einem denaturierenden PAA-Gel (12,5 %) aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. Das Substrat war an den angezeigten DNA-Oligonukleotiden (A, Strang 01; B, Strang 03; C, Strang 02; D, Strang 04) am 5'-Ende radioaktiv markiert; 1, Pfu-Hjc; 2, Pho-Hjc; 3, Pab-Hjc; 4, Mth-Hjc; 5, Ape-Hjc; 6, Mja-Hjc; 7, Afu-Hjc; 8, Sso-Hjc; 9, SIRV2-Hjc; M, Markerspur mit DNaseI verdaulichem Substrat; S, nur Substrat; B, E, P, X, Bs, Spuren mit *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *XbaI*, *BsiWI* verdaulichem Substrat zur Kontrolle des Substrats und als Längenmarker zur Bestimmung der Schnittpositionen in Verbindung mit M.

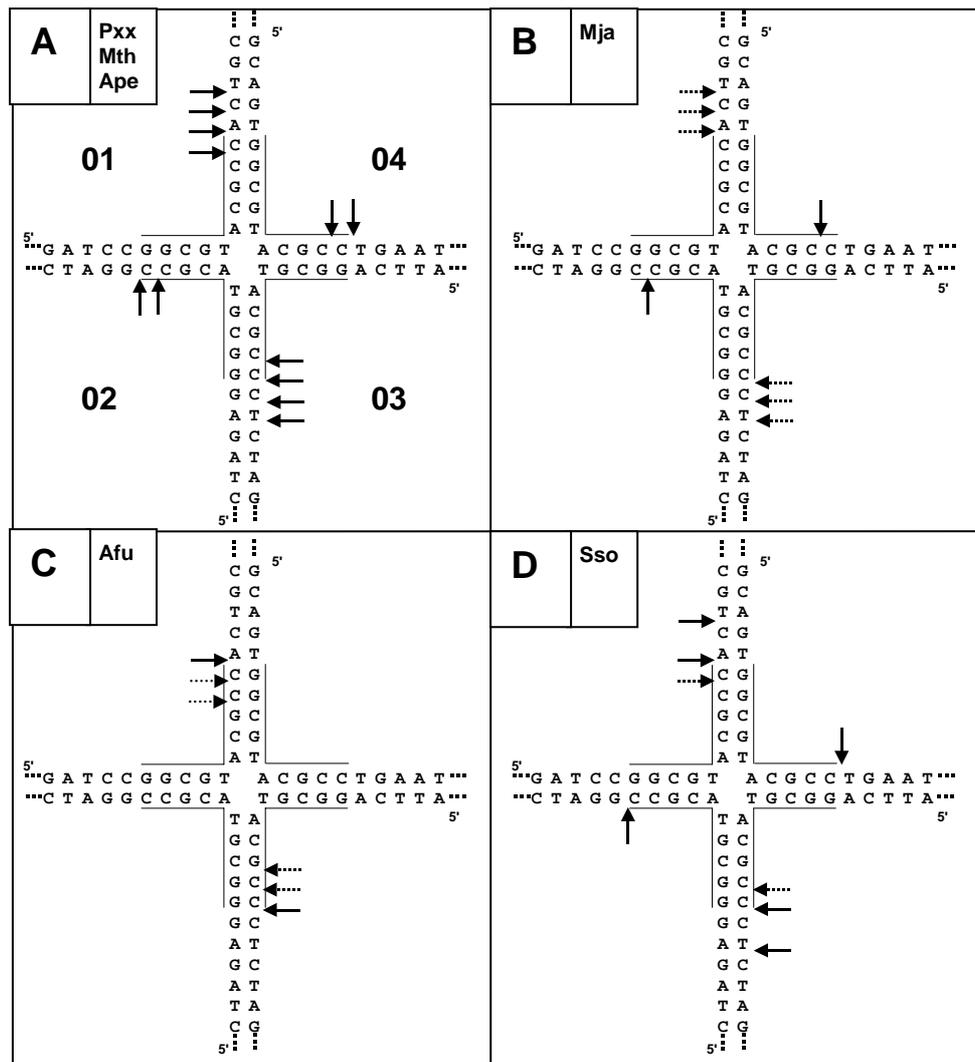


Abb. 4.8, A-D, Positionen der Schnitte der archaischen Hjcs in der cruciformen DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt. Dargestellt ist die Sequenz im Zentrum der cruciformen DNA; die Pfeile bezeichnen die Positionen, der durch die Hjcs eingefügten Einzelstrangbrüche (siehe Abb. 4.7, A-D). Die mobile homologe Region um den Kreuzungspunkt ist durch eine anliegende Markierung kenntlich gemacht. Die Positionen der Hjcs mit identischem Schnittmuster wurden zusammengefasst (A, Pxx, Mth, Ape); *durchgehender Pfeil*, Hauptschnittpositionen; *gestrichelter Pfeil*, Nebenschnittpositionen (Effizienz < 10 %); 01-04, DNA-Einzelstränge der cruciformen DNA.

Bei Vergleich der Schnittmuster der archaischen Hjcs mit CFKla01 und CFKla11 ist in erster Linie die Zunahme der Variabilität der Schnittpositionen für die mobile cruciforme DNA hervorzuheben. Die Schnittpositionen bei CFKla01 lagen aber trotz ihrer Streuung in allen Fällen, bei entsprechender Schenkelwanderung, drei Nucleotide 3' des Kreuzungspunktes und somit wieder in Übereinstimmung zur Reaktion mit CFKla11. Es bleibt der Kontrast von einheitlichen Positionen der Schnitte mit ähnlicher Effizienz bei Reaktionen von unterschiedlicher Hjcs mit einem Substrat mit eingeschränkter struktureller Variabilität wie CFKla11, zu den deutlichen Eigenheiten einzelner, bzw. Gruppen von Hjcs in Reaktionen mit dem Substrat

CFK1a01, das den archaealen Hjcs erlaubt, präferierte Konformationen zu schneiden und mit anderen nicht zu reagieren.

4.2 Homologe Hjcs aus den archaealen Viren SIRV1 und SIRV2

4.2.1 Identifikation und Sequenzhomologie

Neben den homologen Sequenzen zu Pfu-Hjc aus Genomen von unterschiedlichen archaealen Spezies, fanden sich homologe Sequenzen im Genom der Viren SIRV1 und SIRV2, deren Genomsequenz freundlicherweise von D. Prangishvili (Archaeenzentrum, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt wurde. SIRV1 und SIRV2 gehören zur Familie der Rudiviridae (Prangishvili et al., 1999) und infizieren das Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. Sie verfügen über ein doppelsträngiges, lineares, kovalent geschlossenes DNA-Genom einer Größe von 32,3 kb (SIRV1) bzw. 35,8 kb (SIRV2).

Beide identifizierten homologen Sequenzen (SIRV1, embl:CAC37359; SIRV2, embl:CAC37360) codieren für 121 Aminosäuren (AS) lange Proteine mit 85 % Sequenzidentität zueinander. Nur drei AS innerhalb der ersten 60 AS sind unterschiedlich, 15 AS im restlichen Teil. Diese starke Homologie innerhalb der ersten Hälfte der Hjcs war bereits bei den zellulären Hjcs zu erkennen. Im Vergleich mit diesen (Abb. 4.1, Sv1 und Sv2), zeigt sich, daß 10 der 14 komplett konservierten AS auch hier erhalten sind. Von den in Pfu-Hjc als essentiell gezeigten AS sind alle, bis auf eine, bei den SIRV-Hjcs identisch. Nur das in allen zellulären Hjcs konservierte und für die Schnittaktivität notwendige Arginin R10 ist bei beiden viralen Hjcs an vergleichbarer Position zum Tyrosin ausgetauscht.

Entsprechend den zellulären Hjcs sind die berechneten pI mit 9,17 (SIRV1) und 9,46 (SIRV2) in einem sehr basischen Bereich (Tabelle 4.1).

Es zeigt sich keine engere Verwandtschaft der SIRV-Hjc Sequenzen zur Hjc Sequenz seines Wirts *Sulfolobus islandicus* (das identisch mit Sso-Hjc ist; siehe 4.1.2) als zu den anderen zellulären Hjcs (Tabelle 4.2).

	Sso	Ape	Afu	Mth	Mja	Pab	Pho	Pfu
Ident.	24	12	21	25	22	22	24	22
Ähnl.	37	24	35	42	37	44	39	38
Lücke	31	34	21	20	27	19	22	25

Tabelle 4.2, Sequenzhomologie der zellulären Hjcs zu SIRV2-Hjc.

Ident., % identische, Ähnl., % ähnliche, Lücke, % deletierte Aminosäuren über die gesamte Sequenz, verglichen mit SIRV2-Hjc; berechnet mit dem Programm „Needle“ (www.ebi.ac.uk/emboss/align; Needleman and Wunsch, 1970).

4.2.2 Endonukleolytische Aktivität der viralen Hjcs mit cruciformer DNA

SIRV1-Hjc und SIRV2-Hjc wurden von R. Birkenbihl in unserem Labor kloniert und gereinigt (Birkenbihl et al., 2001). Gereinigtes SIRV1-Hjc und SIRV2-Hjc wurde von ihm freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die cruciformen Substrate CFK1a01 und CFK1a11 wurden zur Kartierung der Schnittpositionen verwendet.

4.2.2.1 Cruciforme DNA CFK1a11 mit fixiertem Kreuzungspunkt

Im Fall des Substrats CFK1a11 (Abb. 4.9) zeigt sich für beide viralen Hjcs das gleiche Schnittmuster. Es ist eine starke Präferenz für die Schnittachse 12/14 im Vergleich mit Schnittachse 11/13 zu erkennen. Das entspricht den Ergebnissen für die zellulären Hjcs. Die Schnittpositionen unterscheiden sich jedoch von denen der zellulären Hjcs und liegen für die präferentielle Schnittachse zwei Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkt entfernt. Die schwachen Schnitte über die Achse 01/03 liegen zwei und drei Nukleotide 3' von der Kreuzung entfernt.

Interessanterweise schneidet die X-Solvase Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 (Abb. 4.9, Spuren E), hier als Kontrollreaktion eingesetzt, an den gleichen Positionen wie die Hauptschnitte der viralen Hjcs, zwei Nukleotide 3' von der Kreuzung entfernt, jedoch über beide Schnittachsen mit gleicher Effizienz.

Die bereits erwähnte X-Solvase Hje aus *S. solfataricus* (4.1.5.1, Kvaratskhelia and White, 2000c) schnitt ein cruciformes Substrat mit definierter Konformation ausschließlich in den durchgehenden Einzelsträngen, ebenfalls zwei Nukleotide vom Kreuzungspunkt entfernt.

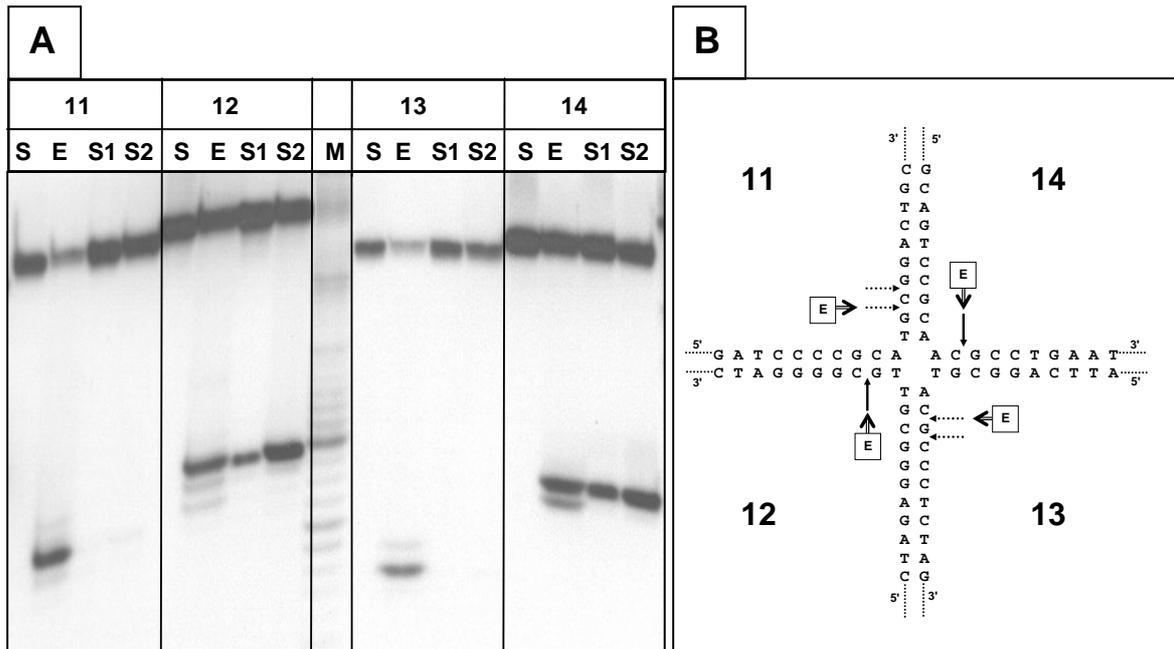


Abb. 4.9, A, Schnittreaktionen der viralen Hjcs mit der fixierten cruciformen DNA CFK1a11. 10 nM des Substrats CFK1a11 wurden mit 10 nM der SIRV- und SIRV2-Hjc für 30 min bei 55°C inkubiert und anschließend auf einem denaturierenden PAA-Gel (12,5 %) aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. Das Substrat war an den 5'-Enden der angezeigten DNA-Oligonukleotiden (Strang 11-14) radio-aktiv markiert; S, nur Substrat; E, 10 nM Endonuclease VII; S1, SIRV1-Hjc; S2, SIRV2-Hjc; M, Markerspur mit *DnaseI* verdautem Substrat.

B, Positionen der Schnitte der viralen Hjcs und Endonuclease VII in der fixierten cruciformen DNA CFK1a11. Dargestellt ist die Sequenz im Zentrum der cruciformen DNA; die Pfeile bezeichnen die Positionen der durch die Hjc eingefügten Einzelstrangbrüche; *durchgehender Pfeil*, Hauptschnittpositionen; *gestrichelter Pfeil*, Nebenschnittpositionen (Effizienz < 10 %); *Pfeil mit „E“*, Schnittpositionen von Endonuclease VII; 11-14, DNA-Einzelstränge der cruciformen DNA.

4.2.2.2 Cruciforme DNA CFKla11 mit mobilem Kreuzungspunkt

Auch für die mobile cruciforme DNA CFKla01 ergaben sich wieder identische Schnittpositionen für beide viralen Hjcs (Abb 4.10). Anders als mit dem fixierten Substrat CFKla11 und in einem noch größeren Ausmaß als bei den Reaktionen der zellulären Hjcs mit CFKla01, zeigte sich hier eine Streuung der Schnittpositionen. Die Gewichtung der beiden Schnittachsen war, wie bei den zellulären Hjcs, ausgeglichen. Die Positionen der Schnitte unterscheiden sich deutlich von denen der zellulären Hjcs, konnten aber in allen Fällen, bei geeigneter Schenkelwanderung, zwei Nukleotide 3' von dem Kreuzungspunkt entfernt liegen.

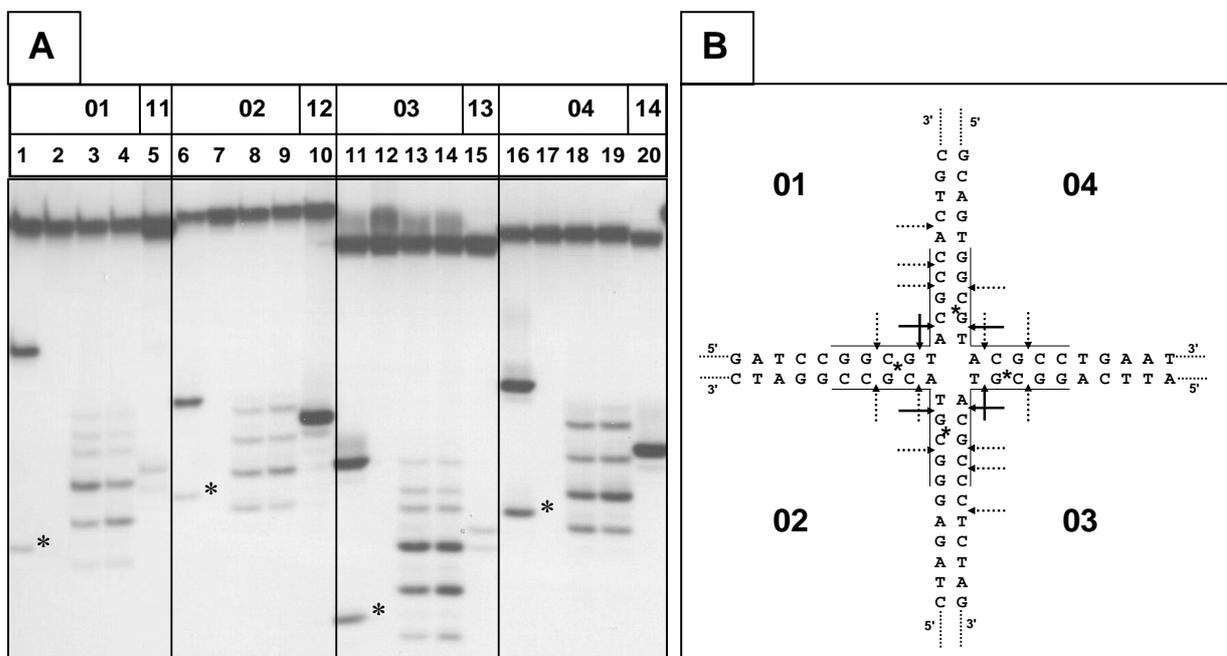


Abb. 4.10, Schnittreaktionen der viralen Hjcs mit der cruciformen DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt, A, 10 nM des Substrats CFKla01 wurden mit 10 nM SIRV1-Hjc (Spuren 3, 8, 13 und 18) und SIRV2-Hjc (Spuren 4, 9, 14 und 19) für 30 min bei 55°C inkubiert und anschließend auf einem denaturierenden PAA-Gel (12,5 %) aufgetrennt. Zum direkten Vergleich der Schnittpositionen wurden Reaktionen von SIRV2-Hjc mit fixierten Substraten CFKla11, die an den bezeichneten Einzelsträngen (11 – 14) markiert waren, aufgetragen (Spuren 5, 10, 15 und 20). Die Reaktionsprodukte wurden durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. Spuren 2, 7, 12 und 17 enthielten nur Substrat; Spuren 1 (*PstI*, *BsiWI*), 6 (*BamHI*, *BsiWI*), 11 (*XbaI*, *BsiWI*) und 16 (*EcoRI*, *BsiWI*) enthielten Restriktionsfragmente der angezeigten Substrate; *Sterne*, Reaktionsprodukte von *BsiWI*; 1 – 04, 11 – 14, 5'-radioaktiv markierte Einzelstränge der cruciformen DNA.

B, Positionen der Schnitte der viralen Hjcs. Dargestellt ist die Sequenz im Zentrum der cruciformen DNA. Der homologe Bereich zur Ermöglichung der Verschiebung des Kreuzungspunktes ist durch eine anliegende Markierung gekennzeichnet. Die Pfeile bezeichnen die Positionen der durch die viralen Hjcs eingefügten Einzelstrangbrüche; *durchgehender Pfeil*, Hauptschnittpositionen; *gestrichelter Pfeil*, Nebenschnittpositionen (Effizienz < 10 %); *Sterne*, Schnittpositionen von *BsiWI*; 01-04, DNA-Einzelstränge der cruciformen DNA.

Sowohl für CFK1a01 als auch CFK1a11 waren die Schnittpositionen in den gegenüber liegenden Einzelsträngen symmetrisch, so daß die cruciforme DNA produktiv aufgelöst wurde. Das heißt, die resultierenden genickten doppelsträngigen DNAs können, bei vorhandener Homologie der ursprünglich zur Holliday-Struktur verknüpften Doppelstränge, ohne Verlust an Nukleotiden wieder ligiert werden.

4.2.2.3 *Cruciforme DNA CFK1a21 mit mobilem Kreuzungspunkt und Konsensus-Sequenz*

Die Genomanalyse von SIRV1 und SIRV2 zeigte das Vorhandensein einer Sequenz in den invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeats*, ITR) mit Ähnlichkeit zu einer aus Pox-Viren bekannten Konsensus-Sequenz (Abb.4.11, A) (Peng et al., 2001). Bei Pox-Viren, ebenfalls mit doppelsträngigen, linearen und kovalent geschlossenen DNA-Genomen, liegt diese Konsensus-Sequenz an übereinstimmender Position in den ITRs und ist notwendig für die Auflösung von multimeren Replikations-Intermediaten. Die Auflösung findet durch die Aktivität der in Pox-Viren konservierten, aber nicht zu Hjc homologen, Holliday-Struktur spezifischen Endonuklease A22R (Garcia and Moss, 2001) statt.

Um eine mögliche spezifische Reaktion der viralen SIRV-Hjcs auf die Konsensus-Sequenz zu überprüfen wurde, basierend auf CFK1a01, eine synthetische cruciforme DNA (CFK1a21) mit der Konsensus-Sequenz als homologem Zentrum konstruiert. Dies ermöglichte eine Verschiebung des Kreuzungspunktes von CFK1a21 innerhalb der Konsensus-Sequenz, so daß jede Position der Konsensus-Sequenz unmittelbar am Kreuzungspunkt liegen konnte.

Im direkten Vergleich der Schnittpositionen (Abb. 4.11, B, Spuren Sv) von SIRV2-Hjc mit CFK1a01 und CFK1a21, läßt sich im Fall des Substrats mit Konsensus-Sequenz keine spezifischere Reaktion feststellen. Weder war eine Steigerung der Schnitteffizienz insgesamt, noch eine Festlegung des Schnitts auf eine bestimmte Position innerhalb der Konsensus-Sequenz zu beobachten. Zum Vergleich durchgeführte Reaktionen mit den zellulären Pfu-Hjc und Afu-Hjc zu (Abb. 4.11, B, Spuren A und P) zeigten ein ähnliches Ergebnis.

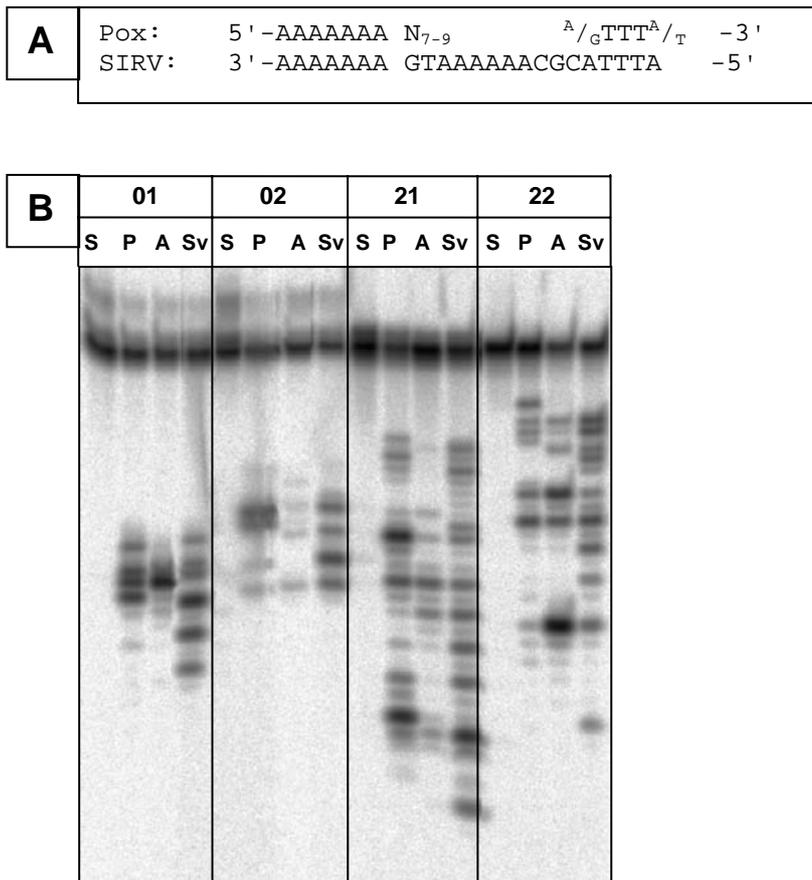


Abb. 4.11, A, Konsensus-Sequenz aus ITRs der Pox-Viren Genome und ähnliche Sequenz aus SIRV ITRs. Die verwandten Sequenzen liegen in umgekehrter Orientierung vor. ITR, *inverted terminal repeat*, sich in umgekehrter Orientierung wiederholende Sequenz in den terminalen Bereichen des Viren-Genoms.

B, Schnittreaktionen von SIRV-Hjc mit cruciformen DNAs mit zufälliger und Konsensus-Sequenz im zentralen Homologiebereich. Eingesetzt wurden 10 mM, an den bezeichneten Strängen radioaktiv markiertes, CFKla01 (01, 02) mit zufälliger Sequenz im Homologiezentrum und CFKI21 (21, 22) mit der zur Pox-Konsensus verwandten Sequenz im Homologiezentrum. Das Substrat wurde mit 10 mM SIRV2-Hjc (Sv), Pfu-Hjc (P) oder Afu-Hjc (A) für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem denaturierendem PAA-Gel (12,5 %) aufgetrennt und durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. S, nur Substrat.

In allen Fällen lagen die Positionen der Schnitte über einen breiteren Bereich verstreut als bei CFKla01. Auf Grund des längeren Homologiebereiches und damit zahlreicheren Konformeren mit verschobenen Kreuzungspunkten, war dies für eine nicht sequenzspezifische Reaktion zu erwarten.

4.3 Pfu-Afu-Hjc Chimären

4.3.1 Definition von DNA-Interaktions-Domänen

Die Beobachtung, daß die zellulären Hjcs trotz ihrer hohen Homologie, markante Unterschiede in den Schnittmustern mit der mobilen cruciformen DNA CFK1a01 erzeugen, führte zu der Frage nach der strukturellen Ursache für diese ausgeprägten Spezifitäten, die Rückschlüsse auf Substrat-Erkennung und Umsetzung der X-Solvasen zulassen würden.

Falls bestimmte eingrenzbare Bereiche des Enzyms, ihre DNA-Interaktions-Domänen, diese Spezifität vermitteln, müßte sich durch gezielten Austausch dieser Domänen zwischen zwei Hjcs, auch deren Schnittspezifität ineinander umwandeln lassen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zunächst zwei Hjcs mit besonders auffälligen Unterschieden im Schnittmuster ausgewählt. Im Fall von Pfu-Hjc und Afu-Hjc waren sowohl für die Position der Schnitte, als auch für die Präferenz der Schnittachse mit dem Substrat CFK1a01, die deutlichsten Unterschiede innerhalb der Gruppe der zellulären Hjcs auszumachen. Bei Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen ließen sich markante Unterschiede in den bereits angesprochenen Bereichen mit Implikation für DNA-Bindung (siehe 4.1.1), nämlich dem N-Terminus und den *loops* zwischen β_1 - und β_2 -Strang, sowie zwischen β_3 - und β_4 -Strang, ausmachen (Abb. 4.12). Dieses führte zur Definition von drei hypothetischen DNA-Interaktionsdomänen, deren Einfluß auf die Schnittspezifität untersucht werden sollte. Dazu wurden chimäre Hjcs konstruiert, die auf Pfu-Hjc basierten und die DNA-Interaktions-Domänen von Afu-Hjc trugen.

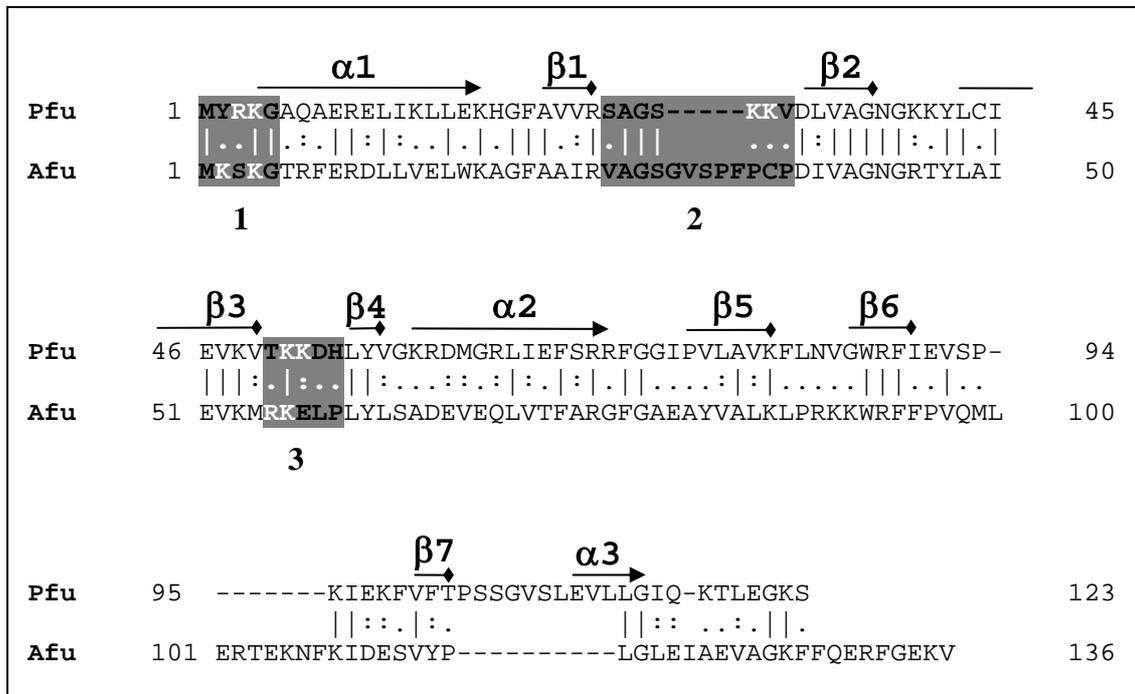


Abb. 4.12, Sequenzalignment von Pfu-Hjc und Afu-Hjc und Definition von hypothetischen DNA-Interaktions-Domänen. Alignment berechnet mit dem Programm „Needle“ (www.ebi.ac.uk/emboss/align; Needleman & Wunsch, 1970). Die Pfeile über der Sequenz stellen die Sekundärstrukturelemente von Pfu-Hjc, nach einer Kristallstruktur von Nishino et al. (2001), dar. Die grau unterlegten Bereiche (1-3) bezeichnen die drei hypothetischen Domänen. Weiße Buchstaben innerhalb der Domänen bezeichnen basische Aminosäuren.

4.3.2 Mutagenese zur Konstruktion der chimären Hjcs

Die Umwandlung von Pfu-Hjc zu chimären PAx-Hjcs (Pfu-Hjc mit Afu DNA-Interaktionsdomäne x) umfaßte sowohl den einzelnen Austausch der drei Domänen mit den sich daraus ergebenden PA1-, PA2- und PA3-Hjcs, als auch alle möglichen Kombinationen, also PA12-, PA23-, PA13- und PA123-Hjc. Die sieben chimären Hjcs sind in Abb. 4.13 schematisch dargestellt.

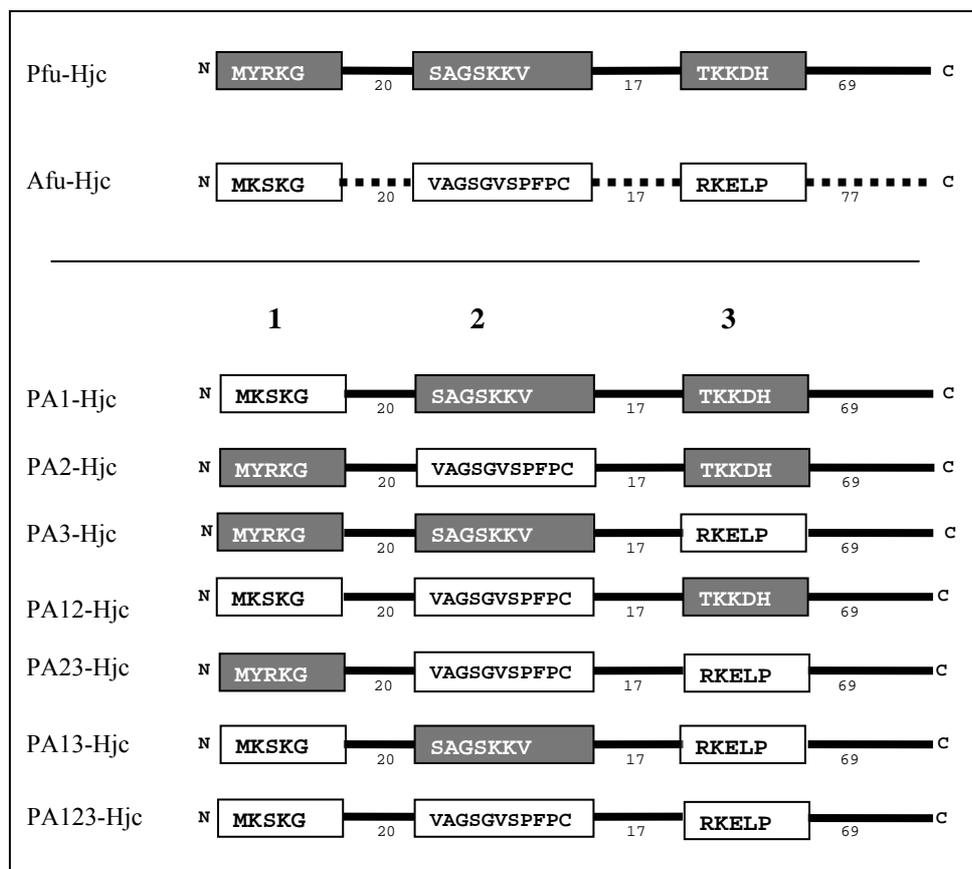


Abb. 4.13, Natürliche Pfu-Hjc und Afu-Hjc und chimäre PA-Hjcs. Schematische Darstellung mit Schwerpunkt auf den ausgetauschten hypothetische DNA-Interaktions-Domänen (1-3). Nur die Aminosäuresequenz der auszutauschenden Bereiche (*schwarz auf weiß*, Afu-Domänen; *weiß auf schwarz*, Pfu-Domänen) ist explizit dargestellt. Die dazwischen liegenden Bereiche sind nur angedeutet (*durchgehende Linien*, Pfu-Hjc; *gestrichelte Linien*, Afu-Hjc) und mit ihrer Länge in der Anzahl an Aminosäuren versehen.

Die Konstruktion der chimären Hjcs erfolgte durch *site-directed mutagenesis*, das heißt die codierende Sequenz der Interaktionsdomänen von Pfu-Hjc wurde durch Wahl geeigneter Primer im Verlauf einer PCR in die der Afu-Hjc Interaktionsdomänen umgewandelt. Die in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden

Primer amplifizierten hierbei das komplette ca. 6 kb große Expressionsplasmid für Pfu-Hjc (pKN101). Die eingesetzten Primer hybridisierten jeweils bis an die Grenze der codierenden Sequenz der auszutauschenden Domäne und enthielten darüber hinaus als nicht komplementäres 5'-Ende eine Hälfte der codierenden Sequenz der zu integrierenden Afu-Hjc Domäne. Nach Ligation des linearen PCR-Produkts zu einem zirkulären Vektor trug dieser an der Ligationsstelle die ausgetauschte Afu-Hjc-Domäne, aus der Kombination der beiden 5'-Überhänge der PCR-Primer (Abb. 4.14).

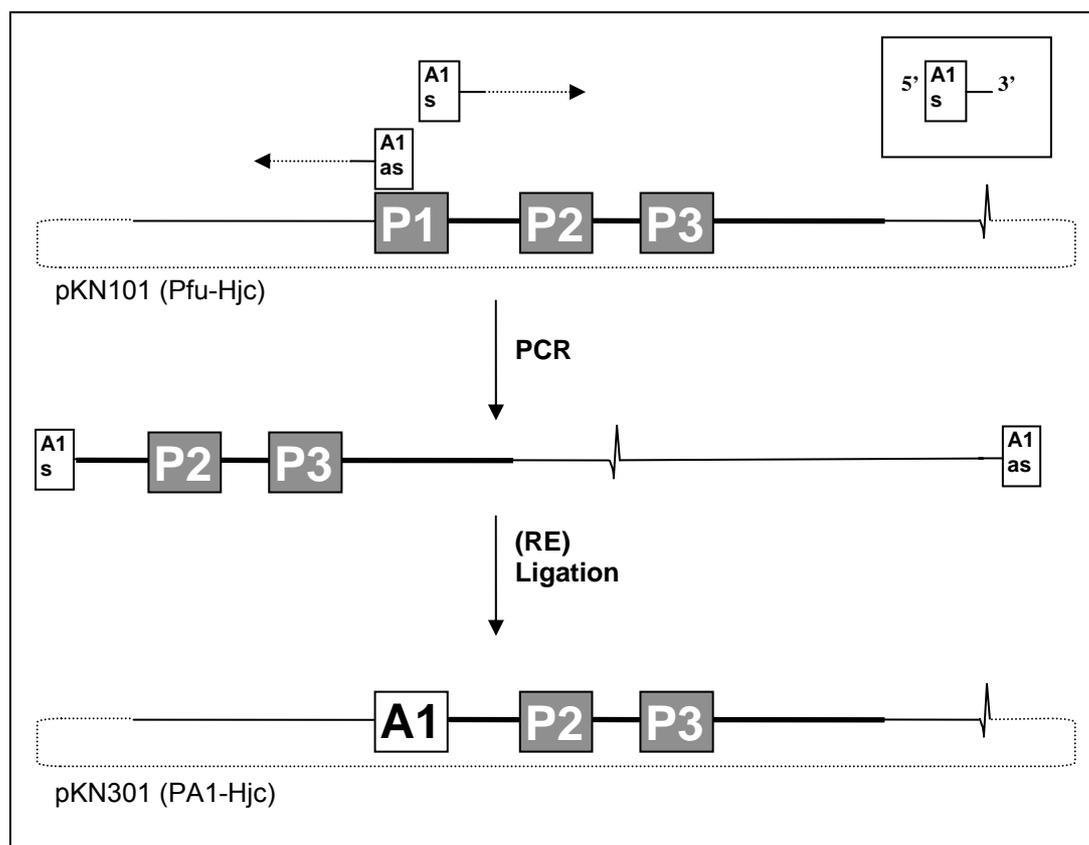


Abb. 4.14, Mutagenese von Pfu-Hjc zur Konstruktion von PA1-Hjc. Schematische Darstellung der *site-directed mutagenesis*. P1-P3, (A1), DNA-Sequenz der hypothetischen DNA-Interaktions-Domänen von Pfu-Hjc (Afu-Hjc); A1s und A1as, sense und antisense Primer für die PCR zum Austausch der P1 Domäne von Pfu-Hjc mit der A1 Domäne von Afu-Hjc. Der Kasten stellt den nicht zu pKN101 (Pfu-Hjc Expressionsplasmid) komplementären 5'-Bereich der Primer dar, der jeweils eine Hälfte der DNA Sequenz der A1 Domäne enthält. Der an dem Kasten angehängte Strich stellt die zu pKN101 komplementäre Sequenz der 3'-Bereiche der Primer dar. *gestrichelter Pfeil*, DNA-Synthese; RE, Verdau mit Restriktionsenzym („Trimmen“ des PCR-Produktes); Weitere Details im Text und Material und Methoden.

Diese Methode wurde für den Austausch der drei Domänen in drei Varianten durchgeführt, die sich in der Prozessierung der PCR-Produkte vor der Ligation zum zirkulären Vektor unterschieden.

Zum Austausch der Afu1-Domäne ergab sich die auszutauschende Sequenz direkt aus der Kombination der Primer-Überhänge, so daß das aufgereinigte PCR-Produkt nur phosphoriliert und dann in den Vektor ligiert wurde. Im Fall des Austausches der Afu2-Domäne trugen die Überhänge der Primer Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (*SmaI*, *PmlI*) die Schnitte ohne Einzelstrangüberhänge (*blunt ends*) einfügen. Hier wurden die gereinigten PCR-Produkte zunächst mit *SmaI* und *PmlI* verdaut und erst nach erneuter Reinigung, zur Abtrennung der abgeschnittenen Endstücke, in den Vektor ligiert. Für den Austausch der Afu3-Domäne trug das PCR-Produkt an beiden Enden Erkennungssequenzen für ein Restriktionsenzym (*SacI*), das Schnitte mit Einzelstrangüberhängen (*sticky ends*) erzeugte. Die Ligation erfolgte hier ebenfalls nach Verdau und Reinigung.

Der Ligationsansatz wurde in allen drei Fällen direkt zur Transformation von *E. coli* DH5 α und BL21 (DE3) CodonPlus verwendet. Hierbei zeigte sich eine etwa zehnfach höhere Transformationseffizienz für die erste Methode ohne „Trimmen“ der PCR-Produkte vor der Ligation.

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA der Transformanten kontrolliert. Es ließen sich für alle chimären Hjcs korrekte Konstrukte identifizieren, wobei für die Mutagenese-Methode mit Restriktionsverdau der PCR-Produkte vor der Ligation einen höheren Anteil von 90 % korrekter Transformanten ergab, im Gegensatz von nur 40 % bei der Methode ohne Trimmen der PCR-Produkte.

Zur Konstruktion von chimären Hjcs mit mehreren ausgetauschten Domänen, wurde in nachfolgenden PCRs bereits konstruierte Vektoren mit codierenden Sequenzen für chimäre Hjcs als Matrize eingesetzt.

Für alle sieben chimären PA-Hjcs konnten erfolgreich Expressionsvektoren konstruiert werden, die wie folgt benannt wurden: PA1: pKN301; PA2: pKN302; PA3: pKN303; PA12: pKN304; PA23: pKN305; PA13: pKN306; PA123: pKN307.

Um eine vereinfachte Reinigung über Affinitätschromatographie zu ermöglichen, sollten die chimären Hjcs mit einem *His-tag* versehen werden. Dazu wurde zunächst Afu-Hjc mit einem C-terminalen *His-tag* kloniert (1.2.1.9.2). Das resultierende Expressionsplasmid war pKNch103. In einem zweiten Schritt wurden die kodierenden Sequenzen aller chimären Hjcs, sowie Pfu-Hjc mit geeigneten Primern amplifiziert, um sie über *NdeI*- und *KpnI*-Schnittstellen in pKNch103 klonieren. Die resultierenden Vektoren wurden durch Sequenzierung kontrolliert und wie folgt benannt: Pfu: pKNch101; PA1: pKNch301; PA2: pKNch302; PA3: pKNch303; PA12: pKNch304; PA23: pKNch305; PA13: pKNch306; PA123: pKNch307.

4.3.3 Reinigung von Hjcs mit C-terminalem *His-tag*

Expressionskulturen für die Reinigung der Hjcs mit C-terminalem *His-tag* wurden wie beschrieben (1.2.3.1) angesetzt. Aus 500 ml Kulturen ließen sich durch Reinigung über Ni-NTA-Matrizes bis zu 10 mg rekombinantes, *His-getaggt*es Hjc isolieren (1.2.2.2). Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch die Reinigung von PA1-Hjc über eine Ni-NTA Spin Säule.

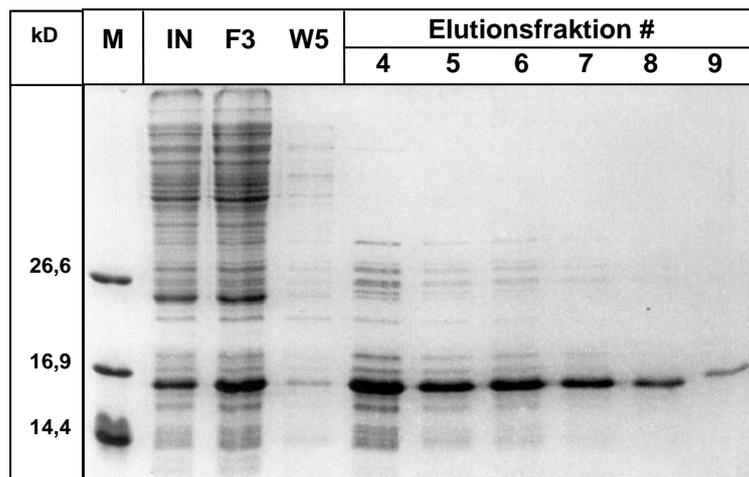


Abb. 4.15, Reinigung von PA1-Hjc mit *His-tag* durch Affinitätschromatographie. PA1-Hjc wurde aus geklärten Lysaten von Expressionskulturen über NiNTA-Spin Säulen gereinigt. Es wurden jeweils 10 µl der Fraktionen (IN und F: 1:10 verdünnt) durch SDS-PAGE (15 %) aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt; IN, Input, geklärtes Lysat; F3, dritte Durchflußfraktion; W5, fünfte Waschfraktion; Elutionsfraktionen, 4 - 5: 250 mM Imidazol Elutionspuffer, 7 - 9: 500 mM Imidazol Elutionspuffer. Weitere Details zur Reinigung in Material und Methoden.

4.3.4 Endonukleolytische Aktivität der Hjc-Chimären

4.3.4.1 Cruciforme DNA CFK1a01 mit mobilem Kreuzungspunkt

Gereinigte chimäre Hjcs, sowie Pfu-Hjc und Afu-Hjc, wurden zur Analyse der Effekte der ausgetauschten hypothetischen DNA-Interaktionsdomänen auf die Schnitt-Spezifität mit CFK1a01 als Substrat inkubiert.

Im Vergleich zu den Schnittmustern der Hjcs aus der Reinigung ohne *His-tag* zeigten Pfu-Hjc und Afu-Hjc mit *His-tag* übereinstimmende Schnittmuster; der *His-tag* hatte also keine Auswirkung auf die Schnittaktivität der Hjcs.

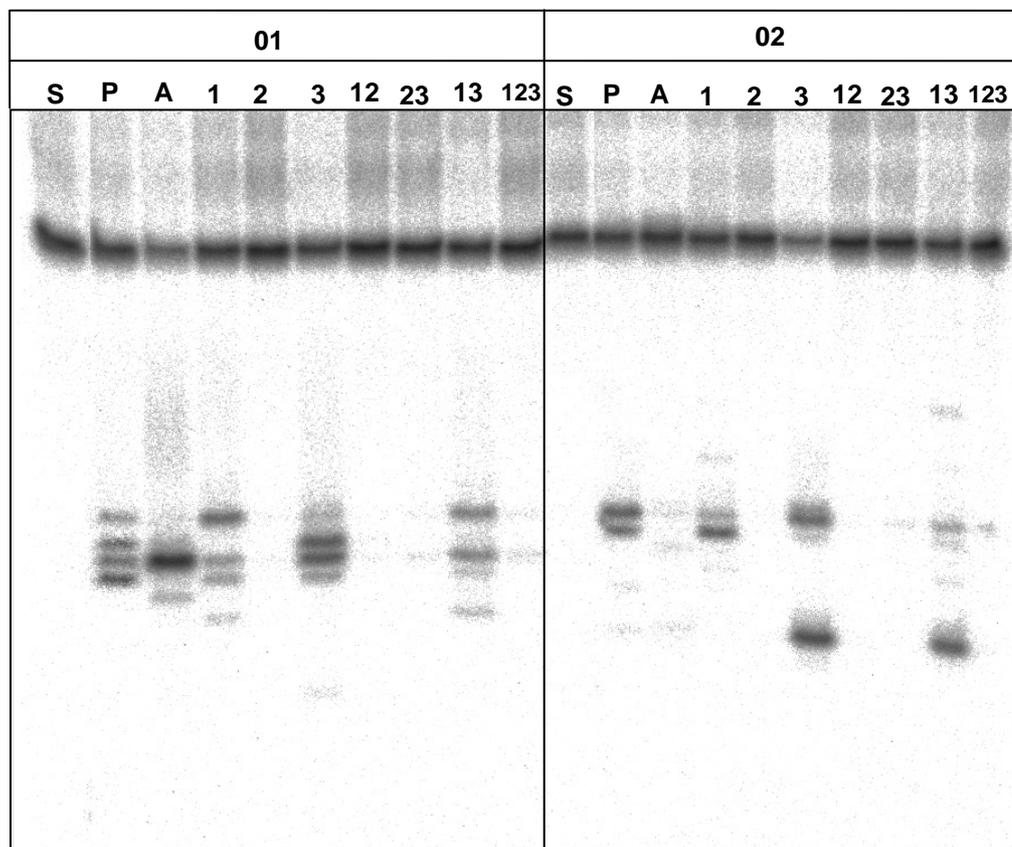


Abb. 4.16, Schnittreaktionen der chimären Hjcs mit der cruciformen DNA CFK1a01 mit mobilem Kreuzungspunkt, 10 nM des Substrats CFK1a01, mit entsprechend der Beschriftung am 5'-Ende radioaktiv markierten Einzelsträngen (01, 02), wurden mit 10 nM der chimären PA-Hjcs, sowie Pfu-Hjc (P) und Afu-Hjc (A) für 45 min bei 75°C inkubiert und anschließend auf einem denaturierenden PAA-Gel (12,5 %) aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. S, nur Substrat; 1, PA1-Hjc; 2, PA2-Hjc; 3, PA3-Hjc; 12, PA12-Hjc; 23, PA23-Hjc; 13, PA13-Hjc; 123, PA123-Hjc.

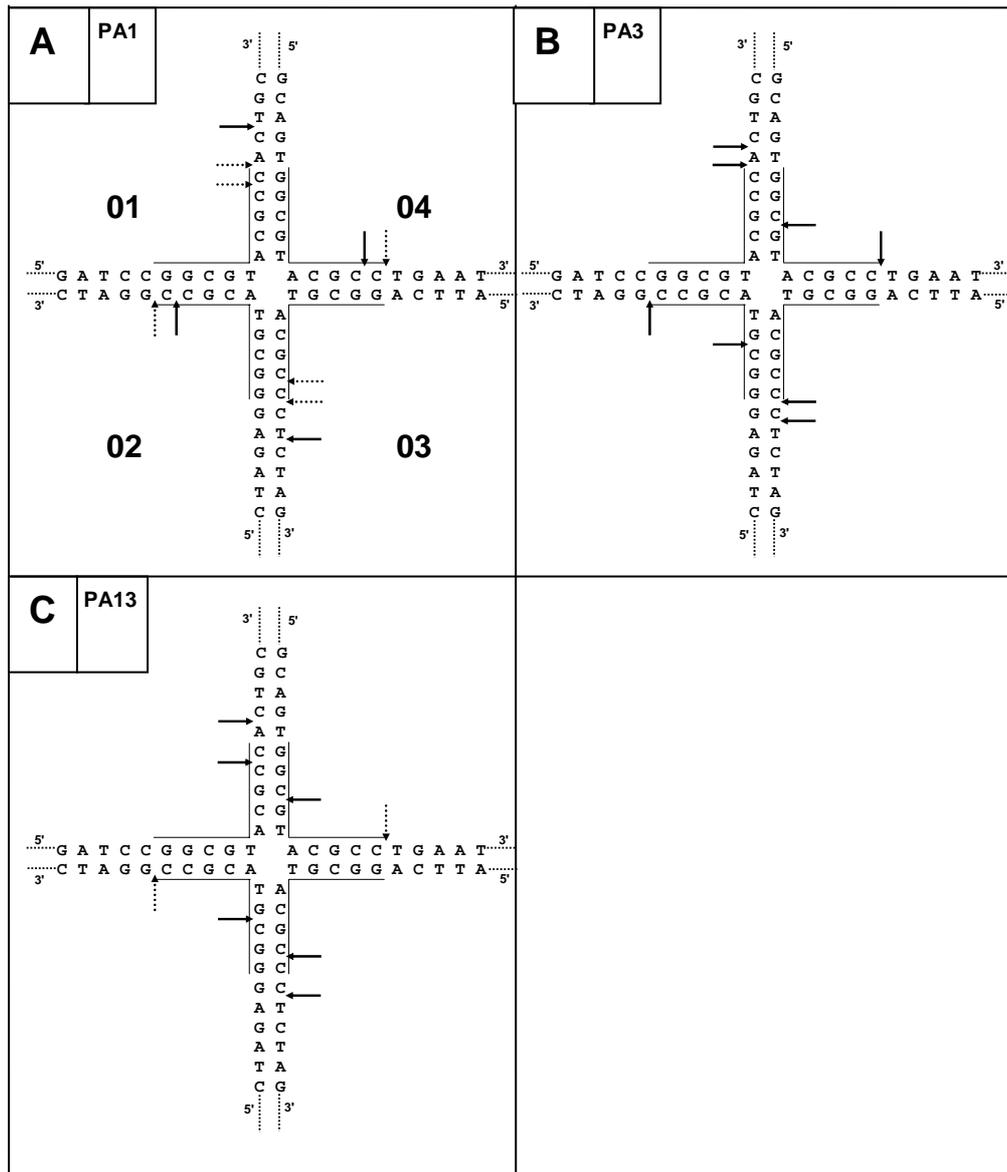


Abb. 4.17, A-C, Positionen der Schnitte der chimären Hjs in der cruciformen DNA CFKla01 mit mobilem Kreuzungspunkt. Dargestellt ist die Sequenz im Zentrum der cruciformen DNA; die Pfeile bezeichnen die Positionen, der durch die chimären Hjs (**A**, PA1-Hjc; **B**, PA3-Hjc; **C**, PA13-Hjc) eingefügten Einzelstrangbrüche (siehe Abb. 4.16). Die mobile homologe Region um den Kreuzungspunkt ist durch eine anliegende Markierung kenntlich gemacht. *durchgehender Pfeil*, Hauptschnittpositionen; *gestrichelter Pfeil*, Nebenschnittpositionen (Effizienz < 10 %); 01-04, DNA-Einzelstränge der cruciformen DNA.

Keine der chimären Hjs mit integrierter Afu2-Domäne zeigte Schnittaktivität mit dem Substrat CFKla01. Chimäre Hjs mit Afu1- und Afu3-Domäne sowie deren Kombination zeigten vergleichbare Schnitteffizienz zu den natürlichen Hjs (Abb. 4.16). Die Schnittpositionen beider Schnittachsen wiesen aber deutliche Unterschiede zu den natürlichen Hjs auf. Für die Schnittachse 01/03 ähnelt das Schnittmuster von

PA1-Hjc (Abb. 4.17, A) dem von Pfu-Hjc, mit dem Unterschied, daß der Schnitt nur auf drei der bei Pfu-Hjc vorkommenden vier Positionen eingefügt wurde. Außerdem war die Gewichtung des am weitesten außen liegenden Schnittes am stärksten. PA3-Hjc (Abb. 4.17, B) schnitt mit hoher Effizienz an den zwei zentralen Schnittpositionen des Pfu-Hjc Schnittmusters. PA13-Hjc (Abb. 4.17, C) schnitt vor allem an zwei Positionen, beide auch Bestandteil der Pfu-Hjc und PA1-Hjc Schnittmuster. Beim Auflösen der cruciformen DNA über die Schnittachse 02/04 zeigten sich ebenfalls veränderte Schnittmuster für die chimären Hjcs. Wieder zeigte PA1-Hjc (Abb. 4.17, A) eine leicht modifizierte Version des Pfu-Hjc Schnittmusters, mit Schnitten auf den gleichen Positionen aber leicht veränderten Effizienzen. PA3-Hjc (Abb. 4.17, B) zeigte ein stark von beiden Schnittmuster der natürlichen Hjc abweichendes Bild mit zwei Schnittpositionen mit hohen Effizienzen. Eine war in Übereinstimmung mit der aus dem Pfu-Hjc Muster, eine weitere ebenso effiziente lag weit außerhalb des Bereiches der Schnittmuster aller natürlichen Hjcs. Er lag jedoch, bei maximaler Schenkelwanderung, immer noch drei Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkte entfernt, also in Übereinstimmung mit den Schnittpositionen der zellulären Hjcs. PA13 (Abb. 4.17, C) zeigt die gleiche extreme neue Schnittposition von PA3, auch mit vergleichbarer Effizienz, zeigt aber für die zweite, ebenfalls mit PA3 übereinstimmende Schnittposition eine deutlich niedrigere Effizienz.

Eine komplette Überführung von dem Pfu-Hjc in das Afu-Hjc Schnittmuster durch das Austauschen der hypothetischen DNA-Interaktions-Domänen ließ sich jedoch nicht erreichen.

4.4 Komplementation von T4-Endonuklease VII mit archaealen Hjcs

Endonuklease VII (Endo VII) ist eine strukturspezifische Nuklease, mit Funktionen bei der rekombinationsabhängigen Replikation (Mosig, 1998) und der Verpackung des Genoms des Bakteriophagen T4 (Golz and Kemper, 1999). Es zeigt die typischen Eigenschaften einer Holliday-Struktur spezifischen Resolvase und ist darüber hinaus in der Lage eine Vielzahl von verzweigten und ungewöhnlich strukturierten Substraten zu schneiden.

Um die Fähigkeiten der archaealen Hjcs in einem etablierten zellulären System zu untersuchen, wurden Komplementationsexperimente durchgeführt.

Zum Einsatz kamen T4-Phagen mit einer *amber* Mutation im Gen für Endo VII (T4g49amE727; T4g49^{am}). Ein internes Stop-Codon führte zur Expression von verkürztem, inaktivem Enzym und führte zu einem typischen Endo VII defizienten Phänotyp (Frankel et al., 1971). Untersucht werden sollte, ob die heterologe Expression von archaealem Hjc im T4-Wirt Einfluß nimmt auf die Entwicklung von T4g49^{am}-Phagen, also die Funktionen von Endo VII in der T4-Wirtszelle komplementieren kann.

Zur Quantifizierung der erfolgreichen Phagenentwicklung, wurden Titer eines Einzelplaque-Lysates (EPL) des Endo VII defizienten T4-Stamms (g49amE727) durch Plaquetests bestimmt. Das gleiche EPL wurde eingesetzt um *E. coli* Kulturen zu infizieren, die zuvor mit den Hjc-Expressionsplasmiden transformiert worden sind. Durch ihre Eigenschaften als pET11a-Derivate war die Expressionen der Hjcs durch IPTG induzierbar.

Zunächst wurden die Auswirkungen von IPTG-Konzentrationen von 5 mM bis 150 mM im Top-Agar und den Agarplatten auf das Wachstum von *E. coli* getestet. Hier zeigte sich, daß höhere IPTG-Konzentration als 40 mM toxisch wirkten. Mit einer IPTG-Konzentration von 25 mM ergab sich jedoch, unter den Bedingungen des T4-Plaquetests ohne Infektion mit T4, ein dichter *E. coli*-Rasen.

Für die Komplementationsversuche wurden kompetente *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus mit den Expressionsplasmiden für die archaealen Hjcs (pKN101 – pKN107, pKN110) transformiert. Diese acht Wirtstämme wurden in Plaquetests mit unterschiedlichen Verdünnungen ($1:10^4$ bis $1:10^7$) der Phagen-Suspension inkubiert und jeweils auf Platten mit 25 mM und ohne IPTG ausplattiert. Als Negativkontrolle diente ein Wirtstamm mit pET11a ohne Insert, als Positivkontrolle ein Wirtstamm mit pRB233, einem pET11a-Derivat mit der codierenden Sequenz einer EndoVII-Mutante (H43R) mit 10 % der wt-Aktivität (Birkenbihl and Kemper, 1998) als Insert. Hohe zelluläre Konzentrationen von wt Endo VII, wie sie bei dem eingesetzten Expressionssystem erreicht würden, sind extrem toxisch für *E. coli* und scheiden somit als Positivkontrolle aus.

Infektionen der unterschiedlichen Wirtstämmen mit T4-gp^{am} (E727) ergaben für das gleiche EPL die in Tabelle 4.3 gesammelten Titer.

	Titer (pfu / ml)		Komplementationsfaktor	
	ohne IPTG	20 mM IPTG	ohne IPTG	20 mM IPTG
pET11a	$2 \cdot 10^5$ ($\pm 1 \cdot 10^5$)	$2 \cdot 10^5$ ($\pm 1 \cdot 10^5$)	/	/
pRB233	10^8 ($\pm 1 \cdot 10^7$)	$3 \cdot 10^8$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^3	$3 \cdot 10^3$
pKN101 (Pfu)	$3 \cdot 10^7$ ($\pm 5 \cdot 10^6$)	$6 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^2	$3 \cdot 10^2$
pKN102 (Pho)	$3 \cdot 10^7$ ($\pm 5 \cdot 10^6$)	$8 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^2	$4 \cdot 10^2$
pKN110 (Pab)	$3 \cdot 10^7$ ($\pm 5 \cdot 10^6$)	$8 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^2	$4 \cdot 10^2$
pKN103 (Afu)	$3 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	$6 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^2	$3 \cdot 10^2$
pKN104 (Ape)	$3 \cdot 10^5$ ($\pm 1 \cdot 10^5$)	$5 \cdot 10^6$ ($\pm 5 \cdot 10^5$)	1,5	20
pKN105 (Mja)	$2 \cdot 10^7$ ($\pm 5 \cdot 10^6$)	$4 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^2	$2 \cdot 10^2$
pKN106 (Sso)	$5 \cdot 10^5$ ($\pm 1 \cdot 10^5$)	$3 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^5$)	2,5	10^2
pKN107 (Mth)	$1 \cdot 10^7$ ($\pm 5 \cdot 10^6$)	$4 \cdot 10^7$ ($\pm 1 \cdot 10^7$)	10^2	$2 \cdot 10^2$

Tabelle 4.3, Titer von T4-gp49^{am}-Suspensionen in Komplementations-Plaquetests

Die Titer ergeben sich aus jeweils 5 Plaquetests mit je 4 Verdünnungen ($1:10^4$ - $1:10^7$) der Phagen-Suspension mit *E. coli* Wirtskulturen die mit unterschiedlichen Hjc-Expressionsvektoren transformiert worden sind. Der Komplementationsfaktor ist die Steigerung des Titers bezogen auf die Negativkontrolle (pET11a); pfu, plaque forming units.

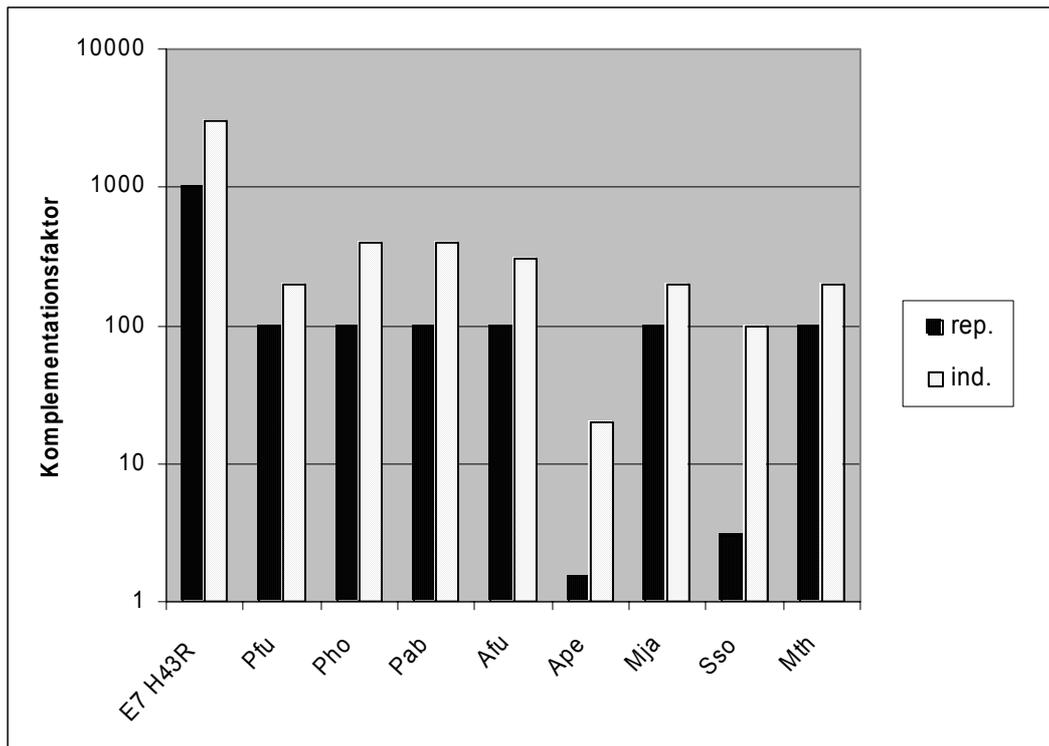


Abb. 4.18, Komplementation von Endonuklease VII defizienten T4-Phagen durch archaeale Hjcs. Dargestellt sind die Komplementationsfaktoren (siehe Tabelle 4.3) der archaealen Hjcs unter reprimierenden (rep., 0 mM IPTG) und induzierenden (ind., 20 mM IPTG) Expressionsbedingungen im Plaquetest. Endonuklease VII (H43R) diente als Positivkontrolle.

Es läßt sich erkennen (Abb.4.18), daß alle archaealen Hjc in der Lage sind die *in vivo* Funktionen von T4 Endo VII zu komplementieren. Ihre heterologe Expression im Phagen-Wirt erreichte eine Steigerung des Titer um einen Faktor von 20 (Ape-Hjc) bis 400 (Pho-Hjc), und zeigte damit etwa 10 % des Komplementationsfaktors der Positivkontrolle mit eingeschränkt aktivem T4 Endo VII. Auffällig war hierbei ein bereits deutlich gesteigerter Titer in den nicht induzierten Ansätzen, mit Ausnahme von pKN104 (Ape-Hjc) und pKN106 (Sso-Hjc). Das ließ eine wenig stringente Repression der Expression in den Wirtskulturen vermuten, was durch Kontrolle der Hjc-Aktivität in nicht induzierten Wirtskulturen, bestätigt werden konnte (Abb 4.19).

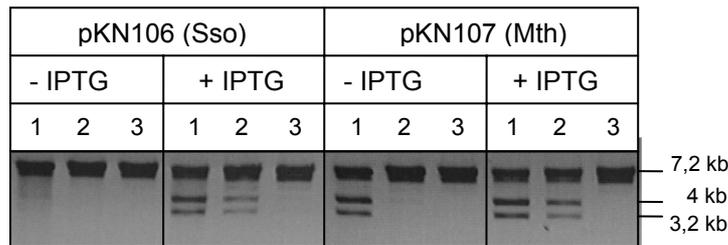


Abb. 4.19, Untersuchung der Hjc-Aktivität in transformierten *E. coli* Wirtskulturen. 100 ng des M13mp2IR62E-Substrats wurde mit 1 μ l geklärten Lysats in unterschiedlichen Verdünnungen, aus nicht T4 infizierten *E. coli* Wirtskulturen für 45 min bei 75°C inkubiert. Darauf folgend wurde mit 1 U *Bam*HI nachgeschnitten. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 0,6 % Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Auftreten von Fragmenten der Länge 3,2 kb und 4 kb ist indikativ für X-Solvase-Aktivität. Die *E. coli* der untersuchten Kulturen waren mit pKN106 oder pKN107 transformiert und wuchsen unter Bedingungen ohne IPTG (-IPTG) oder mit 20 mM IPTG (+IPTG). In die Reaktionen wurde bei 1, 1:100, bei 2, 1: 500 und bei 3, 1:2500 Verdünnungen des geklärten Lysats der Wirtskulturen eingesetzt.

Unterschiede in der Komplementation zwischen den einzelnen Hjcs können daher auf Unterschiede in der Expression der einzelnen Hjcs, aber auch auf die Spezifität des jeweiligen Hjcs für das vorliegende Substrat, nämlich verzweigte T4-Replikationsintermediate (VFS-DNA, Kemper and Janz, 1976) zurückzuführen sein.

Durch die beschriebenen Komplementationsexperimente wurde erstmals in einem *in vivo*-System, die biologische Funktion der archaealen Hjcs als Holliday-Struktur auflösende Aktivitäten bestätigt. Dieses war bei moderaten Temperaturen von 37°C, weit unterhalb der Lebensbedingungen der hyperthermophilen Archaeen, in einem bakteriellen System möglich. Hier konnten erfolgreich concatamere T4-Genome, als Voraussetzung der erfolgreichen Phagen-Entwicklung, gemessen an der Steigerung des Titers einer bestimmten T4g49^{am}-Phagen-Suspension, aufgelöst werden. Dieses war möglich, obwohl das T4-Genom eine ungewöhnliche Basenkomposition aufweist, nämlich ausschließlich hydroxymethylierte Cytosine und einen hohen Anteil an glukosylierten Nukleotiden, was die Aktivität der meisten Typ II Endonukleasen verhindert.

Unterschiede im Ausmaß der Komplementation zwischen den archaealen Hjcs könnten Unterschiede in den spezifischen Eigenschaften der Hjcs widerspiegeln.

5 Diskussion

5.1 Zelluläre archaeale Hjcs

Ziel dieser Arbeit war es, nach Identifikation von Holliday-Struktur auflösenden Enzymen (X-Solvasen), diese zu klonieren, zu reinigen und vergleichende Untersuchungen bezüglich ihrer Spezifität durchzuführen.

Grundlage der Suche nach X-Solvasen war die Identifikation der Holliday-Struktur auflösenden Endonuklease Hjc aus *Pyrococcus furiosus*, der ersten X-Solvase aus einem Archaeon. Die Hjc Sequenz diente als Vorgabe für eine Datenbank-Suche nach möglichen homologen Enzymen. Das Ergebnis zeigte eine universelle Verbreitung der Hjcs innerhalb des Reiches der Archaeen, aber nur entfernte Verwandtschaft zu bekannten X-Solvasen und anderen Endonukleasen. Die besten Wertungen betrafen hypothetische Proteine (offene Leseraster, ORFs) aus den archaealen Stämmen *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota*, sowie ORFs aus den, das Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* infizierenden Viren SIRV1 und SIRV2.

Die Klonierung der Gene durch Amplifizierung aus chromosomaler DNA mittels PCR gelang und machte eine Reinigung der rekombinanten Hjcs aus heterologer Expression in *E. coli* möglich. Dieses wurde zunächst in nativer Form durch ein Reinigungsprotokoll aus einer Kombination aus Fällungsreaktionen und FPLC erreicht und wurde, zur Vereinfachung, auch durch Klonierung der Hjcs mit His-tag und entsprechender Reinigung über Affinitätschromatographie etabliert. In beiden Fällen konnten ausreichende Mengen Hjcs (im Milligramm Bereich) für den Einsatz in enzymatischen Reaktionen gereinigt werden.

Durch Reaktionen mit synthetischen cruciformen DNAs konnten in allen Fällen die postulierten Aktivitäten einer X-Solvase bestätigt werden. Alle homologen Hjcs schnitten cruciforme DNA durch das Einfügen von zwei symmetrischen Einzelstrangbrüchen (*nicks*) in den über dem Kreuzungspunkt gegenüberliegenden Strängen. Diese Schnittreaktion führt zur produktiven Auflösung der Holliday-

Struktur mit dem Ergebnis von zwei genickten Doppelsträngen ohne Einzelstrangüberhänge oder Einzelstranglücken.

In Reaktionen mit einer synthetischen cruciformen DNA mit fixiertem Kreuzungspunkt (CFKla11) zeigten alle zellulären (in Abgrenzung zu viralen) Hjcs übereinstimmende Schnittpositionen zur Auflösung der cruciformen DNA. Sie schnitten 3 Nukleotide in 3'-Richtung des Kreuzungspunktes entfernt (Abb. 4.5, A-D). Es zeigte sich bei allen untersuchten Hjcs die gleiche starke Präferenz für eine von zwei möglichen Schnittachsen zur Auflösung des Substrats.

Die Reaktionen der Hjcs mit cruciformer DNA mit einem mobilen Kreuzungspunkt, der über einen Bereich von 10 Basenpaaren verschiebbar war (*branch migration*), ergaben Schnittmuster durch das Einfügen von *nicks* an unterschiedlichen Positionen. Diese Muster waren bei einigen Hjcs durch übereinstimmende Schnittpositionen ähnlich und unterschieden sich nur durch die Effizienz einzelner Schnitte, während andere Hjcs individuelle Schnittpositionen produzierten. Es war also möglich einige der Hjcs bezüglich der Schnittmuster für CFKla01 zusammenzufassen. Diese Gruppierung galt für die Schnittmuster beider alternativer Schnittachsen der cruciformen DNA (siehe Abb. 4.7, A / B und C / D). Ähnliche Schnittmuster produzierten die pyrococcalen Hjcs, Ape-Hjc und Mth-Hjc (siehe Abb. 4.8, A), während Mja-Hjc, Afu-Hjc und Sso-Hjc individuelle Schnittmuster zeigten (siehe Abb. 4.8, B-D).

Wenn man von einem direkten Zusammenhang zwischen Hjc-Aminosäuresequenz und der spezifischen Schnittaktivität mit ihrem Substrat cruciformer DNA ausgeht, wäre die Annahme, daß ähnliche Hjcs ähnliche Schnittmuster produzieren. Durch einen Sequenzvergleich der Hjcs mit Hilfe des Computerprogramms „Vector NTI“ wurde ein Stammbaum der Hjcs erstellt, der die Ähnlichkeit der Hjcs zueinander deutlich macht. Im Vergleich mit einem Stammbaum auf Basis der 16S-rRNA-Sequenzen der Archaeen aus denen die Hjcs isoliert wurden, der als globaler Nachweis der phylogenetischen Verwandtschaft dieser Arten gilt, zeigt sich, daß beide Verwandtschaftsverhältnisse übereinstimmen (Abb. 5.1). Die Ähnlichkeiten zwischen den Hjc-Sequenzen entsprechen der evolutionäre Verwandtschaft ihrer Träger und wurden nicht in einem über- oder unterdurchschnittlichen Maß konserviert

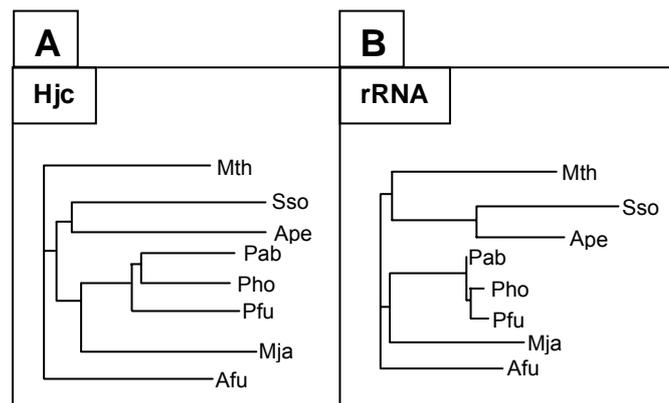


Abb. 5.1, Phylogenetische Stammbäume auf Basis der Hjc-Sequenzen (A) und der 16S-rRNA-Sequenzen (B). Erstellt durch das Computerprogramm „Vector NTI“ auf Basis der *neighbor-joining* Methode. (Saitou & Nei, 1987)

oder verändert. Würde man also eine Gruppenbildung bezüglich spezifischer Aktivität erwarten, deren Ursache in Unterschieden in der Gesamtsequenz der Hjcs läge, müßte eine Gruppierung entsprechend des Hjc-Stammbaums resultieren. Die Gruppierung, die sich aus den Schnittmustern mit der cruciformen DNA CFKla01 ergibt, spiegelt diese Verwandtschaft aber nicht wieder. Die phylogenetisch weit entfernten Ape-Hjc (*Crenarchaeota*, siehe Einleitung 1.1) und Mth-Hjc (*Euryarchaeota*) haben gemeinsame Schnittmuster mit den pyrococcalen Hjcs (*Euryarchaeota*), während das den pyrococcalen Hjcs nahe stehende Mja-Hjc (*Euryarchaeota*) ein deutlich abweichendes Schnittmuster zeigt. Ebenso sind die Schnittmuster der nahe verwandten crenarchaealen Sso-Hjc und Ape-Hjc sehr unterschiedlich. Die individuellen Eigenschaften der Hjcs, die zu den spezifischen Schnittmustern führen, lassen sich also nicht aus Unterschieden in der Gesamtsequenz herleiten, sondern müssen durch Unterschiede in bestimmten Bereichen, etwa der Position des aktiven Zentrums oder spezifischen DNA-Bindungs-Domänen begründet sein.

Wie bereits angesprochen, gibt es einen starken Kontrast zwischen dem Schnittverhalten der Hjcs mit cruciformer DNA, je nachdem ob diese einen mobilen oder einen fixierten Kreuzungspunkt besitzt. Es zeigen sich aber zwei Gemeinsamkeiten in beiden Fällen:

Erstens sind die Schnittpositionen aller Hjcs 3 Nukleotide in 3' Richtung vom Kreuzungspunkt entfernt. Das war bei der cruciformen DNA mit fixiertem Kreuzungspunkt (CFKla11) offensichtlich und galt auch für die Auflösungsreaktion

über die wenig präferierte Schnittachse (siehe Abb. 4.5, A-D). Im Fall der Reaktion mit der cruciformen DNA mit mobilem Schnittpunkt (CFK1a01) ist die tatsächliche Position bezüglich des Kreuzungspunktes nicht direkt zu ermitteln, da im Reaktionsansatz ein Gemisch an unterschiedlichen Konformeren vorliegt, und nicht bestimmt werden kann, welches Ausmaß an *branch migration* stattgefunden hat, als das Hjc in den einzelnen cruciformen DNA-Molekülen die Einzelstrangbrüche einfügte. Geht man jedoch von einer definierten Distanz zwischen den beiden aktiven Zentren des in Lösung vorliegenden Hjc-Homodimers aus, so sollte hier, entsprechend der Reaktion mit dem Substrat mit fixierter Kreuzung, ebenfalls jeweils 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes entfernt geschnitten werden. Alle beobachteten Schnitte stimmen mit dieser Vorgabe, bei entsprechender *branch migration*, überein: Alle Schnitte der individuellen Schnittmuster können 3 Nukleotide 3' von Kreuzungspunkt entfernt eingefügt worden sein (siehe Abb. 4.8, A-D).

Zweitens zeigen alle Hjcs eine deutliche Präferenz für eine von zwei möglichen Schnittachsen. Wieder ist dieses im Fall des Substrats mit fixiertem Kreuzungspunkt offensichtlich. Die Schnittachse, die durch *nicks* in den Strängen 12 und 14 definiert ist, wird mit deutlicher Vorliebe (90 % Schnitteffizienz) zu der Schnittachse der Stränge 11 und 13 (maximal 10 % Schnitteffizienz) geschnitten. In den Reaktionen der Hjcs mit CFK1a01 läßt sich Entsprechendes feststellen. Die Schnittmuster für die beiden Schnittachsen unterscheiden sich deutlich. Zwei Hjcs schneiden sehr präferentiell über eine der beiden Achsen und jeweils mit großer Vorliebe für eine Position: Mja-Hjc schneidet überwiegend über die Achse 02/04, Afu-Hjc ausschließlich über die Achse 01/03 (siehe Abb. 4.7, A-D, Spuren 6 und 7). Ausgehend von einer festgelegten Schnittposition 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes entfernt, zeigen auch die unterschiedlichen Schnittpositionen der anderen Hjcs eine strikte Präferenz für eine der zwei alternativen Schnittachsen. Verschiebt man den Kreuzungspunkt für jeden nick so, daß er 3 Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkt entfernt liegt, so wird die, durch diese *branch migration* erzeugte, cruciforme DNA ausschließlich über diese eine, durch den *nick* und den symmetrischen *nick* im gegenüberliegenden Strang definierte Achse geschnitten. Das gilt für alle beobachteten Schnitte mit CFK1a01 und unterstreicht die Schnittachsenpräferenz als Charakteristikum aller Hjcs.

Um den durch diese Beobachtungen charakterisierten Schnittmodus der Hjes, nämlich dem Einfügen von symmetrischen *nicks* 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes entfernt über eine präferierte Schnittachsen (von zwei möglichen) als strukturspezifischen Mechanismus einordnen zu können, muß zunächst die Struktur des Substrats beachtet werden. Cruciforme DNA liegt, wie in der Einleitung (1.3) angesprochen, in Lösung unter physiologischen Bedingungen in einer typischen sterischen Konformation vor, der *stacked-X* Struktur. Bei dieser Struktur, die sich durch das paarweise Stapeln von je zwei der vier Duplex-DNA-Arme zu zwei quasi-durchgehenden Helices bildet, lassen sich für jedes cruciforme DNA-Molekül grundsätzlich zwei Konformere unterscheiden. Diese bilden sich je nach Wahl der gestapelten Arme, wobei jeder Arm mit beiden direkt benachbarten Armen die Stapelung eingehen kann. Nach aktueller Meinung hängt die Wahl, welches Konformer tatsächlich in Lösung vorliegt, bzw. das Verhältnis, in dem beide Konformere gebildet werden, von der Sequenz unmittelbar am Kreuzungspunkt ab (Altona, 1996). Durch die *stacked-X* Struktur ergeben sich zwei Paare von topologisch unterscheidbaren DNA-Einzelsträngen. In jeder der beiden quasi-durchgehenden Helices ist jeweils ein Einzelstrang für eine Helix durchgehend (*continuous*), während der andere im Kreuzungspunkt in die andere Helix wechselt (*exchange*). Die Einzelstränge, die über dem Kreuzungspunkt gegenüber liegen, also eine Schnittachse der X-Solvasen-Reaktion bilden, haben jeweils den gleichen topologischen Charakter. Der Wechsel der Konformation einer cruciformen DNA, durch alternatives Stapeln der Arme, ergibt auch einen Wechsel im topologischen Charakter der Einzelstränge; durchgehende Einzelstränge werden zu wechselnden und umgekehrt.

Die cruciforme DNA CFKla11 mit fixiertem Kreuzungspunkt kann demnach in zwei möglichen Konformationen in Lösung vorliegen, je nachdem welche Arme miteinander zur Helix gestapelt sind. Das Verhältnis, in dem beide vorliegen, ist charakteristisch für jede cruciforme DNA und wird maßgeblich von der Sequenz an der Kreuzung bestimmt.

Wenn die Reaktionen der Hjes unabhängig von einer Erkennungssequenz ablaufen, wie für Pfu-Hjc (Komori et al., 2000b) und Sso-Hjc (Kvaratskhelia and White, 2000)

angenommen, und im Gegensatz zu anderen X-Solvasen, wie z. B. RuvC (Shah et al., 1994) und Cce1 (White and Lilley, 1996), sollten also hauptsächlich strukturelle Merkmale des Substrats ausschlaggebend sein, für seine Erkennung, Bindung und Umsetzung. Das entscheidende Merkmal, das zur Umsetzung einer cruciformen DNA durch Hjc führt, ist also ihre *stacked-X* Struktur. Diese *stacked-X* Struktur kann aber, wie angesprochen, in zwei möglichen Konformationen vorliegen, die sich nicht in ihrer grundsätzlichen Struktur unterscheiden, sondern nur durch die strukturellen Eigenschaften ihrer Einzelstränge. Es gibt in beiden Konformeren zwei durchgehende und zwei wechselnde Einzelstränge, wobei der strukturelle Charakter der einzelnen Einzelstränge im Vergleich der Konformere genau ausgetauscht ist.

Ein festgelegter, rein strukturabhängiger Schnittmodus würde also jedes in der geeigneten *stacked-X* Struktur vorliegende cruciforme DNA-Substrat, durch Einfügen von *nicks* in gegenüberliegenden Einzelsträngen, also Einzelsträngen mit übereinstimmenden strukturellen Eigenschaften, auflösen. Denkbar wäre demnach sowohl eine Auflösungsreaktion durch Schnitt der durchgehenden als auch der wechselnden Einzelstränge.

Wenn der angenommene strukturabhängige Schnittmodus vorliegt, ist die Ursache für die Beobachtung einer präferentiellen Schnittachse dann allein das Verhältnis, in dem beide Konformere vorliegen. Im Fall von CFK1a11 lägen also nach dieser Vorhersage, bei einer Schnitteffizienz von 90 % über Schnittachse 02/04 und 10 % über Schnittachse 01/03, die Konformere in einem Verhältnis von 9:1 vor. Beide Konformere würden durch die gleichen sterischen Voraussetzungen erkannt und gebunden und es würden jeweils in den durchgehenden (oder wechselnden) Einzelsträngen *nicks* eingefügt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde versucht beide Konformere nachzuweisen, sowie deren Verhältnis in Lösung zu ermitteln. Würde sich die vermutete 9:1 Verteilung hier wiederfinden, wäre dies ein starker Hinweis auf die Strukturspezifität der Hjc-Reaktion mit CFK1a01 und würde eine Aussage über den strukturellen Zustand der geschnittenen Einzelstränge und somit die Identität des geschnittenen Konformers ermöglichen. Die hierzu angewendete Methode ergab jedoch keine Ergebnisse, die zur Aufklärung der Konformation von CFK1a11 führen konnten (siehe Anhang 6.1, Duckett et al., 1988). Andere Methoden

zur Aufklärung des Konformationszustandes von cruciformer DNA werden in 5.4.1 angesprochen.

Für Pfu-Hjc und Sso-Hjc existieren jedoch schon Daten, die zeigen, daß beide in Reaktion mit einer cruciformen DNA mit definierter Konformation eine starke Präferenz für Schnitte in die durchgehenden Stränge haben (Komori et al., 2000b; Kvaratskhelia and White, 2000c). Dieses stützt die Hypothese des maßgeblichen Einflusses der Konformation zur Erkennung und Bindung und eines definierten Schnittmodus für alle Hjcs: symmetrische Einzelstrangbrüche in den durchgehenden Einzelsträngen der cruciformen DNA in der *stacked-X* Struktur, jeweils 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes.

Dieser Schnittmodus müßte dann auch bei den Reaktionen der Hjcs mit CFKla01 zu den beobachteten Schnittmustern führen, was für die Positionen der Schnitte des Musters, wie angesprochen, auch gilt. Unter strukturellen Gesichtspunkten ergibt sich für die Reaktionen der Hjcs mit CFKla01 wieder ein deutlich komplexeres Bild. Das Substrat kann durch seine Fähigkeit zur *branch migration* zehn, durch die Sequenz am Kreuzungspunkt unterscheidbare, cruciforme DNAs bilden, die jeweils in beiden alternativen Konformationen vorliegen können. Potentiell liegt also eine Mischung von zwanzig unterschiedlichen Konformeren vor. Wenn in den unterschiedlichen Hjc-Reaktionen dasselbe CFKla01 Substrat aus derselben Präparation eingesetzt wird, so sollte jeweils auch dieselbe Mischung an Konformeren vorliegen. Obwohl Untersuchungen zur Dynamik des Konformationswechsels - im Gegensatz zur Festlegung, z.B. durch die Sequenz am Kreuzungspunkt - zu widersprüchlichen Ergebnissen führen (Carlstrom and Chazin, 1996; Overmars and Altona, 1997) deuten sie jedoch auf einen relativ statischen Zustand hin. Dieser wird vor allem mit dem energetisch ungünstigen Aufbrechen der gestapelten Basen in der *stacked-X* Struktur, wie es beim Überführen eines Konformers in ein anderes auftreten muß, begründet. Geht man also von einem festgelegten Verhältnis aller zwanzig Konformere aus, so führt dieselbe Mischung in allen Reaktionsansätzen mit den verschiedenen Hjcs zu unterschiedlichen Reaktionsprodukten. Dieses spiegelt sich in den individuellen Schnittmustern wider. Bei einem festgelegten Schnittmodus der Hjcs, nämlich 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes entfernt in den durchgehenden Einzelsträngen, ergibt sich daraus, daß aus dem Angebot der unterschiedlichen Konformere

diejenigen bevorzugt umgesetzt werden, die den spezifischen Anforderungen der einzelnen Hjcs am besten entsprechen.

Betrachtet man die Ergebnisse genauer, so stellt die Reaktion einzelner Hjcs jedoch die Vorgabe des statischen Verhältnisses der möglichen Konformere in Frage. Die Reaktion von Mja-Hjc mit CFK1a01 setzt in der Reaktion über die Schnittachse 02/04 nahezu das gesamte Substrat durch Schnitt an einer Position um (Abb. 4.7, C, D, Spuren 6). Das ist mit dem festgelegten Schnittmodus der Hjcs nur möglich, wenn durch *branch migration* der Großteil des Substrats in die von Mja-Hjc präferierte Konformation übergegangen ist, da ganz offensichtlich in Reaktionsansätzen mit anderen Hjcs und identischem Substrat, dieses in mehreren Konformationen mit ähnlichen Anteilen - entsprechend der Intensität der Banden im Schnittmuster - vorliegt.

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Hjcs individuelle Fähigkeiten zur Substraterkennung haben müssen und möglicherweise den Konformationszustand des Substrates manipulieren können. Diesen individuellen Fähigkeiten müssen Unterschiede in der Interaktion zwischen Hjc und Substrat zu Grunde liegen, das heißt, es müßten strukturelle Unterschiede zwischen den Hjcs vorliegen, die diese Interaktion vermitteln.

Um mögliche Bereiche einzugrenzen, die an den individuellen Hjc-Substrat-Interaktionen beteiligt sind, wurden die homologen Sequenzen der Hjcs nach markanten Unterschieden untersucht. Außerdem war die Publikation der Kristallstruktur von Pfu-Hjc von großer Hilfe, da sie ein Modell für die Bindung von cruciformer DNA vorschlägt (Abb. 5.2; Nishino et al., 2001). Dieses Modell zeigt Pfu-Hjc mit einer anmodellierten cruciformen DNA in der *stacked-X* Struktur und für bestimmte Bereiche, nämlich dem N- Terminus, sowie zwei Schleifen (*loops*) zwischen β -Faltblattsträngen, engen Kontakt zum Substrat voraus. Bei Untersuchung dieser Bereiche im Sequenz-Alignment (siehe Abb. 4.12) zeigen sich auch deutliche Unterschiede zwischen den Hjcs. Sie sind viel variabler als die sie umgebenden konservierten Bereiche, die vor allem an der Ausbildung von definierten Sekundärstrukturelementen beteiligt sind, und für die Aktivität der Hjcs essentielle Aminosäuren beinhalten. Außerdem ist die Verteilung an basischen Aminosäuren,

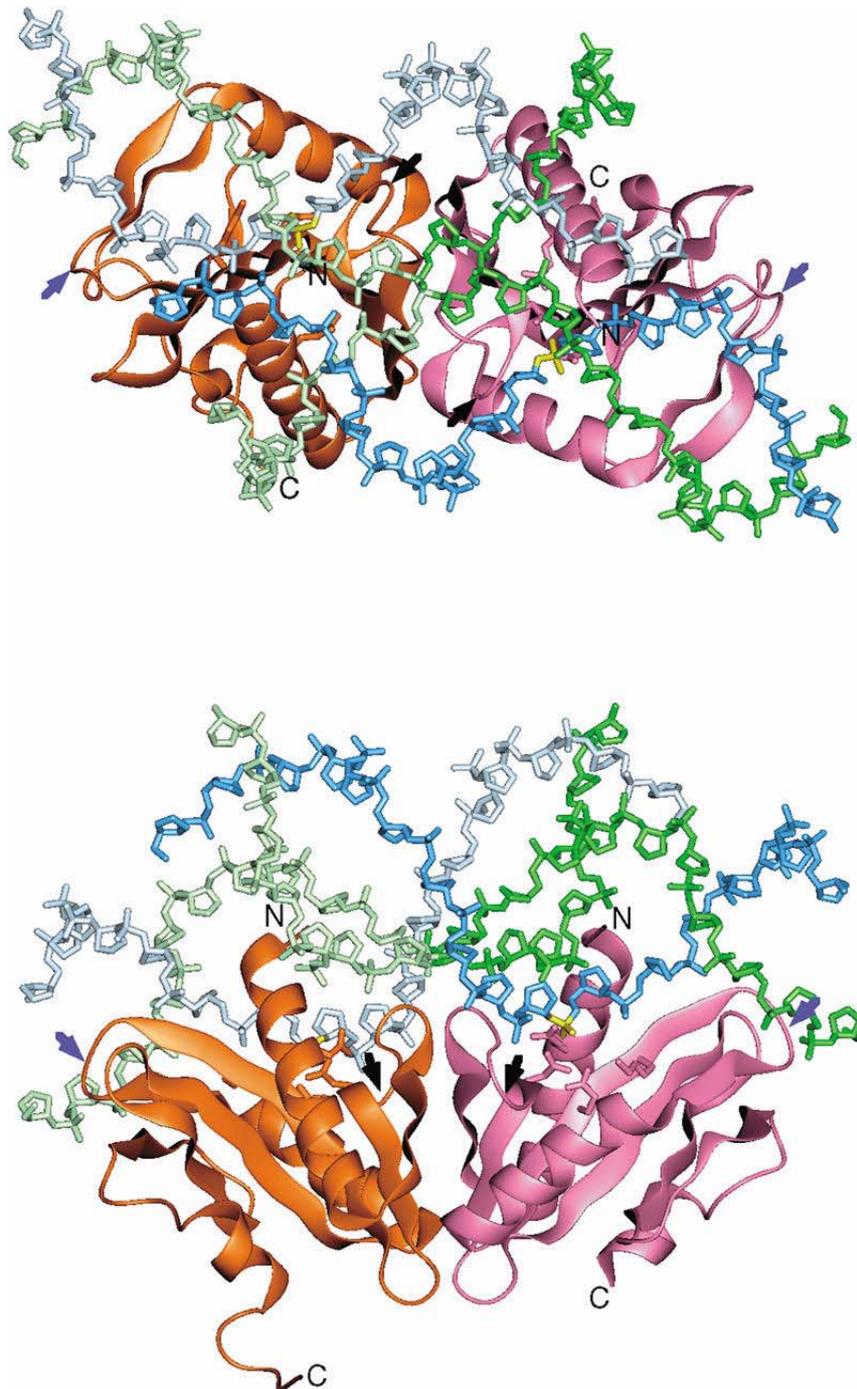


Abb. 5.2, Modell des Pfu-Hjc-Holliday-Struktur-Komplexes. Zwei orthogonale Ansichten sind gezeigt. Pfu-Hjc liegt als Homodimer vor (*orange, rosa*), die N- und C-Termini sind angezeigt. Die vier Einzelstränge der cruciformen DNA sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die durchgehenden Stränge in *hellblau* und *dunkelblau*, die wechselnden Einzelstränge in *hellgrün* und *dunkelgrün*. Das Phosphat der Schnittposition 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes ist *gelb* hervorgehoben. Pfeile kennzeichnen die *loops* zwischen dem β_1 - und β_2 -Strang (*schwarz*) und dem β_3 - und β_4 -Strang (*blau*). (Nishino et al., 2001)

die elektrostatische Bindungen zum Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA ausbilden und so ihre Konformation beeinflussen können, in den drei Bereichen auffällig unterschiedlich. Um zu prüfen, ob diese drei Bereiche die strukturelle Grundlage der beobachteten Spezifitäten der Hjcs sind, sollten diese hypothetischen DNA-Interaktions-Domänen zwischen Hjcs mit möglichst großen Unterschieden im Schnittmuster für CFK1a01 ausgetauscht werden. Die Wahl fiel auf Pfu-Hjc und Afu-Hjc (siehe Abb. 4.7, A-D, Spuren 1 und 7). Durch *site-directed mutagenesis* wurden die drei hypothetischen Domänen von Afu-Hjc, in allen möglichen Kombinationen in Pfu-Hjc, übertragen (siehe Abb. 4.13) und so chimäre Hjcs konstruiert.

Wären eine oder mehrere dieser drei Domänen Ausschlag gebend für die Spezifität der Hjcs, müßte sich durch die Übertragung der Afu-Hjc Domänen in Pfu-Hjc, dessen Spezifität ebenso ändern. Das chimäre Pfu-Afu-Hjc müßte in Reaktion mit CFK1a01 das für Afu-Hjc typische Schnittmuster zeigen. In Reaktionen mit CFK1a01 zeigten die chimären Hjcs mit ausgetauschter Afu2-Domäne keine Aktivität. Bei Chimären mit ausgetauschten Afu1- und Afu3-Domänen dagegen blieb die Aktivität erhalten, doch produzierten sie Schnittmuster, die keinem der natürlichen Hjcs entsprachen (siehe Abb. 4.16, 4.17).

Eine Überführung des Pfu-Hjc Schnittmusters in das von Afu-Hjc konnte durch die Integration der Afu-Domänen nicht erreicht werden. Die oben angesprochene Frage der strukturellen Basis der Unterschiede in der Spezifität einiger Hjcs konnte nicht erschöpfend geklärt werden. Es zeigte sich aber, daß mindestens zwei der drei Bereiche der Hjcs, die als hypothetische DNA-Interaktionsdomänen definiert wurden, Einfluß auf die Wahl der zu schneidenden Konformere aus einer angebotenen Substratpopulation haben.

Dieses ist somit der erste Nachweis von Domänen einer X-Solvase, die Einfluß auf die spezifische Erkennung und Umsetzung von alternativen Konformationen einer cruciformen DNA haben. Die biologische Bedeutung dieser alternativen Konformere und deren Auflösung, liegt vor allem in den bereits angesprochenen Unterschieden der resultierenden *patch* oder *splice* Rekombinationsprodukte (Einleitung 1.2, Abb. 1.3), die aus der Auflösung beider Konformere durch die gleiche Enzymaktivität hervorgehen. Wenn die Hjcs also eine bestimmte Spezifität aufweisen, die zur

bevorzugten Umsetzung eines Konformers führt, bestimmt diese Spezifität maßgeblich das Ergebnis einer Rekombination.

5.2 Virale archaeale Hjcs

Entsprechend den zellulären archaealen Hjcs konnten homologe Sequenzen zu Pfu-Hjc in den Genomen der Viren SIRV1 und SIRV2 nachgewiesen werden. Die gefundenen Sequenzen waren zueinander sehr homolog (85 % Identität), zeigten im Vergleich mit den zellulären Hjcs aber eine deutlich geringere Homologie als diese untereinander. Die Homologie der SIRV-Hjcs zu dem Hjc ihres Wirtes *Sulfolobus islandicus*, war nicht größer als die zu Hjcs aus anderen Archaeen, die nicht von ihnen infiziert werden können. Dieses führt zu verschiedenen phylogenetischen Hypothesen zum Ursprung der Hjcs. Eine Übertragung des Hjc-Gens zwischen Wirt und Virus ist höchst wahrscheinlich, denn eine konvergente Evolution aus unterschiedlichen Wurzeln hin zu einer in diesem Ausmaß homologen Sequenz (siehe Abb. 4.1) ist nahezu ausgeschlossen. Eine Verteilung der Hjcs über das gesamte biologische Reich der Archaeen legt eine frühe Entstehung, noch vor der Auftrennung der Archaeen zu unterschiedlichen Arten nahe. Ihre hohe Homologie spricht für eine starke Konservierung, was auf eine wichtige biologische Rolle schließen läßt. Man kann also von einer Entstehung im Wirt und nachfolgender Übertragung des Hjcs auf das Virus ausgehen. Wenn das so ist, dann sollte eine höhere Homologie zwischen Wirts-Hjc und Virus-Hjc als zu den anderen zellulären Hjcs bestehen. Das aber ist nicht der Fall. Eine Erklärung hierfür könnte eine hohe Mutabilität des Virusgenoms sein, die vorhandene Homologien verwischt. Für SIRV1 konnten eine außergewöhnlich hohe Mutationsrate (10^{-3} Veränderungen pro Nukleotid und Replikationszyklus) und genomische Instabilitäten bereits nachgewiesen werden (Prangishvili et al., 1999). Die zweite Alternative wäre die Entstehung eines Hjcs in einem Virus, das den gemeinsamen Vorfahren aller Archaeen infizierte und sein Hjc übertrug. Die dritte Möglichkeit wäre eine umfassende Verbreitung des Hjcs vom Wirt des ursprünglich übertragenden Virus auf alle Hjc tragenden Archaeen-Arten durch horizontalen Gentransfer. Weitere bioinformatische Methoden könnten hier zur Klärung beitragen.

Nach Klonierung der Gene und Reinigung der kodierten Proteine konnten Reaktionen mit den oben beschriebenen cruciformen Substraten CFK1a01 und

CFK1a11 durchgeführt werden, wobei die Hjcs aus SIRV1 und SIRV2 die für X-Solvase typische Reaktion zeigten. Wie schon bei den zellulären Hjcs beobachtet, lösten die viralen Hjcs die cruciforme DNA mit fixiertem Kreuzungspunkt durch das paarweise Einfügen von *nicks* an einer Position auf und zeigten eine deutliche Präferenz für eine Schnittachse. Reaktionen mit dem Substrat mit Fähigkeit zur *branch migration* führten wieder zu mehreren Produkten mit unterschiedlichen Schnittpositionen über beide Schnittachsen. Reaktionen von SIRV1-Hjc und SIRV2-Hjc führten mit beiden Substraten zu identischen Produkten. Die Position der eingefügten *nicks* bei der Auflösung des fixierten Substrats war jedoch nicht wie bei den zellulären Hjcs 3 Nukleotide, sondern 2 Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkt entfernt. Alle Schnitte des Musters der Reaktion mit CFK1a01 sind, bei entsprechender *branch migration*, mit dieser Position in Übereinstimmung, so daß entsprechend den zellulären Hjcs von einer festgelegten Distanz der aktiven Zentren ausgegangen werden kann. Dieses deutet wieder auf einen festgelegten Schnittmodus der viralen Hjcs hin, der sich von dem der zellulären Hjcs durch die Positionen der *nicks* zur Auflösung der cruciformen DNA unterscheidet.

Endonuklease VII (Endo VII) des Bakteriophagen T4, sowie eine weitere X-Solvase (Hje) aus *Sulfolobus solfataricus* schneiden cruciforme DNA ebenfalls durch das Einfügen von *nicks* 2 Nukleotide 3' vom Kreuzungspunkt entfernt (siehe Abb 4.9, A, B). Für Hje ist bereits ein viraler Ursprung diskutiert worden (Kvaratskhelia et al., 2001), eine engere Verwandtschaft zu SIRV-Hjc als zu den zellulären Hjcs läßt sich durch Sequenzvergleich aber nicht feststellen (jeweils im Bereich von 30 % Identität / 40 % Ähnlichkeit).

Eine Überlagerung der Strukturen von Endo VII mit SIRV-Hjc zum Vergleich der Lage ihrer aktiven Zentren wäre interessant, da beide, ohne Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen, übereinstimmender Schnittpositionen mit CFK1a11 aufweisen. Außerdem zeigte Endo VII, im Gegensatz zu allen untersuchten Hjcs, keine Schnittachsenpräferenz bei Reaktionen mit CFK1a1, so daß der Vergleich Hinweise auf die Ursache dieser unterschiedlichen strukturellen Präferenzen ergeben könnte.

Im Gegensatz zu den zellulären Hjcs, gibt es für die viralen Hjcs Indizien für eine biologische Funktion. Anstoß hierzu gab die Beobachtung, daß sich einige typische

Merkmale eukaryotischer Poxviren, bei den SIRVs wiederfinden lassen (Peng et al., 2001). Ihre Genome (SIRV1: 32,3 kb; SIRV2: 35,8 kb) bestehen aus linearer doppelsträngiger DNA, die an den Enden kovalent geschlossen ist. An beiden Enden liegen gleiche Sequenzen von etwa 2 kb, jedoch in umgekehrter Orientierung, vor (*inverted terminal repeats*, ITRs). Für Poxviren typische Replikationsintermediate, mit einer alternierenden Orientierung der noch verbundenen Genomeinheiten (*head-to-head* und *tail-to-tail*), lassen sich auch für die SIRVs

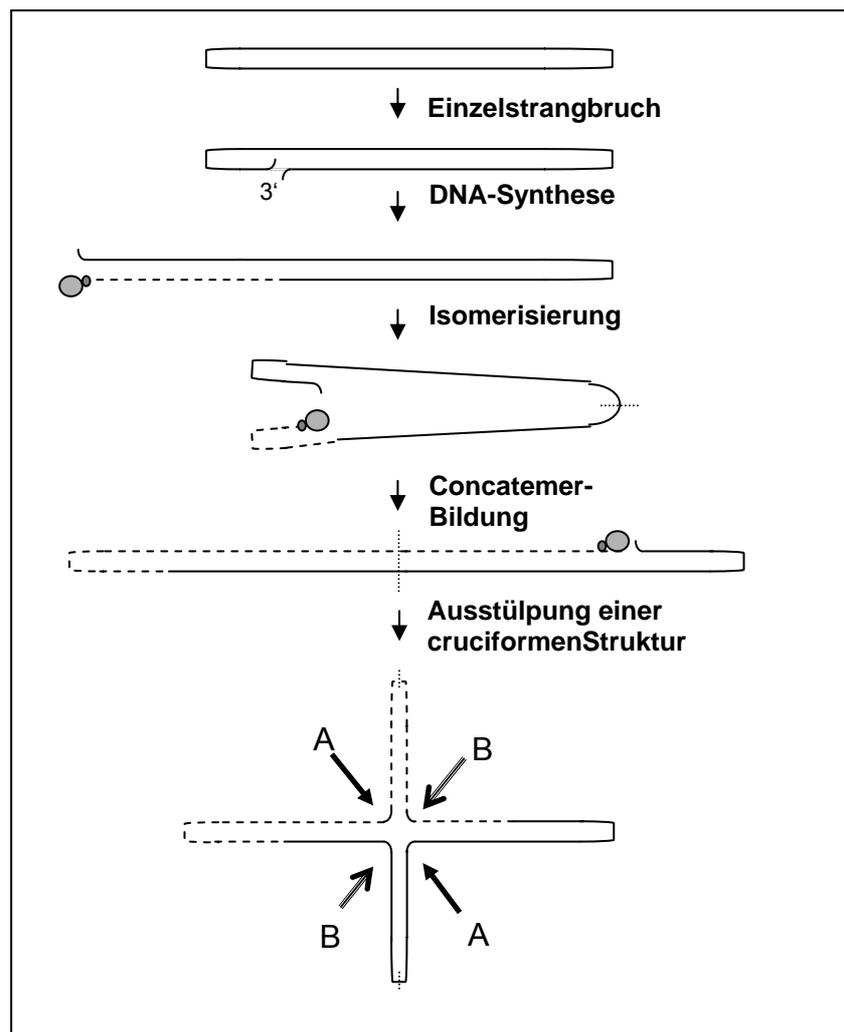


Abb. 5.3, Modell des Replikationsmechanismus von SIRV. Oben ist das lineare, doppelsträngige, kovalent geschlossene SIRV-Genom dargestellt. Nach Einfügen eines Einzelstrangbruches setzt DNA-Synthese am freien 3'-Ende ein. Wird das Ende des Matrizen-Stranges erreicht, können das neu replizierte und das ursprüngliche Genomende isomerisieren und der andere Einzelstrang dient als Matrize für die weitere DNA-Synthese. Bei Erreichen der Position des initialen Einzelstrangbruches liegen zwei vollständig replizierte SIRV-Genome im Zustand des concatemeren Replikationsintermediates vor. Dieses kann durch seinen palindromischen Charakter zu einer cruciformen Struktur ausgestülpt werden und durch die Aktivität einer X-Solvase auf zwei unterschiedliche Arten (Schnittachse A und B) aufgelöst werden. In beide Fällen werden zwei vollständige und identische SIRV-Genome produziert. In Anlehnung an den Pox-Virus-Replikationsmechanismus. (Traktman, 1996)

nachweisen. Außerdem tragen beide Genome in ihren ITRs eine aus Pox-Viren bekannte Konsensus-Sequenz (siehe Abb. 4.11, A), die hier für die Auflösung der concatemeren Replikationsintermediate durch die Aktivität einer X-Solvase notwendig ist (Merchinsky, 1990). Ein entsprechender Replikationsmechanismus (Abb. 5.3), mit SIRV-Hjc als Replikationsintermediat auflösende X-Solvase ist also denkbar.

Zur Untersuchung ihres Einflusses auf die Schnittaktivität wurde die Konsensus-Sequenz in eine synthetische cruciforme DNA integriert. Dabei war der Kreuzungspunkt über den gesamten Bereich der Konsensus-Sequenz mobil, so daß jede Position der möglichen Erkennungssequenz unmittelbar am Kreuzungspunkt, oder auch an anderen für die Erkennung durch SIRV-Hjc erforderlichen Positionen, liegen kann. Bei einer spezifischen Reaktion mit dieser Sequenz wäre entweder eine Steigerung der Schnitteffizienz oder eine Festlegung der unterschiedlichen Schnittpositionen einer sequenzspezifischen Reaktion auf eine bestimmte Position zu erwarten gewesen. Beides konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4.11, B). Wenn also der, durch die dargestellten Hinweise gestützte, Replikationsmodus bei SIRV abläuft, findet die Auflösungsreaktion entweder sequenzspezifisch durch Hjc statt oder es existieren akzessorische Enzyme für Hjc, um eine sequenzspezifische Reaktion zu ermöglichen (siehe 5.4.2). Diese Enzyme könnten die Holliday-Struktur in einer zu RuvAB für die Reaktion von RuvC (Shah et al., 1994) vergleichbaren Weise prozessieren. Es ist aber auch ein sequenzspezifisch bindendes und Hjc aktivierendes Protein denkbar, entsprechend eukaryotischen Transkriptionsfaktoren oder Restriktionsenzymen mit getrennten Sequenzerkennungs-Domänen und Nuklease-Domänen. Möglicherweise werden die Replikationsintermediate auch durch andere Enzymaktivitäten aufgelöst, da der oben angesprochene Ursprung der Hjcs als zelluläre Enzyme der zentralen Rolle im Replikationsmodus der SIRVs widersprechen würde. Wie sollte SIRV vor Erwerb des Hjcs von seinem Wirt die Replikationsintermediate aufgelöst haben?

5.3 Komplementation von Endonuklease VII

Durch Komplementationsexperimente mit Endonuklease VII (Endo VII) defizienten T4-Bakteriophagen (T4g49^{am}) konnte nachgewiesen werden, daß die archaealen Hjcs in einem gewissen Maß die Funktionen von Endo VII für eine erfolgreiche Phagenentwicklung (Mosig, 1998; Golz and Kemper, 1999) übernehmen können. Die Phagenentwicklung, gemessen durch Plaque-Tests, konnte durch die heterologe Expression in T4g49^{am} infizierten *E. coli*, zwischen 20fach (Ape-Hjc) und 400fach (Pho-Hjc) gesteigert werden. Die Unterschiede im Ausmaß der Komplementation können auf die beschriebenen Spezifitätsunterschiede der Hjcs, aber auch auf Beschränkungen des Komplementations-Systems zurückzuführen sein (siehe 4.4).

Mit diesen Experimenten konnte erstmals die Aktivität der Hjcs als Holliday-Struktur auflösende Enzyme in einem *in vivo*-System nachgewiesen werden. Mittlerweile existiert eine Veröffentlichung, die eine Komplementation von *ruv* defizienten *E. coli* durch Mth-Hjc beschreibt (Bolt et al., 2001). Durch die Ausnutzung des *E. coli* / T4 –Systems konnten die Beschränkungen der archaealen Systeme mit ihren mangelnden genetischen Techniken umgangen werden. Der Erfolg der Komplementationen zeigt darüber hinaus, daß die Hjcs in einem heterologen System bei einer Temperatur von 37°C, also weit unterhalb ihrer natürlichen Bedingungen (80°C) aktiv sind. Dieses war trotz der speziellen chemischen Modifikationen (hydroxymethyliertes Cytosin und Glukosylierung) des Substrats VFS-DNA möglich, die es für viele Restriktionsendonukleasen nicht schneidbar macht.

Aus der T4-Perspektive gibt die Komplementation von Endo VII durch die Hjcs Hinweise auf die Anforderungen an Endo VII zur Phagenentwicklung, neben der Funktion als X-Solvase zur Auflösung von verzweigter, concatemerer DNA aus rekombinationsabhängiger Replikation, vor deren Verpackung als einzelne Genomeinheiten in T4-Phagenköpfe. Die Rolle von Endo VII in der Verpackungsmaschinerie von T4 mit diversen Interaktionen mit anderen T4-Proteinen wird voraussichtlich nicht von Hjcs ersetzt werden können, da sich beide Enzyme strukturell erheblich voneinander unterscheiden. Nach vorliegenden Daten (Komori et

al., 2000b; Kvaratskhelia and White, 2000; eigene Daten, nicht gezeigt) können die Hjcs außerdem DNAs mit ungewöhnlichen Strukturen (Y-Struktur, Einzelstrang-Überhänge, ...), wie sie bei der rekombinationsabhängigen Replikation von T4 entstehen, nicht mit der Effizienz von Endo VII schneiden. Wenn Hjc ausschließlich die X-Solvase-Funktion von Endo VII komplementiert, Endo VII neben dem Auflösen von cruciformer DNA aber noch andere Funktionen in der Phagenentwicklung übernimmt, wäre also zu erwarten, daß Endo VII nicht zu 100 % durch die Hjcs komplementiert werden kann. Die Hjcs zeigten in den durchgeführten Experimenten auch nur etwa 10 % des Komplementationsfaktors einer Positivkontrolle mit einer Endo VII-Mutante mit etwa 10 % der wt-Aktivität. Das würde einer Komplementationseffizienz von 1 % im Vergleich mit wt-Endo VII entsprechen. Geht man davon aus, daß beide enzymatischen Aktivitäten durch die Überexpression im Wirt in nicht limitierender Konzentration vorliegen, daß also sämtliche Substrate für eine X-Solvase (cruciforme Strukturen der VFS-DNA) umgesetzt werden können, läßt der Anteil der X-Solvase-Aktivität an den Funktionen von Endo VII für die Phagenentwicklung abschätzen. Der Unterschied in den Komplementationsfaktoren drückt genau diesen Anteil aus. Bei einer 10fachen Steigerung der Phagenentwicklung, gemessen durch Plaque-Tests, für ein Hjc im Vergleich mit einer 100fachen Steigerung der Phagenentwicklung für die Positivkontrolle macht die, von Hjc komplementierbare, X-Solvasen Aktivität nur ein Zehntel des Effekts von Endo VII auf die Phagenentwicklung aus. Die angenommene Sättigung der X-Solvase Aktivität in den überexprimierenden Wirtszellen müsste aber noch zur endgültigen Bestätigung durch umfassende Quantifizierungen der X-Solvase Aktivitäten in den einzelnen Komplementationsexperimenten abgesichert werden (siehe 5.4.3). Nach Quantifizierung der X-Solvase Aktivitäten könnten bei Unterschieden die Komplementationsfaktoren normalisiert, das heißt auf ihre jeweiligen X-Solvase-Aktivitäten bezogen werden. Durch den Vergleich der normalisierten Komplementationsfaktoren der Hjcs mit der ebenfalls normalisierten Positivkontrolle könnte der Anteil der X-Solvasen-Aktivität unter den diversen Funktionen von Endo VII für die Phagenentwicklung wieder abgeschätzt werden. Über die unterschiedlichen Funktionen von Endo VII für die Entwicklung von T4 existieren diverse Publikationen, die sich vor allem auf die endonukleolytischen Fähigkeiten von Endo VII, sowie die Rolle in der Morphogenese von T4 beziehen. Eine Abschätzung des Einflusses der unterschiedlichen Funktionen auf die

erfolgreiche Phagenentwicklung wurde bislang jedoch nicht gezeigt und unterstreicht das Potential von heterologen Komplementationsexperimenten.

5.4 Vorschläge für weiterführende Experimente

5.4.1 Zelluläre archaeale Hjcs

Zur Bestätigung des vorgeschlagenen Schnittmodus der Hjcs (Einfügen von *nicks* 3 Nukleotide 3' des Kreuzungspunktes entfernt, in den durchgehenden Strängen der in *stacked-X* Struktur vorliegenden cruciformen DNA), wäre es nötig, Substrate mit bekannten Konformationen einzusetzen. Die Ermittlung der Konformation von CFK1a11 und CFK1a01 mit der in 6.1 dargestellten Methode war, wie angesprochen, nicht möglich. Eine alternative Methode zur Bestimmung des Konformationszustandes ist die FRET-Methode (*fluorescence resonance energy transfer*), bei der an die Enden zweier Arme der cruciformen DNA Fluoreszenz-Marker gekoppelt werden, die nur bei Annäherung aneinander bestimmte Signale abgeben (Clegg et al., 1994). Dieses ist nur der Fall, wenn die zwei markierten Arme in der *stacked-X* Struktur in unterschiedlichen Helices, aber in der gleichen Orientierung zum Kreuzungspunkt vorliegen.

Eine andere Möglichkeit wäre der Einsatz von cruciformen DNAs, die durch spezielle Verbindungen (*tether*, Kimball et al., 1990) in einer vorgegebenen Konformation festgehalten werden. Durch die Fixierung einer Konformation wird jedoch nicht der natürliche Zustand der cruciformen DNAs wiedergegeben und die *tether* bilden selber strukturelle Hindernisse, die in natürlichen Holliday-Strukturen nicht auftreten.

Um die Schnittspezifität vermittelnden DNA-Interaktionsdomänen weiter eingrenzen zu können, könnten weitere chimäre Hjcs konstruiert werden oder auch Deletionen und Punktmutationen in den Bereichen der hypothetischen Domänen eingeführt werden.

Außerdem könnten durch EMSA-Tests (*electrophoretic mobility shift assay*) Untersuchungen zur Substratbindung der chimären Hjcs durchgeführt werden, die

zum Beispiel klären würden, ob die Inaktivierung des chimären PA2-Hjcs auf eine verhinderte Substratbindung oder eine Inaktivierung der Schnittreaktion zurückzuführen ist.

Endgültige Klarheit über Unterschiede der Hjcs in ihrer Substraterkennung und – Substratbindung, und der daraus resultierenden spezifischen Schnittreaktion, würden Co-Kristallstrukturen mit gebundener cruciformer DNA bringen.

Um den Hjcs eine biologische Funktion zuzuordnen zu können, liegt in Ermangelung von genetischen Methoden für die meisten Archaeen, eine Einordnung in einen bestimmten zellulären Mechanismus, durch Suche nach Interaktionspartnern mit bekannten Funktionen, nahe. Dazu könnte das *Two-Hybrid*-System oder die Affinitätschromatographie (siehe auch 5.4.2) eingesetzt werden. Der Effekt der gefundenen Interaktionspartner ließe sich durch *in vitro*-Tests, zum Beispiel zur Veränderung der Spezifität in Reaktionen mit cruciformer DNA oder in Rekombinations- und Reparatur-Assays, untersuchen.

5.4.2 Virale Hjcs

Für die viralen Hjcs wäre vor allem eine Überprüfung der möglichen Funktion als X-Solvase zur Trennung der concatemeren Replikationsintermediate interessant (Abb. 5.3). Zum Nachweis dieser Auflösungsreaktion wäre das hypothetische natürliche Substrat, isolierte Replikationsintermediate, ideal. Diese lassen sich jedoch nicht in ausreichender Menge für einen *in vitro*-Nachweis reinigen (D. Prangishvili, persönliche Mitteilung). Eine Alternative wäre den Übergangsbereich von zwei nach der Replikation noch verbundenen Genomen in ein Plasmid zu klonieren. Dieser palindromische Bereich aus Teilen der Sequenzen der ITRs würde sich unter der Torsionsspannung des Plasmids zu einer cruciformen DNA ausstülpfen, wie es schon für andere Plasmide mit palindromischen Sequenzen gezeigt worden ist (Gellert et al., 1983). Dieses Substrat ließe sich durch Standardtechniken relativ leicht verändern, so daß sich durch Verkürzung des Übergangsbereichs oder durch Mutagenese der angesprochenen Konsensus-Sequenz relevante Bereiche für die Aktivität von Hjc ermitteln ließen. Diese Substrate könnten auch mit Lysaten von SIRV-infizierten und uninfizierten *Sulfolobus islandicus* Kulturen eingesetzt werden, um mögliche andere

oder spezifischere Aktivitäten zur Auflösung der Replikationsintermediate nachweisen zu können. Diese Lysate oder auch gereinigte Fraktionen könnten in Kombination mit Hjc und diesen Substraten für die Suche nach akzessorischen Proteinen, die eine Änderung der Aktivität von Hjc bewirken, eingesetzt werden.

Wie schon in 5.4.1 angesprochen, könnte versucht werden, Interaktionspartner der SIRV-Hjcs zu ermitteln, um den Hjc eine biologische Funktion zuordnen zu können. Dieses könnte durch Affinitätschromatographie möglich sein, und wurde im Rahmen dieser Arbeit auch versucht. Dazu sollte SIRV-Hjc durch einen *His-tag* an eine NiNTA-Matrix gebunden werden. Diese Matrix sollte dann für die Isolation von spezifischen Interaktionspartnern aus *Sulfolobus islandicus* Lysaten eingesetzt werden. Durch den Einsatz von Lysaten von infizierten und uninfizierten Kulturen könnten virale und zelluläre Partner unterschieden werden und durch den Einsatz von Lysaten nach unterschiedlichen Infektionszeiten eventuell auch Interaktionspartner aus unterschiedlichen Infektionsphasen. Isolierte Interaktionspartner könnten durch Ansequenzierung und Vergleich mit den vollständig sequenzierten viralen Genomen und auch dem sequenzierten Genom des nahe verwandten *Sulfolobus solfataricus*, einem Gen zugeordnet werden, mit allen daraus resultierenden Möglichkeiten für weitere Charakterisierungen.

Dieser Ansatz wurde jedoch aufgegeben, weil es nicht gelang, eine kontrollierte, das heißt durch Plaque-Tests quantifizierbare Infektion, von *Sulfolobus islandicus* durch SIRV zu erreichen.

5.4.3 Komplementation von Endonuklease VII

Die spezifische Aktivität in den unterschiedlichen, zur Expression der archaealen Hjcs transformierten *E. coli* Wirtskulturen, könnte durch den Einsatz von gereinigter, radioaktiv markierter VFS-DNA quantifiziert werden. Durch den Einsatz dieses natürlichen Substrats für Endo VII, kann die Reaktion, die zur Komplementation führt, besser als mit dem M13-Substrat (siehe 3.1.8.2, Abb. 4.19) *in vitro* nachvollzogen werden. Mit den normalisierten Komplementationfaktoren ließen sich sowohl die Aktivitäten der Hjcs in den Komplementationsexperimenten als spezifische Eigenschaften der einzelnen Hjcs vergleichen, als auch der in 5.3

angesprochene Anteil der X-Solvase-Reaktion für die Funktion von Endo VII zur Phagenentwicklung bestimmen.

5.5 Ausblick

Zwei Aspekte sollten bei weiteren Arbeiten auf dem Gebiet der archaealen Hjcs vorrangige Bedeutung haben.

Erstens sollten weitere Untersuchungen zu den strukturellen Grundlagen der verschiedenen spezifischen Eigenschaften der Hjcs durchgeführt werden, die Einblicke in den ungeklärten Mechanismus der X-Solvase-Reaktion und ihren Anforderungen für die Erkennung von spezifischen Strukturen, geben können. Dieser Ansatz könnte ebenfalls Licht auf die noch nicht ausreichend geklärten Eigenschaften der Struktur von cruciformer DNA, sowie der Dynamik ihrer Konformationswechsel werfen. Neben der beschriebenen Mutagenese einzelner Hjcs, wären die Co-Kristallstrukturen der Hjcs mit gebundener cruciformer DNA hier das ultimative Ziel.

Zweitens ist die Zuweisung einer biologischen Funktion für die archaealen Hjcs entscheidend. Im Fall der viralen Hjcs gibt es einen Ansatzpunkt, eine Funktion in der DNA-Replikation, der sich mit den beschriebenen Methoden weiter verfolgen ließe. Für die zellulären Hjcs wäre, neben der angesprochenen Einordnung in einen zellulären *pathway* durch die Suche nach Interaktionspartnern, auch ein genetischer Ansatz möglich. Durch die Suche nach oder die Konstruktion von Hjc-defizienten Mutanten könnte möglicherweise ein Phänotyp beobachtet werden, der Rückschlüsse auf die Funktion von Hjc zuließe. Jedoch sind genetische Techniken für Archaeen nicht gut etabliert, und ihre extremen Lebensbedingungen machen mikrobiologische Techniken schwierig. Der geeignetste Kandidat für den genetischen Ansatz wäre eine *Sulfolobus* Art, da sie relativ leicht zu kultivieren ist (aerob, heterotroph, Wachstumstemperatur 80°C), das Genom zweier Spezies vollständig sequenziert ist und Plasmide und eine Vielzahl von Viren nachgewiesen sind, die Potential für die Entwicklung neuer genetischer Techniken haben (Zillig et al., 1996; Zillig et al., 1998).

Die Zuweisung einer biologischen Funktion für die SIRVs oder für ein Archaeon könnte außerdem eine Aussage über den phylogenetischen Ursprung dieser, innerhalb des biologischen Reiches der Archaeen weit verbreiteten und hoch konservierten X-Solvasen treffen.

6 Anhang

6.1 Konformationsaufklärung von CFKla11

Es wurde versucht, durch paarweises Verkürzen der Arme einer cruciformer DNA durch Restriktionsenzyme und anschließender Analyse der Reaktionsprodukte, Rückschlüsse auf ihre Konformation zu ziehen. Die angewendete Methode (Duckett et al., 1988) basiert auf den unterschiedlichen sterischen Eigenschaften der Reaktionsprodukte zweier Konformere cruciformer DNA, nach der Umsetzung mit den gleichen Restriktionsenzymen. Wenn die sterischen Eigenschaften der cruciformen DNA in den Produkten mit verkürzten Armen erhalten bleiben, führt dies zu unterschiedlichen, in drei Gruppen einteilbaren Reaktionsprodukten, die sich durch ihre Laufweite bei nativer PAA-Gelelektrophorese unterscheiden (Abb. 6.1).

Durch das paarweise Verkürzen von Armen sollten für die cruciformen DNAs

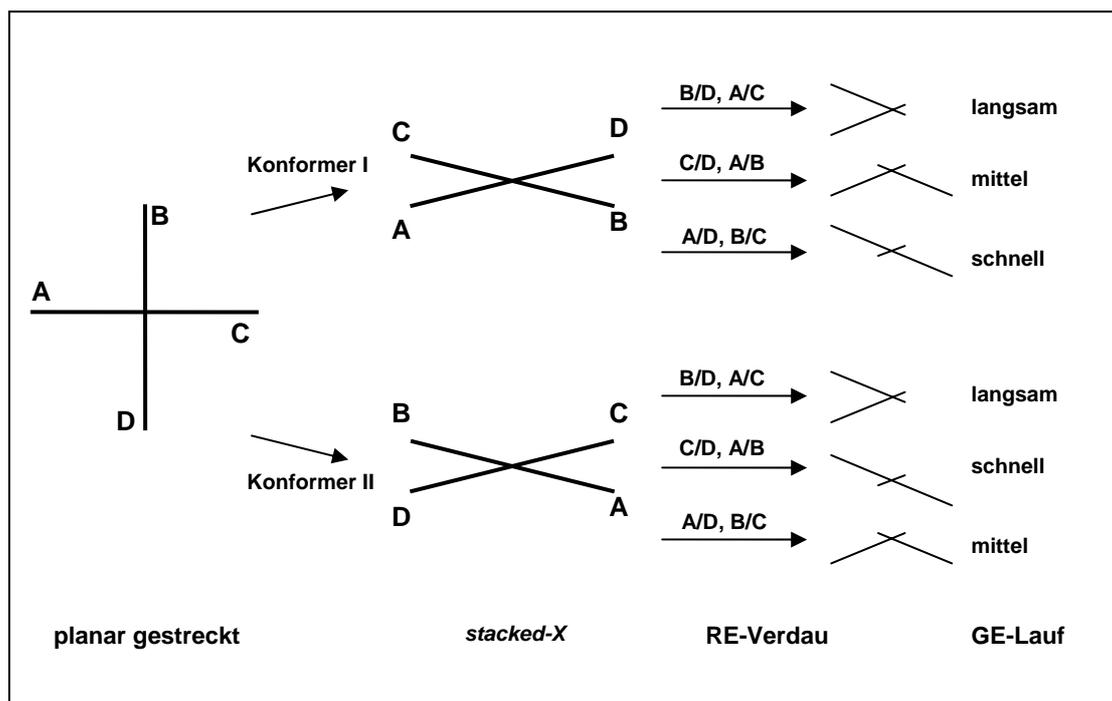


Abb. 6.1, Experiment zur Bestimmung der Konformation cruciformer DNA. Schematisch dargestellt ist die Charakterisierung des Konformationszustandes von cruciformer DNA durch den paarweisen Einsatz von vier unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (A-D), die jeweils in einem Arm der cruciformen DNA eine Erkennungssequenz haben und die Analyse der Reaktionsprodukte durch native PAA-Gelelektrophorese. Links ist die cruciforme DNA in der planar gestrecketen Konformation dargestellt, die sie bei Mg^{2+} -Konzentrationen von weniger als $100 \mu M$ annimmt. Bei Steigerung der Mg^{2+} -Konzentration nimmt sie eine von zwei möglichen *stacked-X* Konformationen an. Durch die Umsetzung mit paarweise eingesetzten Restriktionsendonukleasen, ergeben für jedes Konformer sich sechs unterschiedliche Produkte, die eine von drei möglichen Laufverhalten bei nativer Gelelektrophorese (GE) aufweisen. Die Kombinationen der Laufverhalten der Reaktionsprodukte sind charakteristisch für jedes Konformer. (nach Duckett et al., 1988)

CFKla01 (mobiler Kreuzungspunkt) und CFKla11 (fixierter Kreuzungspunkt) die Konformation in der sie in Lösung, also auch in den Reaktionen mit den unterschiedlichen H_{jcs} vorliegen, ermittelt werden. Dazu wurden sie entsprechend dem Schema in Abb. 6.1 mit Restriktionsenzymen umgesetzt und die Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Die vorhergesagten 3 Produktgruppen (langsam, mittel, schnell) ließen sich jedoch nicht in einer übereinstimmenden Weise wiederfinden (Abb. 6.2), so daß das Ergebnis nach dem dargestellten Schema nicht interpretierbar war. Unterschiedliche Bedingungen der Experimente (Puffer, Mg²⁺-Konzentration, Reaktionstemperatur und Geldichte) führten zu entsprechenden Ergebnissen. Das schnelle Laufverhalten aller Reaktionsprodukte mit gegenüberliegend verkürzten Armen und das in etwa gleich langsame Laufverhalten der Reaktionsprodukte mit benachbart verkürzten Armen entspricht keiner der beiden Voraussagen für Reaktionsprodukte der Konformeren der *stacked-X* Struktur. Die Gruppierung der Produkte würde eher für eine planare Struktur sprechen. Ob diese Konformation jedoch bereits vor der Umsetzung mit Restriktionsenzymen vorlag, oder ein Effekt der verkürzten Arme ist, läßt sich so nicht ermitteln, was ein genereller Schwachpunkt dieser Methode ist.

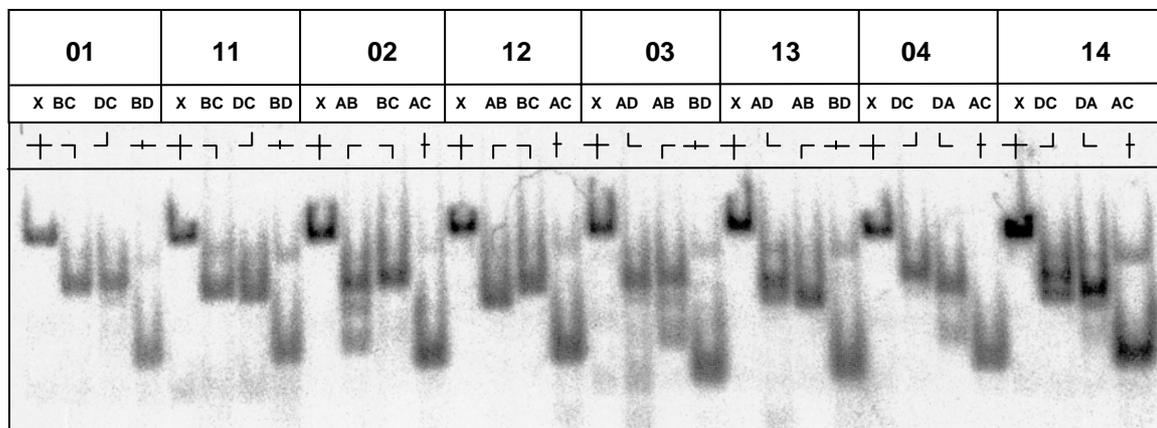


Abb. 6.2, Versuch zur Konformationsaufklärung von CFKla01 und CFKla11, jeder Reaktionsansatz beinhaltete 10 nM cruciforme DNA, die am 5'-Ende des angegebenen Einzelstrangs radioaktiv markiert war, 01-04, CFKla01, 11-14, CFKla11, A-D bezeichnen die Arme der cruciformen DNA entsprechend des Schemas in Abb. 6.1. Die Arme tragen Erkennungssequenzen für die folgenden Restriktionsenzyme (RE): A, *BamHI*; B, *PstI*; C, *EcoRI*; D, *XbaI*; Durch den Verdau mit den entsprechenden RE unter geeigneten Bedingungen, wurden Arme in den bezeichneten Kombinationen verkürzt. Die Analyse erfolgte durch native 8 %-PAA-Gelelektrophorese, mit 5 mM MgCl₂ im Gel und Laufpuffer. Die Produkte wurden durch den „Phosphor Imager“ sichtbar gemacht. X, Ansätze ohne RE.

7 Zusammenfassung

Die homologe genetische Rekombination ist ein fundamentaler Prozeß mit Bedeutung sowohl für die Erzeugung von genetischer Diversität, als auch für den Erhalt der genetischen Integrität, in der DNA-Reparatur und der DNA-Replikation. Für den Abschluß des Rekombinationsvorganges, der Auflösung der charakteristischen Holliday-Struktur, ist eine strukturspezifische Endonuklease notwendig. Diese X-Solvasen bilden eine ubiquitär verbreitete, aber phylogenetisch heterogene Gruppe von Enzymen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Identifikation, Klonierung und Reinigung von acht homologen Holliday-Struktur auflösenden Endonukleasen (Hjcs) aus Archaeen und zwei homologen Hjcs aus archaealen Viren, sowie ihre spezifischen Reaktionen mit cruciformer DNA beschrieben.

Die gereinigten Hjcs wurden in vergleichende Untersuchungen mit synthetischen cruciformen DNAs eingesetzt. Dabei zeigten alle Hjcs die erwartete, typische Auflösungsreaktion. Es konnte ein strukturabhängiger Schnittmodus abgeleitet werden, der sich zwischen den zellulären und den viralen Hjcs durch die Positionen der eingefügten symmetrischen Einzelstrangbrüche unterschied.

Die zellulären Hjcs zeigten identische Schnittmuster mit einer cruciformen DNA mit fixiertem Kreuzungspunkt, unterschieden sich aber deutlich in ihren Reaktionen mit einer cruciformen DNA, die *branch migration* über einen Bereich von zehn Basenpaaren zuließ. Wegen des festgelegten Schnittmodus der Hjcs und da keine Sequenzspezifität zu beobachten war, müssen die Unterschiede in den Reaktionen der Hjcs auf Spezifitäten für bestimmte Konformere der strukturell variablen, mobilen cruciformen DNA zurückzuführen sein. Um DNA-Interaktionsdomänen der Hjcs zu identifizieren, die für diese Spezifitäten verantwortlich sind, wurden zunächst Bereiche der Hjcs definiert, die potentiell für diese Funktion in Frage kommen. Diese drei hypothetischen DNA-Interaktionsdomänen eines Hjcs (aus *A. pernix*, Afu) wurden dann, einzeln und in Kombination, in ein anderes Hjc (aus *P. furiosus*, Pfu) mit stark abweichendem Schnittmuster übertragen. In Reaktionen mit mobiler cruciformer DNA zeigten die chimären Hjcs individuelle Schnittmuster, die sich von

den Schnittmustern aller natürlicher Hjcs unterschieden. Die angestrebte Überführung des Pfu-Hjc Schnittmusters in das von Afu-Hjc konnte nicht erreicht werden, aber der Einfluß der hypothetischen DNA-Interaktionsdomänen auf die Substratspezifität der Hjcs konnte nachgewiesen werden.

Außerdem wurden die viralen Hjcs auf ihre Spezifität für eine aus Pox-Viren bekannte Konsensus-Sequenz, die ebenfalls in beiden SIRV-Genomen nachgewiesen werden konnte, mit Implikationen für eine Rolle in der Auflösung von Replikationsintermediaten, untersucht. Diese Spezifität konnte jedoch durch *in vitro*-Tests nicht bestätigt werden.

Die archaealen Hjcs wurden in Experimenten zur Komplementation von Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 eingesetzt. Die Komplementationeffizienz der Hjcs ließ Rückschlüsse auf den Anteil der X-Solvase Aktivität an den Funktionen von Endonuklease VII für die Phagenentwicklung zu. Die Fähigkeit der Hjcs zur Komplementation von Endo VII bestätigte ihre biologische Funktion als X-Solvasen in einem *in vivo*-System.

8 Abstract

Homologous genetic recombination is a fundamental biological process with relevance in generating biological diversity and ensuring genomic integrity through involvement in processes of DNA-repair and DNA-replication. The Holliday junction, being the central intermediate in homologous recombination, is cleaved by the action of structure specific endonucleases, the X-solvases, to produce recombinant duplex-DNAs to finalize the process of recombination. The X-solvases are an ubiquitous, yet phylogenetically diverse group of enzymes.

This study describes the identification, cloning and purification of eight homologous Holliday-junction cleavage enzymes (Hjcs) from archaea and two homologous Hjcs from archaeal viruses, and their specific reactions with cruciform DNAs.

The purified Hjcs were comparatively analysed in their reactions with synthetic cruciform DNAs. Here, all Hjcs showed the predicted activity typical for X-solvases. A structure dependent cleavage mode could be deduced for all Hjcs, which differed for the cellular and the viral Hjcs in the position of the symmetrical single strand breaks, introduced for resolving the Holliday-structure.

The cellular Hjcs produced identical cleavage patterns in reactions with a cruciform DNA with a fixed junction, but showed different patterns in reactions with a cruciform DNA with a branch migratable junction. As no sequence specificity could be observed and because of the identical cleavage mode in the reactions with the fixed junction, different structure specificities of the Hjcs should be responsible for this observation. The Hjcs chose their favourite substrates from the various conformers of the structurally variable, mobile junction, according to their individual specificities. Certain regions of the Hjcs could be assigned to be potential DNA-interaction domains, being the structural basis of the observed specificities. To verify this hypothesis, chimeric Hjcs were constructed transferring the hypothetical DNA-interaction domains from one Hjc (from *A. fulgidus*, Afu) to another Hjc (from *P. furiosus*, Pfu) with a distinctively different cleavage pattern. In reactions with a mobile junction the chimeric Hjcs showed individual cleavage patterns, differing from

all patterns produced by the natural Hjcs. The intended transition of the Pfu-Hjc with Afu-Hjc domains to produce the Afu-Hjc specific cleavage pattern could not be achieved. Yet, an impact of the hypothetical DNA-interaction domains on the structure-specificity of the Hjcs could be confirmed.

The viral Hjcs were tested for their specificity for a consensus-sequence from poxviruses, which can also be found in the SIRV genomes, known to be essential for the resolution of replication intermediates. This sequence specificity could not be confirmed with *in vitro*-assays.

The archaeal Hjcs were used in assays to complement endonuclease VII of bacteriophage T4. The results suggest the impact of X-solvase activity of endonuclease VII's different functions for T4-development and provide direct evidence for the X-solvase activity of the Hjcs in an *in vivo*-system.

9 Literaturverzeichnis

Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., and Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Amundsen,S.K. and Smith,G.R. (2003). Interchangeable parts of the Escherichia coli recombination machinery. *Cell* 112, 741-744.

Aravind,L., Makarova,K.S., and Koonin,E.V. (2000). SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res.* 28, 3417-3432.

Barns,S.M., Fundyga,R.E., Jeffries,M.W., and Pace,N.R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1609-1613.

Bianco,P.R., Tracy,R.B., and Kowalczykowski,S.C. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci.* 3, D570-D603.

Birkenbihl,R.P. and Kemper,B. (1998). Endonuclease VII has two DNA-binding sites each composed from one N- and one C-terminus provided by different subunits of the protein dimer. *EMBO J* 17, 4527-4534.

Birkenbihl,R.P., Neef,K., Prangishvili,D., and Kemper,B. (2001). Holliday junction resolving enzymes of archaeal viruses SIRV1 and SIRV2. *J. Mol. Biol.* 309, 1067-1076.

Boddy,M.N., Gaillard,P.H., McDonald,W.H., Shanahan,P., Yates,J.R., III, and Russell,P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* 107, 537-548.

Bolt,E.L., Lloyd,R.G., and Sharples,G.J. (2001). Genetic analysis of an archaeal Holliday junction resolvase in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 310, 577-589.

Bond,C.S., Kvaratskhelia,M., Richard,D., White,M.F., and Hunter,W.N. (2001). Structure of Hjc, a Holliday junction resolvase, from Sulfolobus solfataricus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5509-5514.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brochier,C. and Philippe,H. (2002). Phylogeny: a non-hyperthermophilic ancestor for bacteria. *Nature* 417, 244.

Burggraf,S., Heyder,P., and Eis,N. (1997). A pivotal Archaea group. *Nature* 385, 780.

- Carlstrom,G. and Chazin,W.J. (1996).** Sequence dependence and direct measurement of crossover isomer distribution in model Holliday junctions using NMR spectroscopy. *Biochemistry* 35, 3534-3544.
- Chen,J.H., Churchill,M.E., Tullius,T.D., Kallenbach,N.R., and Seeman,N.C. (1988).** Construction and analysis of monomobile DNA junctions. *Biochem.* 27, 6032-6038.
- Ciccia,A., Constantinou,A., and West,S.C. (2003).** Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J. Biol. Chem.* 278, 25172-25178.
- Clegg,R.M., Murchie,A.I., and Lilley,D.M. (1994).** The solution structure of the four-way DNA junction at low-salt conditions: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *Biophys. J.* 66, 99-109.
- Clegg,R.M., Murchie,A.I., Zechel,A., Carlberg,C., Diekmann,S., and Lilley,D.M. (1992).** Fluorescence resonance energy transfer analysis of the structure of the four-way DNA junction. *Biochemistry* 31, 4846-4856.
- Connolly,B., Parsons,C.A., Benson,F.E., Dunderdale,H.J., Sharples,G.J., Lloyd,R.G., and 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, 6063-6067.
- Courcelle,J., Donaldson,J.R., Chow,K.H., and Courcelle,C.T. (2003).** DNA damage-induced replication fork regression and processing in Escherichia coli. *Science* 299, 1064-1067.
- Cromie,G.A. and Leach,D.R. (2000).** Control of crossing over. *Mol. Cell* 6, 815-826.
- Dacks,J.B. and Doolittle,W.F. (2001).** Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. *Cell* 107, 419-425.
- Daiyasu,H., Komori,K., Sakae,S., Ishino,Y., and Toh,H. (2000).** Hjc resolvase is a distantly related member of the type II restriction endonuclease family. *Nucl. Acids Res.* 28, 4540-4543.
- de Massy,B., Weisberg,R.A., and Studier,F.W. (1987).** Gene 3 endonuclease of bacteriophage T7 resolves conformationally branched structures in double-stranded DNA [published erratum appears in *J Mol Biol* 1987 Aug 5;196(3): following 742]. *J. Mol. Biol.* 193, 359-376.
- DeLong,E. (1998).** Archaeal means and extremes. *Science* 280, 542-543.
- DeLong,E.F. (2001).** A phylogenetic perspective on hyperthermophilic microorganisms. *Methods Enzymol.* 330, 3-11.
- Di Giulio,M. (2000).** The late stage of genetic code structuring took place at a high temperature. *Gene* 261, 189-195.

- Dickie,P., McFadden,G., and 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 , 14826-14836.
- Doolittle,W.F. (1999).** Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284, 2124-2129.
- Duckett,D., Murchie,A.I.H., Diekmann,S., v.Kitzing,E., Kemper,B., and Lilley,D.M.J. (1988).** The structure of the Holliday junction and its resolution. *Cell* 55, 79-89.
- Duckett,D.R., Murchie,A.I., and Lilley,D.M. (1990).** The role of metal ions in the conformation of the four-way DNA junction. *EMBO J.* 9, 583-590.
- Eichman,B.F., Vargason,J.M., Mooers,B.H., and 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, 3971-3976.
- Elborough,K.M. and West,S.C. (1990).** Resolution of synthetic Holliday junctions in DNA by an endonuclease activity from calf thymus. *EMBO J.* 9, 2931-2936.
- Forterre,P., Benachenhou-Lahfa,N., Confalonieri,F., Duguet,M., Elie,C., and Labedan,B. (1992).** The nature of the last universal ancestor and the root of the tree of life, still open questions. *Biosystems* 28, 15-32.
- Frankel,F.R., Batcheler,M.L., and Clark,C.F. (1971).** The role of the gene 49 in DNA replication and head morphogenesis in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62, 439-463.
- Garcia-Vallve,S., Romeu,A., and Palau,J. (2000).** Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res.* 10, 1719-1725.
- Garcia,A.D., Aravind,L., Koonin,E.V., and Moss,B. (2000).** Bacterial-type DNA Holliday junction resolvases in eukaryotic viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8926-8931.
- Garcia,A.D. and Moss,B. (2001).** Repression of vaccinia virus Holliday junction resolvase inhibits processing of viral DNA into unit-length genomes. *J. Virol.* 75, 6460-6471.
- Gellert,M., O'Dea,M.H., and Mizuuchi,K. (1983).** Slow cruciform transitions in palindromic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 5545-5549.
- Golz,S. and Kemper,B. (1999).** Association of Holliday-structure Resolving Endonuclease VII with gp20 from the Packaging Machine of Phage T4. *J Mol Biol* 285, 1131-1144.
- Grabowski,B. and Kelman,Z. (2003).** ARCHAEOAL DNA REPLICATION: Eukaryal Proteins in a Bacterial Context. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 487-516.
- Graham,D.E., Overbeek,R., Olsen,G.J., and Woese,C.R. (2000).** An archaeal genomic signature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3304-3308.

- Grainger,R.J., Murchie,A.I., and Lilley,D.M. (1998).** Exchange between stacking conformers in a four-Way DNA junction. *Biochemistry* 37, 23-32.
- Greger,B. and Kemper,B. (1998).** An apyrimidinic site kinks DNA and triggers incision by endonuclease VII of phage T4. *Nucl. Acids Res.* 26, 4432-4438.
- Hartman,H. and Fedorov,A. (2002).** The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1420-1425.
- Hays,F.A., Watson,J., and Ho,P.S. (2003).** CAUTION! DNA crossing: The crystal structures of Holliday Junctions. *J. Biol. Chem.*
- Heyer,W.D., Ehmsen,K.T., and Solinger,J.A. (2003).** Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends Biochem. Sci.* 28, 548-557.
- Holliday,R. (1964).** A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetic Research* 5, 282-304.
- Horiike,T., Hamada,K., Kanaya,S., and Shinozawa,T. (2001).** Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nat. Cell Biol.* 3, 210-214.
- Huber,H., Hohn,M.J., Rachel,R., Fuchs,T., Wimmer,V.C., and Stetter,K.O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63-67.
- Jensch,F., Kosak,H., Seeman,N.C., and Kemper,B. (1989).** Cruciform cutting endonucleases from *Saccharomyces cerevisiae* and phage T4 show conserved reactions with branched DNAs. *EMBO J.* 8, 4325-4334.
- Keeling,P.J. and Doolittle,W.F. (1995).** Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5761-5764.
- Kemper,B. (1997).** Branched DNA resolving enzymes (X-solvases). In *DNA Damage and Repair. Biochemistry, Genetics and Cell Biology*, J.A.Nickoloff and M.Hoekstra, eds. (Totowa: Humana Press), pp. 179-204.
- Kemper,B. and Janz,E. (1976).** Function of gene 49 of bacteriophage T4. I. Isolation and biochemical characterization of very fast-sedimenting DNA. *J. Virol.* 18, 992-999.
- Kimball,A., Guo,Q., Lu,M., Cunningham,R.P., Kallenbach,N.R., Seeman,N.C., and Tullius,T.D. (1990).** Construction and analysis of parallel and antiparallel Holliday junctions [published erratum appears in *J Biol Chem* 1990 Sep 5; 265(25):15348]. *J. Biol. Chem.* 265, 6544-6547.
- Kleff,S., Kemper,B., and Sternglanz,R. (1992).** Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J.* 11, 699-704.
- Komori,K., Sakae,S., Daiyasu,H., Toh,H., Morikawa,K., Shinagawa,H., and Ishino,Y. (2000).** Mutational analysis of the *pyrococcus furiosus* holliday junction

resolvase hjc revealed functionally important residues for dimer formation, junction DNA binding, and cleavage activities [In Process Citation]. *J. Biol. Chem.* 275, 40385-40391.

Komori,K., Sakae,S., Shinagawa,H., Morikawa,K., and 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, 8873-8878.

Koonin,E.V., Makarova,K.S., and Aravind,L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 709-742.

Kostrewa,D. and Winkler,F.K. (1995). Mg²⁺ binding to the active site of EcoRV endonuclease: a crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2 Å resolution. *Biochemistry* 34, 683-696.

Kupfer, C. (1993). Reinigung und Charakterisierung des gpCCE1 aus ueberexpemierenden *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität zu Köln

Kvaratskhelia,M., Wardleworth,B.N., Norman,D.G., and White,M.F. (2000). A conserved nuclease domain in the archaeal Holliday junction resolving enzyme Hjc. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25540-25546.

Kvaratskhelia,M., Wardleworth,B.N., and White,M.F. (2001). Multiple Holliday junction resolving enzyme activities in the Crenarchaeota and Euryarchaeota. *FEBS Lett.* 491, 243-246.

Kvaratskhelia,M. and White,M.F. (2000). An archaeal Holliday junction resolving enzyme from *Sulfolobus solfataricus* exhibits unique properties. *J. Mol. Biol.* 295, 193-202.

Kvaratskhelia,M. and White,M.F. (2000c). Two Holliday junction resolving enzymes in *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* 297, 923-932.

Lilley,D.M. (2000). Structures of helical junctions in nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* 33, 109-159.

Lilley,D.M. and White,M.F. (2000). Resolving the relationships of resolving enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9351-9353.

Lilley,D.M. and White,M.F. (2001). The junction-resolving enzymes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 433-443.

Makarova,K.S. and Koonin,E.V. (2003). Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Genome Biol.* 4, 115.

Martin,W. and Muller,M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392, 37-41.

Mayr,E. (1998). Two empires or three? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9720-9723.

- McGlynn,P. and Lloyd,R.G. (2001).** Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8227-8234.
- McKinney,S.A., Declais,A.C., Lilley,D.M., and Ha,T. (2003).** Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nat. Struct. Biol.* 10, 93-97.
- Merchlinsky,M. (1990).** Mutational analysis of the resolution sequence of vaccinia virus DNA: essential sequence consists of two separate AT-rich regions highly conserved among poxviruses. *J. Virol.* 64, 5029-5035.
- Meselson,M.S. and Radding,C.M. (1975).** A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 358-361.
- Miick,S.M., Fee,R.S., Millar,D.P., and Chazin,W.J. (1997).** Crossover isomer bias is the primary sequence-dependent property of immobilized Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9080-9084.
- Mizuuchi,K., Kemper,B., Hays,J., and Weisberg,R.A. (1982).** T4 endonuclease VII cleaves Holliday structures. *Cell* 29, 357-365.
- Mosig,G. (1998).** Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genet.* 32, 379-413.
- Murchie,A.I., Clegg,R.M., von,K.E., Duckett,D.R., Diekmann,S., and Lilley,D.M. (1989).** Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules. *Nature* 341, 763-766.
- Nakagawa,T. and Kolodner,R.D. (2002).** The MER3 DNA helicase catalyzes the unwinding of holliday junctions. *J. Biol. Chem.* 277, 28019-28024.
- Needleman,S.B. and Wunsch,C.D. (1970).** A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- Neef, K. (1999).** Nachweis einer X-Solvase-Aktivität aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus islandicus*. Diplomarbeit, Universität zu Köln .
- Nishino,T., Komori,K., Tsuchiya,D., Ishino,Y., and Morikawa,K. (2001).** Crystal structure of the archaeal holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition. *Structure. (Camb.)* 9, 197-204.
- Nuttall,S.D. and Dyall-Smith,M.L. (1993).** HF1 and HF2: novel bacteriophages of halophilic archaea. *Virology* 197, 678-684.
- Orr-Weaver,T.L. and Szostak,J.W. (1985).** Fungal recombination. *Microbiol. Rev.* 49, 33-58.
- Ortiz-Lombardia,M., Gonzalez,A., Eritja,R., Aymami,J., Azorin,F., and Coll,M. (1999).** Crystal structure of a DNA Holliday junction. *Nat. Struct. Biol.* 6, 913-917.

- Overmars,F.J. and Altona,C. (1997).** NMR study of the exchange rate between two stacked conformers of a model Holliday junction. *J. Mol. Biol.* 273, 519-524.
- Panyutin,I.G., Biswas,I., and Hsieh,P. (1995).** A pivotal role for the structure of the Holliday junction in DNA branch migration. *EMBO J.* 14, 1819-1826.
- Paques,F. and Haber,J.E. (1999).** Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 349-404.
- Pastink,A., Eeken,J.C., and Lohman,P.H. (2001).** Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat. Res.* 480-481, 37-50.
- Peng,X., Blum,H., She,Q., Mallok,S., Brugger,K., Garrett,R.A., Zillig,W., and Prangishvili,D. (2001).** Sequences and replication of genomes of the archaeal ruidiviruses SIRV1 and SIRV2: relationships to the archaeal lipothrixvirus SIFV and some eukaryal viruses. *Virology* 291, 226-234.
- Pottmeyer,S. and 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, 607-615.
- Prangishvili,D. (2003).** Evolutionary insights from studies on viruses of hyperthermophilic archaea. *Res. Microbiol.* 154, 289-294.
- Prangishvili,D., Arnold,H.P., Gotz,D., Ziese,U., Holz,I., Kristjansson,J.K., and Zillig,W. (1999).** A novel virus family, the Ruidiviridae: Structure, virus-host interactions and genome variability of the *Sulfolobus* viruses SIRV1 and SIRV2. *Jpn. J Genet.* 152, 1387-1396.
- Saitou,N. and Nei,M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Seigneur,M., Bidnenko,V., Ehrlich,S.D., and Michel,B. (1998).** RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95, 419-430.
- Seitz,E.M., Haseltine,C.A., and Kowalczykowski,S.C. (2001).** DNA recombination and repair in the archaea. *Adv. Appl. Microbiol.* 50, 101-169.
- Sekiguchi,J., Seeman,N.C., and Shuman,S. (1996).** Resolution of Holliday junctions by eukaryotic DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 785-789.
- Shah,R., Bennett,R.J., and West,S.C. (1994).** Genetic recombination in *E. coli*: RuvC protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots in vitro. *Cell* 79, 853-864.
- Sharples,G.J. (2001).** The X philes: structure-specific endonucleases that resolve Holliday junctions. *Mol. Microbiol.* 39, 823-834.
- Sharples,G.J., Chan,S.N., Mahdi,A.A., Whitby,M.C., and Lloyd,R.G. (1994).** Processing of intermediates in recombination and DNA repair: identification of a

new endonuclease that specifically cleaves Holliday junctions. *EMBO J.* 13, 6133-6142.

Shida,T., Iwasaki,H., Saito,A., Kyogoku,Y., and Shinagawa,H. (1996). Analysis of substrate specificity of the RuvC holliday junction resolvase with synthetic Holliday junctions. *J. Biol. Chem.* 271, 26105-26109.

Solaro,P., Greger,B., and Kemper,B. (1995). Detection and partial purification of a cruciform-resolving activity (X-solvase) from nuclear extracts of mouse B-cells. *Eur. J. Biochem.* 230, 926-933.

Solaro,P.C., Birkenkamp,K., Pfeiffer,P., and Kemper,B. (1993). Endonuclease VII of phage T4 triggers mismatch correction in vitro. *J. Mol. Biol.* 230, 868-877.

Stanier,R.Y. and Van Niel,C.B. (1962). The concept of a bacterium. *Arch. Mikrobiol.* 42, 17-35.

Studier,F.W. and Moffatt,B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

Studier,F.W., Rosenberg,A.H., Dunn,J.J., and Dubendorff,J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.

Szostak,J.W., Orr-Weaver,T.L., Rothstein,R.J., and Stahl,F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.

Traktman, P. (1996) DNA Replication in Eukaryotic Cells. Poxvirus DNA Replication. Cold Spring Harbour Laboratory Press , 775-798.

Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

von Kitzing,E., Lilley,D.M., and Diekmann,S. (1990). The stereochemistry of a four-way DNA junction: a theoretical study. *Nucleic Acids Res.* 18, 2671-2683.

Waldman,A.S. and Liskay,R.M. (1988). Resolution of synthetic Holliday structures by an extract of human cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 10249-10266.

Whitby,M.C. and Dixon,J. (1997). A new Holliday junction resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe* that is homologous to CCE1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 272, 509-522.

White,M.F. and Lilley,D.M.J. (1996). The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 257, 330-341.

Woese,C.R. (1998). Default taxonomy: Ernst Mayr's view of the microbial world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11043-11046.

Woese,C.R. and Fox,G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5088-5090.

Woese,C.R., Kandler,O., and Wheelis,M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4576-4579.

Wolner,B., van Komen,S., Sung,P., and Peterson,C.L. (2003). Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol. Cell* 12, 221-232.

Zillig,W., Arnold,H.P., Holz,I., Prangishvili,D., Schweier,A., Stedman,K., She,Q., Phan,H., Garrett,R., and Kristjansson,J.K. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles*. 2, 131-140.

Zillig,W., Prangishvili,D., Schleper,C., Elferink,M., Holz,I., Albers,S., Janekovic,D., and Gotz,D. (1996). Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 225-236.

Zuckerlandl,E. and Pauling,L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8, 357-366.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. B. Kemper betreut worden.

Köln, Februar 2004

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als:

Birkenbihl, R. P., Neef, K., Prangishvili, D., and Kemper, B. (2001).
Holliday junction resolving enzymes of archaeal viruses SIRV1 and SIRV2.
J. Mol. Biol. 309, 1067-1076.

Neef, K., Birkenbihl, R.P., Kemper, B. (2002).
Holliday junction-resolving enzymes from eight hyperthermophilic archaea differ in reactions with cruciform DNA.
Extremophiles.; 6 (5) 359-367.; Epub 2002 Apr 18

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Böttger Kemper für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während dieser Promotion.

Bei Frau Prof. Dr. Karin Schnetz möchte ich mich für die Übernahme des Co-Referats bedanken.

Herrn Dr. David Prangishvili danke ich für die Präparation von SIRV, seine Ratschläge und Hilfe bei allen Fragen archaer Viren und seine allgemeine freundliche Unterstützung.

Für die Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei Dr. Rainer Birkenbihl, Uli Rass und Vera Illner-Bräutigam.

LEBENS LAUF

- Eltern: Dr. Hanns-Joachim Neef, Physiker
Marlies Neef, geb. In der Smitten, Lehrerin
- 16.02. 1972 in Jülich geboren
1973 Umzug nach Osmington / Dorset, England
1975 Umzug nach Merzenich, Kreis Düren
1978 Einschulung Kath. Grundschule Merzenich
1980 Umzug nach Washington, D.C., USA
Besuch der Deutschen Schule Washington, D.C.
1981 Rückkehr nach Merzenich
1982 Städtisches Gymnasium am Wirteltor, Düren
1988 Eintritt in die Sekundarstufe II mit den Leistungskursen
Mathematik und Biologie
1991 Schulabschluß mit Abitur, Durchschnittsnote 2,1
Umzug nach Aachen
Beginn Maschinenbaustudium an der RWTH Aachen
1993 Umzug nach Köln
Wechsel des Studienfachs:
Biologie an der Universität zu Köln
1995 Vordiplom in Biologie, Gesamtnote „sehr gut“
1998 Beginn der Diplomarbeit am Institut für Genetik in der AG
Kemper
1999 Diplom in Biologie, Gesamtnote „sehr gut“
Beginn der Arbeiten zur Promotion in der AG Kemper