

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchung der Schadenserkennung in der Nukleotidexzisionsreparatur

Sandra Céline Heidi Guislain Koch

aus

Starnberg

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 27.05.2014

Sandra Céline Heidi Guislain Koch

Dissertation eingereicht am: 27.05.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachterin: Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am: 1.08.2014

Liste der Publikationen

S. C. Koch*, J. Kuper*, K. L. Gasteiger*, R. Strasser, S. Geiger, D. Eisen, S. Schneider, C. Kisker, T. Carell, Manuskript in Bearbeitung. The Rad14/XPA nucleotide excision repair protein probes DNA deformability for lesion recognition.

*: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

D. Stathis, U. Lischke, S. C. Koch, C. A. Deiml, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4925-30. Discovery and Mutagenicity of a Guanidinoformimine Lesion as a new Intermediate of the Oxidative Deoxyguanosine Degradation Pathway.

M. Münzel, U. Lischke, D. Stathis, T. Pfaffeneder, F. A. Gnerlich, C. A. Deiml, S. C. Koch, K. Karaghiosoff, T. Carell, *Chemistry*. **2011**, *17*, 13782-13788. Improved Synthesis and Mutagenicity of Oligonucleotides Containing 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine.

Konferenzbeiträge

FASEB Konferenz, Snowmass, USA, **2014**. *Rad14 as Initial Damage Sensor in NER*. (Poster)

CIPSM-Fest of Synthetic Chemistry, München, **2013**.

Interact, München, **2013**.

SFB646 Begutachtung, München, **2012**. *Investigation of DNA Damage Recognition by XPA in NER*. (Poster)

FASEB Konferenz, Snowmass, USA, **2012**. *Determination of Role and Function of XPA in NER*. (Poster)

LSM Retreat, Spitzingsee, **2012**. *The Role of XPA in Nucleotide Excision Repair*. (Vortrag)

Interact, München, **2012**. *The Role of XPA in Nucleotide Excision Repair*. (Poster)

CeNS Konferenz, Venedig, **2011**. *Damage recognition by XPA in NER*. (Poster)

CIPSM-Fest of Chemical Biology, München, **2011**.

LSM Retreat, Wildbad Kreuth, **2010**. *XPA as Initial Damage Sensor in NER*. (Poster)

Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor
dem Staunen.

Albert Einstein (1879 – 1955)

Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. Thomas Carell* für die interessante Themenstellung, die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen. Seine Begeisterung für das Themengebiet und seine konstruktiven Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit geführt.

Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Ein ganz besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von *Frau Prof. Caroline Kisker* an der Universität Würzburg. Durch die Zusammenarbeit habe ich sehr viel gelernt und es führte zum erfolgreichen Lösen einer Proteinstruktur. Bei *Dr. Jochen Kuper, Wolfgang Kölmel* und *Gudrun Michels* möchte ich mich für die zahlreichen, guten Ratschläge bedanken sowie für die Einführung in die Arbeitsmethoden. Ich danke auch der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme.

Dr. Sabine Schneider danke ich besonders für die gute Zusammenarbeit in der Proteinkristallisation. Sie hatte immer gute Ideen, um die Forschung weiterzubringen und unterstützte mich stets mit motivierenden Ratschlägen trotz nächtelanger, erfolgloser Messungen am Synchrotron.

Bei *Karola Gasteiger, Dr. Ulrike Lischke, Dr. Viviana Fluxa, Simon Geiger* und *Mischa Ehrlich* bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Oligonukleotide.

Den Mitarbeiterinnen *Kerstin Kurz, Sabine Voß* und *Slava Gärtner* danke ich für die verlässliche Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Fragen und Problemstellungen.

Bei meinen Praktikanten *Kerstin Lippl* und *Fionán Ó Dúill* bedanke ich mich recht herzlich, sie haben großes Interesse gezeigt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Es war angenehm mit ihnen zu arbeiten.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei *Dr. Peter Thumbs, Dr. Ralf Strasser, Dr. David Eisen, Michael Gattner, Dorothea Matschkal, Andrea Kneuttinger, Dr. Jochen Kuper, Dr. Sabine Schneider* und *Dr. Markus Müller* bedanken.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die angenehme und heitere Arbeitsatmosphäre, die immer vorhandene Hilfsbereitschaft, sowie die unvergesslichen Ausflüge und Feiern.

Der Graduiertenschule „*Life Science Munich*“ danke ich für die finanzielle Unterstützung zur Teilnahme an Konferenzen sowie die Möglichkeit an zahlreichen Workshops, *Retreats* und interessanten Vorlesungen teilnehmen zu können. Es war spannend mit Studenten aus der ganzen Welt „*life science*“ zu betreiben. *Cornelia Kellermann* danke ich für die gute Organisation.

Dorothea Matschkal, Ines Thoma, Dr. Veronika Reiter, Dr. María Tomas Gamasa, Dr. Emine Kaya und *Sabine Voß* waren stets eine große Unterstützung während der gesamten Zeit der Doktorarbeit. Danke für die lustigen und unvergesslichen Abende, sowie für die zahlreichen, notwendigen „*subgroup meetings*“.

Den Freunden aus meinem Semester *Christina Kunzmann* und *Thomas Hoffmann* möchte ich für die vielen Gespräche und die Unterstützung danken. Die wöchentlichen Semesteressen, sowie die vielen lustigen Abende und Ausflüge mit *Dr. Melari Davies, Ines Thoma, Dorothea Matschkal, Michael Gattner, Dr. Alexander Hofer, Christian Argyo* und *Stephan Hug* werden unvergessen bleiben und haben mir immer Kraft und Energie gegeben.

Mein größter Dank gilt meiner ganzen Familie, meinem Freund *Roberto Turina* sowie meiner „dritten Oma“ *Gerda Schültke*, die mich stets moralisch unterstützen und mir Kraft gegeben haben die Arbeit zu bewerkstelligen. Ich danke für das Verständnis, die zahlreichen Gespräche und die Aufmunterungen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	DNA-Schäden	5
3.2	Reparatur der DNA	6
3.2.1	Schadensvermeidung und -toleranz	6
3.2.2	Reparaturmechanismen	7
3.3	Die Nukleotidexzisionsreparatur	11
3.3.1	Krankheiten hervorgerufen durch defekte NER	11
3.3.2	Substrate der NER	12
3.3.3	NER Mechanismus	19
3.3.4	Die Schadenserkennung in der NER	22
3.4	Das XPA Protein	28
3.4.1	Allgemeines	28
3.4.2	Rad14, das Hefehomolog von XPA	31
4	Aufgabenstellung	32
5	Material und Methoden	33
5.1	Material	33
5.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	33
5.1.2	Oligonukleotide	33
5.1.3	Bakterien	35
5.1.4	Enzyme	37
5.1.5	Vektoren	37
5.1.6	Medien und Puffer	38
5.1.7	Protein- und DNA-Standards	44
5.1.8	DNA-Isolations- und Präparationskits	45
5.1.9	Geräte	46
5.2	Methoden	47
5.2.1	Mikrobiologische Methoden	47
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	50
5.2.3	Proteinchemische Methoden	60

5.2.4 Biochemische Methoden	67
5.2.5 Proteinkristallisation.....	75
6 Ergebnisse und Diskussion	79
6.1 Das humane XPA Protein	79
6.1.1 Allgemeines.....	79
6.1.2 Klonierung und heterologe Expression von XPA	79
6.1.3 Aufreinigung von XPA	81
6.1.4 <i>Electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSA).....	83
6.1.5 Kristallisation von XPAs.....	86
6.2 Das Hefeprotein Rad14	88
6.2.1 Allgemeines.....	88
6.2.2 Klonierung und heterologe Expression von Rad14.....	89
6.2.3 Aufreinigung von Rad14.....	90
6.2.4 <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	93
6.2.5 Western Blot: Bestätigung des (Rad14) ₂ -DNA-Komplexes	96
6.2.6 Kristallisation von Rad14.....	98
6.2.7 Strukturanalyse.....	109
6.2.8 DNA Biegung und das Schadenserkenngsmotiv	113
6.2.9 In vitro Versuche zur Verifizierung der Strukturanalyse	120
6.2.10 Mechanismus der Schadenserkenng in der NER	125
6.2.11 Ausblick	130
7 Anhang.....	131
7.1 Gensequenzen von XPA	131
7.2 Gensequenzen von Rad14.....	132
7.3 Zusammensetzung des <i>LeMaster Mediums</i> ¹⁰⁵	133
7.4 Daten der Kristallstrukturen	135
7.5 Abkürzungsverzeichnis	136
8 Literaturverzeichnis.....	140

1 Zusammenfassung

Zur Aufrechterhaltung der Integrität der Desoxyribonukleinsäure (DNA) haben sich in der Natur verschiedene Reparatursysteme und Toleranzmechanismen etabliert. Einer dieser Reparaturmechanismen, die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), zeichnet sich durch ihre breite Substratspezifität aus. Kommt es durch genetische Defekte zu einer Fehlfunktion dieser Reparatur, führt das zur Entstehung von Krankheiten (z. B. *Xeroderma Pigmentosum*). Menschliche Zellen können zur Reparatur von UV-Schäden nur auf die NER zurückgreifen, da sie keine Photolyase besitzen. Obwohl der komplexe Mechanismus der Schadensreparatur gut erforscht ist, ist der Mechanismus der Schadenserkenkung bisher wenig erforscht. Wie kommt es bei der Vielfalt an vorhandener DNA in dem Nukleus zur Diskriminierung zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA? Zwei verschiedene Proteine, XPC/Rad4 und XPA/Rad14, sind für die anfängliche Schadenserkenkung verantwortlich und rekrutieren daraufhin weitere NER Proteine. Das Rad14/XPA Protein spielt sowohl in der globalen Genomreparatur (GGR) als auch in der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) eine wichtige Rolle. Seine genaue Handlung in der Schadenserkenkung ist jedoch in beiden Fällen unbekannt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Substratspezifität der Bindung von XPA und dessen Hefehomolog Rad14 aus *S. cerevisiae* an geschädigte DNA untersucht. Durch EMSA-Bindungsstudien wurde bewiesen, dass XPA/Rad14 unabhängig von XPC/Rad4 eine besondere Affinität zu DNA-Adduktschäden, wie z. B. zu dem Acetylaminofluoren (AAF) und dem Fluorescein, aufweist. Weiterhin stellen Cisplatin-Addukte gute Substrate dar. Im Gegensatz dazu werden UV-Schäden, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und (6-4) Photoschäden ((6-4)PP), durch das Protein nicht gebunden. Um einen genaueren Einblick auf atomare Ebene der Schadenserkenkung zu erhalten, wurde die DNA-bindende Domäne von Rad14 mit AAF-dG und 1,2-GG Cisplatin geschädigten dsDNA Oligonukleotiden kristallisiert. Die Kristallstrukturen des Proteins im Komplex mit AAF-dG bzw. 1,2-GG Cisplatin geschädigter DNA konnten mit einer Auflösung von jeweils 1.8 Å bzw. 2.8 Å erhalten werden. Das DNA-bindende Fragment von Rad14 zeigt eine α/β -Architektur aus sieben α -Helices und drei β -Faltblättern. Die räumliche

Struktur von Rad14 weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne des humanen XPA (NMR Struktur) auf. Die Strukturanalyse der Co-Kristalle zeigt, dass zwei Proteine an einen geschädigten Strang binden, wobei es zu einer Biegung der DNA von 70° an der Schadensstelle kommt. Die DNA wird von dem Protein durch die Reste His258, Phe262, Arg294 und Thr239 gebunden, dadurch entsteht eine 13mer lange Schadenserkennungssequenz in der DNA. Die 2:1 Stöchiometrie wurde durch EMSA-Studien sowie einem *Crosslinker*-Versuch bestätigt. Zur Untersuchung der DNA-Interkalation durch Phe262 wurden Mutationsstudien mit anschließender Fluoreszenzpolarisation durchgeführt. Durch die Substitution von Phe262 durch Alanin, wurde die Protein-DNA Wechselwirkung unterbunden.

Die Kristallstrukturen zeigen, dass Rad14 DNA-Schäden über einen indirekten Mechanismus erkennt. Es detektiert die Verformbarkeit und Flexibilität der DNA und erkennt somit eine gewisse Gruppe an Schäden, welche einen DNA Knick stabilisieren können. Das Protein könnte demnach eine zentralere Rolle in der Schadenserkennung der NER spielen als bislang gedacht.

2 Summary

To maintain the integrity of the deoxyribonucleic acid (DNA) nature has developed different repair systems and tolerance mechanisms. One of these repair systems, the nucleotide excision repair (NER), is characterized by its broad substrate specificity. Dysfunctions of this DNA repair system, caused by genetic defects, lead to diseases (e. g. *Xeroderma Pigmentosum*). Because human cells lack the photolyase, UV lesions can only be repaired by NER. Although the complex mechanism of damage repair is well investigated, the damage recognition process still remains to be a poorly understood process. How does discrimination between undamaged and damaged DNA take place in the large amount of DNA present in the nucleus? Two different proteins, XPC/Rad4 and XPA/Rad14, are responsible for initial damage recognition and subsequent recruitment of other NER proteins. The XPA/Rad14 protein acts as a key factor in the global genome repair (GGR) as well as in transcription coupled repair (TCR). Its exact way of action in the damage recognition however remains elusive in both cases. For that purpose the substrate specificity as well as the binding mechanism of XPA and its homolog Rad14 from *S. cerevisiae* to damaged DNA were investigated in the present work. Binding experiments (EMSA) show that, independently from XPC/Rad4, XPA/Rad14 has a strong affinity towards bulky adduct lesions such as acetylaminofluorene (AAF) and fluorescein. Furthermore, cisplatin damaged DNA represents a good substrate. In contrast, different UV-lesions, such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) or pyrimidine-pyrimidone (6-4) lesions ((6-4)PP), are not bound by the protein. To obtain insight into the damage recognition process at the atomic level the DNA-binding fragment of Rad14 was crystallized in complex with AAF-dG and 1,2-GG cisplatin damaged dsDNA oligonucleotides. Crystal structures of the protein in complex with AAF-dG and 1,2-GG cisplatin damaged DNA were obtained with a resolution of 1.8 Å and 2.8 Å respectively. The DNA-binding fragment of Rad14 shows an overall α/β -folding topology consisting of seven α -helices and three β -sheets. Rad14 assumes a similar three dimensional structure compared to the DNA-binding domain of XPA (NMR structure). The structural analysis of the co-crystals shows that two proteins bind to the damaged DNA strand leading to a kink of

70° at the DNA damage site. The proteins bind the DNA with the residues His258, Phe262, Arg294 and Thr239, so that a 13mer recognition sequence in the DNA is established. The 2:1 binding stoichiometry was confirmed by EMSA studies and by a crosslinking experiment. To investigate the intercalation by Phe262 mutational studies and fluorescence polarization was performed. Through the substitution of Phe262 by alanine, the DNA binding capabilities of Rad14 were abolished.

The crystal structures show, that Rad14 binds DNA damages by an indirect mechanism. It detects the deformability and flexibility of the DNA double strand and is able to recognize a certain group of lesions, which stabilize a kinked DNA structure. The protein may play a more important role in the damage recognition process of NER as initially thought.

3 Einleitung

3.1 DNA-Schäden

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) dient in allen Lebewesen als Träger der Erbinformation, so dass ihre Integrität für das Überleben aller Spezies notwendig ist. Sie kann jedoch durch äußere oder innere Einflüsse geschädigt werden. In einer menschlichen Zelle kommt es zu mehr als 50.000 Schäden pro Tag.¹ Solche Schäden können spontan im Verlauf der DNA-Replikation oder durch die Einwirkung mutagener Substanzen, extremer Wärme oder ionisierende Strahlung verursacht werden. Dazu zählen auch interkalierende (z. B. Ethidiumbromid) und kovalent modifizierende Reagenzien oder Agenzien, die zu einem intra oder intermolekularen *Crosslink* führen.² In Abbildung 3.1 sind die Ursachen und Folgen solcher DNA-Schäden sowie deren Reparaturmechanismen in Eukaryoten dargestellt.

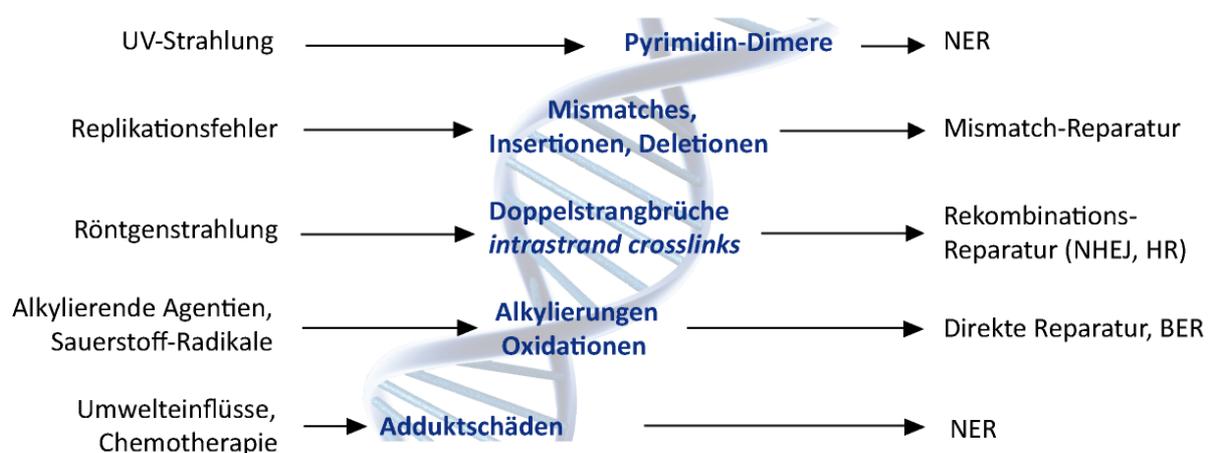


Abbildung 3.1: Darstellung der verschiedenen schädlichen Einflüsse auf die DNA, die dadurch entstehenden DNA-Schäden und die zelleigenen Reparatursysteme in Eukaryoten. BER: Basenexzisionsreparatur, NER: Nukleotidexzisionsreparatur, NHEJ: *Non homologous end joining*, HR: Homologe Rekombination.

Bei der Änderung eines einzelnen Nukleotids in der DNA spricht man von einer Punktmutation. *Frameshift*-Mutationen entstehen durch die Entfernung einer Base (*Deletion*)

oder durch den Einbau einer zusätzlichen Base (*Insertion*) während der Replikation. Weiterhin können chemische Substanzen (z. B. Bleomycin) die Phosphodiesterbindung aufbrechen. Treten DNA-Schäden in einem kodierenden Bereich der DNA auf, so verhindern sie eine korrekte Transkription. Mutationen können einerseits zum programmierten Zelltod (Apoptose) oder zur Entstehung von Tumoren führen.

3.2 Reparatur der DNA

3.2.1 Schadensvermeidung und -toleranz

Für die Aufrechterhaltung der chemischen Integrität der DNA, hat sich die Natur ein hoch komplexes und äußerst flexibles DNA-Reparatur-System zugelegt. Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Reparaturmechanismen als Antwort auf DNA-Schäden.

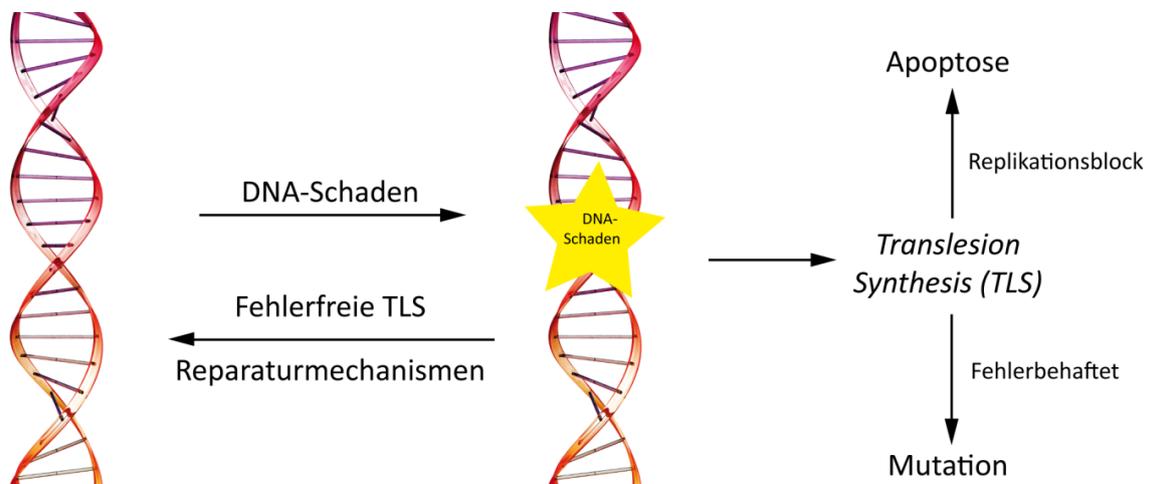


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der biologischen Antwort auf DNA-Schäden.

Bereits bei der Replikation stehen Mechanismen zur Verfügung, die den Einbau falscher Nukleotide verhindern. Dieses Korrekturlesen (*proofreading*) wird von *high fidelity* DNA-Polymerasen durchgeführt. Sie sind in der Lage den Einbau eines unpassenden, fehlgepaarten Nukleotids zu erkennen und dieses anschließend wieder aus der DNA zu entfernen. Die

involvierten DNA-Polymerase III (Prokaryoten) und die DNA-Polymerasen δ/ϵ (Eukaryoten) besitzen eine einzigartige 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Bei falschem Einbau einer Base während der DNA-Synthese, hält die DNA-Polymerase an, verlagert das 3'-Ende der wachsenden DNA-Kette mit der fehlgepaarten Base zum Exonukleasebereich und schneidet diese heraus. Dann wird das 3'-Ende erneut auf die Replikationsregion übertragen und der entsprechende Bereich erneut kopiert.³

Schlägt die Korrektur fehl oder wird die *high fidelity* Polymerase durch einen Schaden blockiert, was einen Replikationsblock herbeiführt, gibt es den Mechanismus der Schadenstoleranz. Um den Replikationsblock zu umgehen, greifen spezialisierte DNA-Polymerasen ein, die *translesion synthesis* (TLS) oder auch *low fidelity* Polymerasen, welche an die Schadensstelle rekrutiert werden. TLS-Polymerasen sind in der Lage über sperrige DNA-Schäden zu replizieren und anschließend können *high fidelity* Polymerasen die Replikation fortführen. Die TLS-Polymerasen besitzen eine breitere aktive Tasche, so dass sie große Addukte binden können, jedoch verfügen sie nicht über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Geringere Genauigkeit und höhere Mutagenität resultieren daraus.⁴ Eukaryotische TLS DNA-Polymerasen gehören zur Y-Familie (Pol η , Pol κ , Pol ι) und zur B-Familie (Pol ζ , Rev1). Sie erlauben die Replikation über DNA-Schäden hinweg.⁵

3.2.2 Reparaturmechanismen

Um dem großen Spektrum an vorkommenden DNA-Schäden entgegenzuwirken, gibt es unterschiedliche Reparaturmechanismen, die es ermöglichen DNA-Schäden zu beheben. Diese DNA-Reparaturmechanismen lassen sich grob in fünf große Gruppen einteilen: Die DNA-Rekombination, die Direkte Reparatur, die Basenexzisionsreparatur (BER), die *Mismatch*-Reparatur und die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). In folgenden Kapiteln wird auf diese Reparaturmechanismen näher eingegangen.

3.2.2.1 DNA-Rekombination

Durch DNA-Rekombinationen können DNA-Doppelstrangbrüche und DNA *Crosslinks* repariert werden. DNA-Doppelstrangbrüche werden meistens durch Chemotherapeutika, endogene Agenzien oder auch durch ionisierende Strahlung hervorgerufen⁶ und führen zu chromosomale Aberrationen oder Apoptose. In eukaryotischen Zellen kann bereits ein einziger, nicht reparierter Doppelstrangbruch eines entscheidenden Gens den Zelltod durch Apoptose induzieren oder bei Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus zur fehlerhaften Bildung der Tochterchromatiden führen. Zwei Reparaturmechanismen, die homologe Rekombination (HR) und das *Non Homologous End Joining* (NHEJ) sind für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen verantwortlich. Bei dem NHEJ werden zwei Enden eines Doppelstrangbruchs ligiert, ohne dass eine Sequenzhomologie bestehen muss. Die HR nimmt in höheren Eukaryoten eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen während der Meiose ein. Das geschädigte Chromosom tritt hierbei mit der sequenzhomologen ungeschädigten DNA in Kontakt, die als Matrize für die Reparatur dient.⁷

3.2.2.2 Direkte Reparatur

Durch UV-Strahlung induzierte DNA-Schäden, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und (6-4) Photoprodukte ((6-4)PP), können in einem *direct repair*-Mechanismus durch Photolyasen (6-4 Photolyase und CPD-Photolyase) behoben werden.⁸ Bei der direkten Reparatur wird der jeweilige Photodimerschaden unmittelbar wieder in zwei ungeschädigte Monopyrimidine umgewandelt. Es kommt also nicht zum Austausch der geschädigten Basen. Photolyasen absorbieren Lichtenergie im Wellenlängenbereich von 350 – 450 nm über ihren FADH Kofaktor oder einen Antennen Kofaktor, der die Anregungsenergie dem FADH weiterleitet.⁹ Das angeregte FADH ist dann verantwortlich für die Elektronenübertragung an den Photoschaden, wobei es zur Bildung eines Dimerradikalanions kommt. Dieses Intermediat zerfällt schließlich spontan unter Ringöffnung und führt zur Rückbildung der intakten Basen.¹⁰

Die Reparatur von alkylierter DNA (z. B. 3-Methyladenin oder O6-Methylguanin) ist eine zweite Form der direkten Reparatur. Alkylierende Reagenzien verursachen unterschiedliche Schäden an den DNA-Basen oder dem DNA-Rückgrat. Beispielsweise kann das S-Adenosylmethionin (SAM), welches als Methylgruppendonor in vielen zellulären Prozessen dient, auch Methylierungsschäden hervorrufen.¹¹ Verschiedene Enzyme, wie z. B. die Familie der O6-Alkylguanin-DNA Alkyltransferasen und die AlkB Familie¹² sind für das Entfernen von alkylierten Basen verantwortlich. AlkB entfernt DNA-Alkylierungen entweder indem es die Methylgruppe auf einen internen Cysteinrest der Alkyltransferase überträgt, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (*Suizid*-Enzym), oder das Protein benutzt einen ähnlichen Mechanismus wie Eisen-abhängige Oxygenasen (Eisen-Oxo-Intermediate), um die Methylgruppen chemisch wenig reaktiver Addukte in Alkohole zu oxidieren, worauf es zu Eliminierungen kommt.¹³

3.2.2.3 Basenexzisionsreparatur

Die Basenexzisionsreparatur (BER) behebt die Schädigung (z. B. Oxidation, Desaminierung oder Alkylierung) einer einzelnen Base in einem der beiden DNA-Stränge. Nach Entfernen der betreffenden Base durch eine DNA-Glykosylase wird die korrekte Base durch eine DNA-Polymerase neu verknüpft und mit Hilfe der DNA-Ligase der Strangbruch geschlossen. Man findet zwei verschiedene BER-Enzyme: die monofunktionalen und die bifunktionalen Glykosylasen. Monofunktionale BER-Glykosylasen hydrolysieren die *N*-glykosidische Bindung und bilden eine abasische Stelle (AP-Stelle), die als Substrat für die Spaltung des DNA-Rückgrats an der 5'-Seite des Schadens durch die AP-Endonuklease (APE 1) dient. Anschließend kommt es zur Auffüllung der entstandenen Lücke. Bifunktionale BER-Glykosylasen entfernen DNA-Schäden ohne Beteiligung weiterer Enzyme in einem zweigeteilten Mechanismus.¹⁴ Zuerst wird der DNA-Schaden durch das jeweilige Enzym erkannt und anschließend durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung von einer *N*-Glykosylase-Aktivität katalysiert. Die Entfernung der entstandenen abasischen Stelle erfolgt durch eine apurinische/apyrimidinische (AP) Lyase Aktivität basierend auf einer β - und einer δ -Eliminierung, wobei das DNA-Rückgrat an der 3'-Seite und 5'-Seite des Schadens

gespalten wird. Nach Auffüllen der entstandenen Lücke durch die Polymerasen δ/ϵ wird der Strang durch eine Ligase wieder geschlossen.

3.2.2.4 Mismatch-Reparatur

Replikative Polymerasen haben trotz ihrer *proofreading* Aktivität eine Fehlerrate von 10^{-7} pro gebildetes Basenpaar. Durch Oxidation, Desaminierung und Methylierung können während der Replikation weitere Basenfehlpaarungen entstehen. Diese fehlgepaarten Basen werden durch die *Mismatch*-Reparatur (MMR) behoben.¹⁵ Fehlpaarungsreparaturproteine erkennen chemisch unveränderte aber fehlgepaarte Basen und Leserasterverschiebungen in der DNA. Kenntnisse über die MMR stammen hauptsächlich aus Erforschungen an *E. coli*-Bakterien, aus denen die daran beteiligten Proteine isoliert und charakterisiert wurden.¹⁶ Nach erfolgter Replikation ist lediglich der Parentalstrang von Bakterien methyliert. So wird bei einer Basenfehlpaarung ausschließlich der Tochterstrang durch MMR Proteine abgebaut. Die Enzyme MutS, MutH und MutL sind in dem Prozess involviert. Das MutS-Homodimer ist für die Erkennung von fehlgepaarten Basen bzw. Insertions- oder Deletionsschleifen verantwortlich. Anschließend wird abhängig von ATP das MutL-Homodimer rekrutiert. Während dieser Rekrutierung fällt MutS von der falsch gepaarten DNA ab. Durch Bindung von MutH an MutL wird das sogenannte *Repaurosom* gebildet.¹⁷ An der 5'-Seite einer unmethylierten GATC Sequenz wird durch MutH geschnitten, gefolgt von einer Bindung der Helikase II (UvrD) und verschiedenen Endonukleasen (ExoVIII, RecJ oder ExoI), welche den Strang anschließend hunderte von Basenpaaren über die ungepaarte Stelle hinaus abbauen.¹⁸ Der erzeugte Einzelstrang wird durch *single strand binding* (SSB) Proteine stabilisiert und die Lücke mit der Polymerase III wieder aufgefüllt. Das Schließen der entstandenen Lücke wird durch DNA Ligasen vollbracht.¹⁹ Eukaryotische MMR-Proteine (MSH, MLH, PMS) konnten anschließend über Homologien zu den *E. coli*-MMR-Proteinen identifiziert werden.^{20,21} Als bevorzugtes Erkennungssignal dient hier ein vorhandener Knick in der DNA.

Bei der Vielzahl an vorkommenden DNA-Schäden hat sich ein Reparaturmechanismus entwickelt, der in der Lage ist chemisch sehr unterschiedliche Schäden zu erkennen und zu

beheben. Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist Inhalt dieser Arbeit und wird in folgendem Kapitel ausführlicher besprochen.

3.3 Die Nukleotidexzisionsreparatur

3.3.1 Krankheiten hervorgerufen durch defekte NER

Aufgrund von genetischen Defekten kann es zu einer Fehlfunktion der NER kommen, was zu Krankheiten führt. Diese Krankheiten äußern sich meistens durch eine extrem hohe Sensitivität gegenüber UV-Strahlung.^{22,23} Kinder, die unter der Krankheit *Xeroderma Pigmentosum* (XP) leiden („Mondscheinkinder“) müssen jeglichen Kontakt zur Sonne vermeiden. Zwei weitere Krankheiten: das *Cockayne Syndrom* (CS) und die *Trichothiodystrophie* (TTD) werden durch Dysfunktionen der NER verursacht.

3.3.1.1 *Xeroderma Pigmentosum*

Erstmals wurden die Symptome von *Xeroderma Pigmentosum* (auch „Mondscheinkrankheit“) an einem Patienten als „pergamentartige Haut mit Pigmentstörungen“ durch M. Kaposi 1874 beschrieben.²⁴ Die Krankheit äußert sich durch eine extrem hohe Sensitivität gegenüber Sonnenlicht und durch ein 1000fach erhöhtes Hautkrebsrisiko. Außerdem treten bei 18% der Fälle beschleunigte Neurodegenerationen mit dem Verlust von Neuronen auf. Schon im Alter von 8 Jahren erscheinen die ersten Hautneoplasmen.²⁵ Die Dysfunktionen in XP Patienten werden durch Mutationen in einer der sieben komplementären XP Gene (XPA - XPG) verursacht.²⁶ Das achte Gen, XPV, kodiert für die Polymerase η , welche für die Replikation von UV-Schäden enthaltener DNA verantwortlich ist (TLS).²⁷ Eine Mutation, die zur Fehlfunktion des XPA Proteins führt, weist den stärksten Phänotypen auf.²⁸ XPA spielt demnach eine wichtige Rolle in dem Reparaturmechanismus.

3.3.1.2 Cockayne Syndrom

Eine weitere Krankheit, charakterisiert durch erhöhte UV-Lichtsensitivität, wurde durch E. Cockayne 1936 beschrieben.²⁹ Diese autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist durch weitere Symptome wie Kleinwüchsigkeit, schwere neurologische Dysfunktionen und Gesichtsfehlbildungen charakterisiert. Patienten haben eine Lebenserwartung von etwa 12 Jahren, es ist jedoch keine klare Veranlagung zu Hautkrebs erkennbar. Ursache für die Krankheit ist ein Defekt in der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR). Speziell sind die Proteine CSA und CSB defekt.³⁰

3.3.1.3 Trichothiodystrophie

Eine dritte genetisch bedingte Krankheit, die *Trichothiodystrophie*, ist durch UV-Licht Empfindlichkeit charakterisiert und wurde 1980 von V. Price beschrieben.³¹ Zusätzlich zu den Symptomen, die von CS-Patienten bekannt sind, weisen TTD-Patienten kurzes, brüchiges Haar und eine Abschuppung der Haut auf. Die autosomal-rezessiv vererbte Fehlfunktion ist auf Mutationen von TCR beteiligten Genen (XPB, XPD und TTDA) zurückzuführen. Wegen der hier dominierenden Beeinträchtigung der Transkription vor der defekten DNA, wird diese Dysfunktion auch als „transkriptionelles Syndrom“ bezeichnet.³²

3.3.2 Substrate der NER

Die Nukleotidexzisionsreparatur ist ein vielseitiges DNA-Reparatursystem, welches ein breites Spektrum an vorkommenden DNA-Schäden erkennen und beheben kann.³³ Diese Schäden schließen UV-Licht induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und (6-4) Photoprodukte ein sowie andere *bulky adducts*, wie z. B. *N*-Acetyl-2-aminofluoren-Addukte (AAF) oder Cisplatin vermittelte *intrastrand crosslinks*.³⁴⁻³⁷ Da menschliche Zellen keine Photolyasen besitzen, müssen sie für die Reparatur von Photoschäden auf die NER zurückgreifen.³⁸ Somit ist die biologische Relevanz der Nukleotidexzisionsreparatur in humanen Zellen von größter Bedeutung.

3.3.2.1 UV-Licht induzierte Schäden

Die UV-Strahlung besitzt ein hohes mutagenes Potential. Sie führt zur Bildung von mutagenen Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin(6-4)pyrimidon Photoprodukten ((6-4)PP) und Dewar-Photoprodukten.³⁹ Photolyasen sind in der Lage durch Lichtenergie die Pyrimidin-Dimere zu intakten Monomeren rückreagieren zu lassen.⁴⁰ In den folgenden Abschnitten wird auf die UV-induzierten Schäden näher eingegangen.

3.3.2.1.1 Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere

Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) stellen den Hauptteil der UV-induzierten DNA-Schäden dar. Sie werden durch eine [2+2] Cycloadditionsreaktion der C5-C6 Doppelbindungen zweier benachbarter Pyrimidinbasen gebildet. Hervorgerufen durch sterische Beschränkungen wird in dsDNA ausschließlich das *cis-syn* Produkt gebildet. Eine maximale Bildung an Photoprodukten in menschlichen Hautzellen entsteht bei einer Wellenlänge von 260 nm, welche mit dem Absorptionsspektrum der bedeutendsten DNA-Chromophore übereinstimmt (Thymin, Cytosin und 5-Methylcytosin). In Abbildung 3.3 ist die chemische Struktur des CPD-Schadens dargestellt.

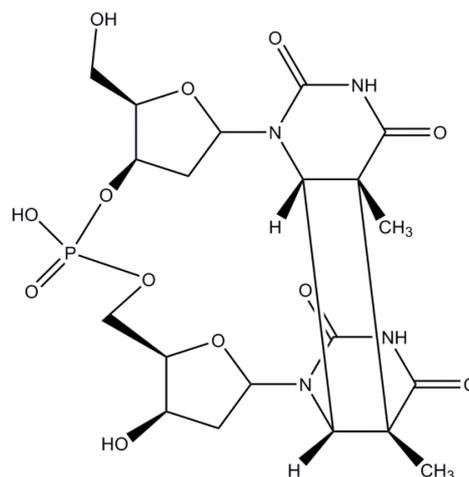


Abbildung 3.3: Chemische Struktur des CPD Schadens.

3.3.2.1.2 (6-4) Photoprodukte

Der am zweithäufigsten vorkommende Photodimerschaden ist das Pyrimidin(6-4)pyrimidon Photoprodukt ((6-4)PP). Der Schaden entsteht durch eine Paternó-Büchi Reaktion zwischen der C5-C6 Bindung des 5'-Pyrimidins und der C4-Carbonylgruppe des 3'-Thymins über eine instabile Oxetan Zwischenstufe. Diese Zwischenstufe ist oberhalb von -80 °C nicht stabil und zerfällt unter Ringöffnung in das jeweilige (6-4) Photoprodukt.⁴¹ CPD und (6-4)PP haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Struktur der DNA. Das CPD erzeugt nur eine leichte Verzerrung der Doppelhelix und es kommt nur zu geringen Veränderungen der Watson-Crick-Basenpaarung. Das (6-4) Photoprodukt hingegen ruft eine starke Verzerrung der Helix vor, was zum Verlust der Basenpaarung führt.⁴² In Abbildung 3.4 ist die Bildung des (6-4) Photoprodukts dargestellt.

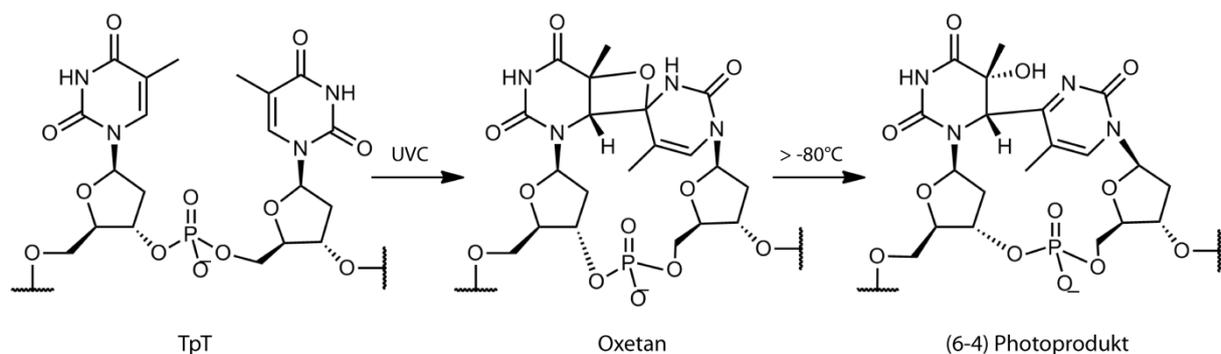


Abbildung 3.4: Bildung des (6-4) Photoprodukts über die Zwischenstufe des Oxetans.

3.3.2.1.3 Dewar Photoprodukt

Das Dewar Photoprodukt entsteht durch photochemische Umwandlung des (6-4)PP bei einer UV-Belichtung von 312 nm. Es wurde bisher nur in Säugetieren nach Belichtung festgestellt.^{43,44} Abbildung 3.5 zeigt die Struktur des Dewar Photoprodukts.

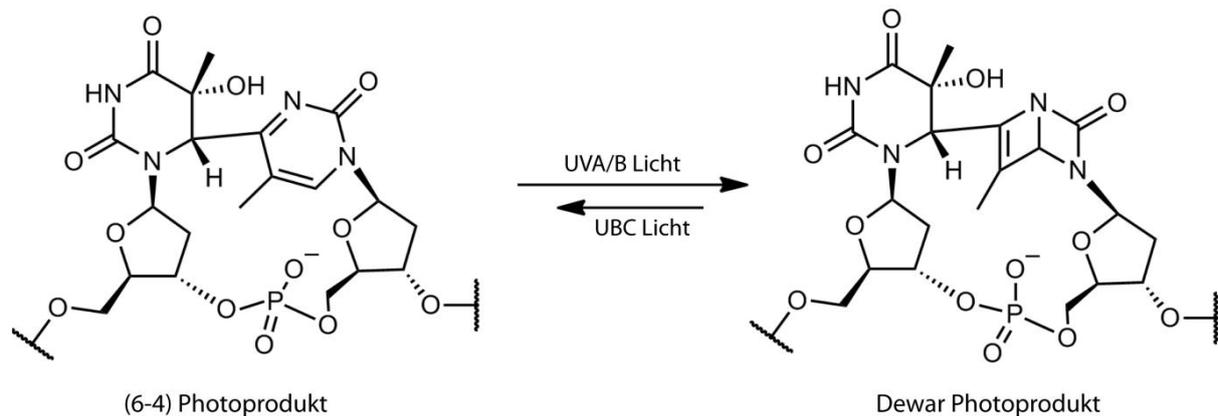


Abbildung 3.5: Bildung des Dewar Photoprodukt aus dem (6-4)PP durch UVA/UVB Belichtung.

3.3.2.2 DNA-Addukte

In folgendem Abschnitt werden häufig auftretende DNA-Schäden, die so genannten *bulky adducts*, besprochen. Diese DNA-Schäden entstehen durch Reaktion von metabolisch aktivierten, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) oder aromatischen Aminen mit der DNA. PAKs (z. B. Benzo(a)pyren) entstehen durch die unvollständige Verbrennung von organischem Materialien: Sie treten zum Beispiel in Tabakrauch und Fahrzeugabgasen auf. Untersuchungen belegten, dass polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe beim Menschen eindeutig krebserregend sind.⁴⁵ Aromatische Amine reagieren bevorzugt mit den Aminogruppen von Adenin und Guanin und vor allem mit der C8-Position des Guanins und können zum Beispiel das *bulky adduct* *N*-(2'-Desoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluoren (AAF-dG) bilden. Weiterhin entstehen in der Krebstherapie durch Querverknüpfung zweier Purinbasen mit Cisplatin *intrastrand crosslinks*. Es ist bekannt, dass bestimmte Polymerasen, die *translesion synthesis* (TLS) Polymerasen, in der Lage sind trotz vorhandener DNA-Addukte die DNA korrekt zu replizieren.⁴⁶⁻⁴⁸ Hauptsächlich werden diese *bulky adducts* jedoch durch Reparaturenzyme des NER-Systems erkannt und repariert.

3.3.2.2.1 Arylamin enthaltene Karzinogene

Die meisten krebserregenden Stoffe sind elektrophile Verbindungen, die eine hohe Affinität zu dsDNA aufweisen. Ursprünglich als Insektizid verwendet wurde das Aminofluoren (AF)

jedoch wegen seiner krebserregenden Wirkungen auf den menschlichen Körper schnell vom Markt genommen. Heutzutage dient es als Modellverbindung zur Erforschung von DNA-Reparatur.⁴⁹ Es gehört zur Gruppe der aromatischen Amine, wozu auch die polyzyklischen aromatischen Amine gehören, die man zum Beispiel in verbranntem Essen und Tabakrauch findet. Durch metabolische Mechanismen werden aromatische Amine in *N*-Hydroxyl, *N*-Acetyl oder *N*-Sulfoxy Verbindungen aktiviert. Durch eine Heterolyse der *N*-*O*-Bindung entstehen sehr reaktive Arylnitrenium-Intermediate, die an der C8 bzw. N2 Position von Guanin Addukte bilden.⁵⁰ Zwei häufig auftretende Adduktschäden wie das *N*-(2'-Desoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluoren (AF-dG) sowie das *N*-(2'-Desoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluoren (AAF-dG) sind von besonderem Interesse. Das AF-dG kann sowohl die *anti*- als auch die *syn*-Konformation bezüglich der glykosidischen Bindung einnehmen. In der *anti*-Konformation (Hauptprodukt) zeigt der Fluorenring in die große Furche, wobei die Watson-Crick Basenpaarung erhalten bleibt. Interkaliert jedoch der Fluorenring in die DNA-Doppelhelix und wird das dG in die große Furche geklappt, so befindet sich die Substanz wieder in *syn*-Konformation. Das AAF-dG tritt bevorzugt in der *syn*-Konformation in der DNA auf, wobei es, verursacht durch die sterisch anspruchsvolle Acetylgruppe an der C8 Position, zur einer Verschiebung der Basen kommt. Dieser strukturelle Unterschied spielt womöglich einen Einfluss auf deren Reparatur in NER.⁵¹ Auch Acetylaminopyren (AAP-dG) liegt aufgrund der sterisch anspruchsvollen Acetylgruppe in der *syn*-Konformation vor. Im Gegensatz zu AF-dG, welches durch eine *high fidelity* Polymerase problemlos überlesen werden kann, führen AAF-dG und AAP-dG zur Blockierung aller bisher bekannten replikativen Polymerasen.⁵² In Abbildung 3.6 sind drei verschiedene Adduktschäden abgebildet.

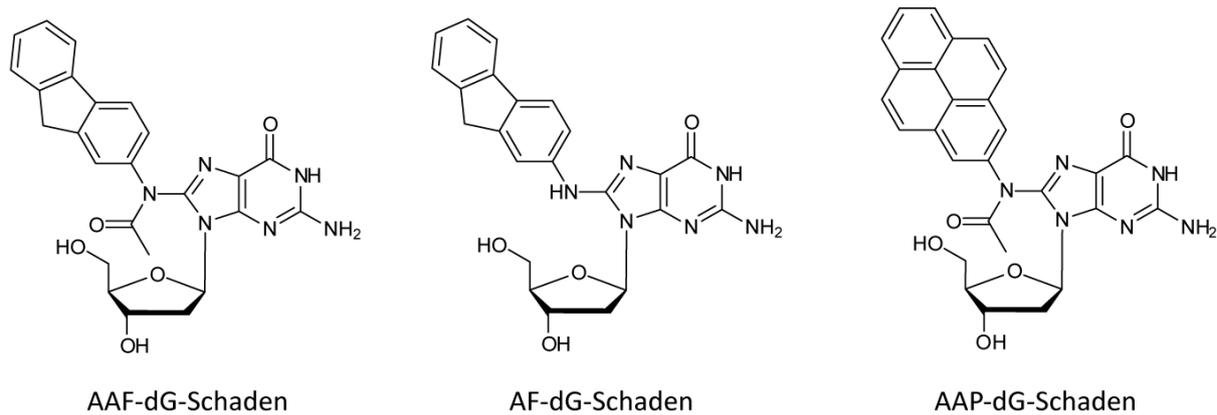


Abbildung 3.6: Strukturformeln der Adduktschäden Acetylaminofluoren (AAF-dG), Aminofluoren (AF-dG) und Acetylaminopyren (AAP-dG).

3.3.2.2.2 Cisplatin

Das Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin(II)) ist ein sehr häufig verwendetes Chemotherapeutikum und wirkt als Zytostatikum.^{53,54} Die chemische Struktur enthält einen neutralen quadratisch-planaren Platin(II) Komplex. Cisplatin wirkt ähnlich wie bifunktionale Alkylantien durch Querverknüpfungen von DNA-Strängen. Durch die erhöhte Elektrophilie des Aqua-Cisplatin-Komplexes reagiert Cisplatin bevorzugt mit dem N7-Atom von Pyrimidinen. Es kommt zu einer Querverknüpfung zweier Purine innerhalb eines DNA-Stranges (*intrastrand crosslinks*). Die Struktur der DNA wird verändert, was zur Hemmung der DNA-Replikation führt. Der Zellstoffwechsel kommt zum Erliegen, Apoptose findet statt. Durch Cisplatin erzeugte DNA-Schäden bestehen zu 65% aus 1,2-(GG)-Addukten, ca. 25% aus 1,2-(AG)-Addukten und 5 – 10% aus 1,3-(GNG)-Addukten.⁵⁵ Cisplatin-Schäden führen zu einer starken Verzerrung der DNA-Doppelhelix was sie als gute Substrate für NER qualifiziert. In Abbildung 3.7 sind die Dinukleotid und Trinukleotid verbrückten Cisplatin-Addukte dargestellt.

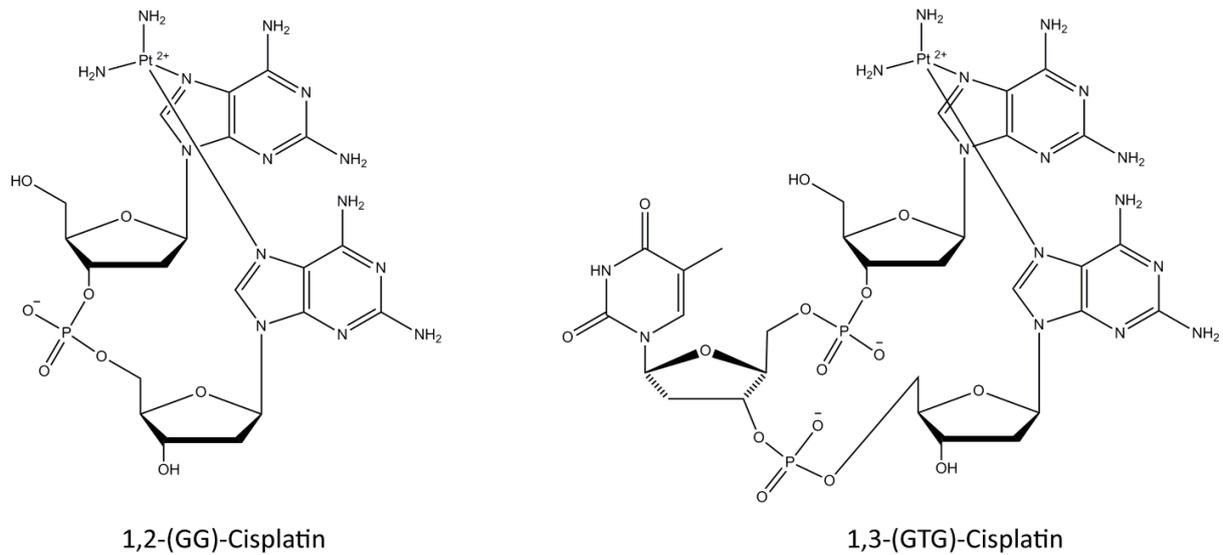


Abbildung 3.7: Abbildung der 1,2-(GG)-Cisplatin und 1,3-(GTG)-Cisplatin Schäden.

3.3.2.2.3 Fluorescein

Durch seine starke Ähnlichkeit zu großen, sperrigen Addukten fungiert Fluorescein (Fluo) auch als Substrat in der NER und wird durch das System erkannt. Es dient als artifizielles Substrat für viele NER Proteine (z. B. UvrA, XPA, XPD) und wurde schon in verschiedenen biochemischen sowie strukturellen Studien als Schadenanalogon verwendet.^{56,57} Die Strukturformel des Fluoresceins ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

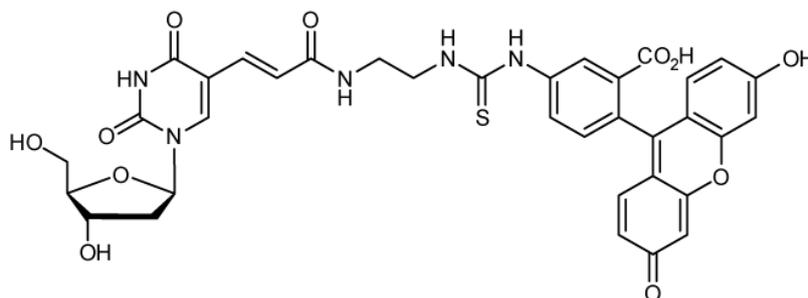


Abbildung 3.8: Strukturformel des Fluorescein-dU (FIuo-dU).

3.3.3 NER Mechanismus

In *E. coli* ist der NER Mechanismus gut untersucht, in eukaryotischen Zellen jedoch ist der biochemische Prozess noch nicht klar definiert.^{58,59} In vielen Organismen kann man denselben Mechanismus des NER-Reparatursystems wieder finden. Die NER unterteilt sich in zwei Submechanismen, die sich durch ihre Substratspezifität unterscheiden: einerseits die *globale genome repair* (GGR), welche das gesamte Genom auf DNA-Schäden untersucht und andererseits die *transcription coupled repair* (TCR), bei der die RNA-Polymerase durch Anwesenheit eines Schadens blockiert wird und so den Reparaturprozess einleitet.⁶⁰⁻⁶³ Der *in vitro* rekonstituierte Mechanismus durch Aroussekhra *et al.* ermöglichte ein besseres Verständnis der einzelnen NER Schritte.⁶⁴ Es funktioniert als einfacher *cut and patch*-Mechanismus, indem sperrige, große Schäden in der DNA erkannt werden. Es folgt die Bindung eines Multiproteinkomplexes an die geschädigte Stelle, wobei ein doppelter asymmetrischer Schnitt des Schaden-enthaltenden Strangs durchgeführt wird. Das ssDNA-Fragment mit den Schaden enthaltenden Oligonukleotid wird entfernt. Daraufhin erfolgt die Wiederherstellung des Doppelstranges durch Auffüllen der resultierenden Lücke mittels DNA-Polymerase. Schließlich kommt es zur Ligation des neu synthetisierten Stranges.⁶⁵

In Abbildung 3.9 sind die verschiedenen Schritte des NER Mechanismus dargestellt. Detaillierter betrachtet kommt es nach der Schadenserkenkung durch XPA, RPA und XPC-HR23B (Abbildung 3.9, B) zur Rekrutierung weiterer Faktoren. Zwei ATP-abhängige DNA-Helikasen XPB und XPD, beides Untereinheiten des humanen TFIIH-Proteinkomplexes (Transkriptionsfaktor der RNA Polymerase II), binden an die geschädigte Stelle und katalysieren unter ATP-Verbrauch die Bildung eines offenen DNA-Komplexes (C). TFIIH ist normalerweise bei der Transkription mit RNA Polymerase II bzw. I involviert, doch in Anwesenheit von DNA-Schäden kann es für die NER rekrutiert werden.⁶⁶ Der gebildete Komplex wird als „*pre-incision complex*“ bezeichnet und durch die Endonuklease XPG stabilisiert. Es wurde gezeigt, dass eine starke Wechselwirkung zwischen XPG und TFIIH stattfindet und dass eine Beeinträchtigung dieser Wechselwirkung den TFIIH-Proteinkomplex destabilisieren würde.³⁴ XPF-ERCC1 und XPG sind strukturspezifische Endonukleasen. Sie schneiden den geschädigten DNA-Strang an der 3'- und 5'-Stelle des Schadens (D, E), so dass

ein ca. 30 Basen umfassendes Oligonukleotid freigesetzt wird (F), welches den DNA-Schaden enthält.⁶⁷ Nun erfolgt die Polymerisation des fehlenden DNA-Abschnitts durch die DNA-Polymerasen δ/ϵ wobei dieser Prozess durch weitere Faktoren (PCNA, RFC, RPA) unterstützt wird. Als letztes erfolgt die Ligation des synthetisierten Abschnitts durch die DNA-Ligase I und man erhält einen intakten Doppelstrang (G).

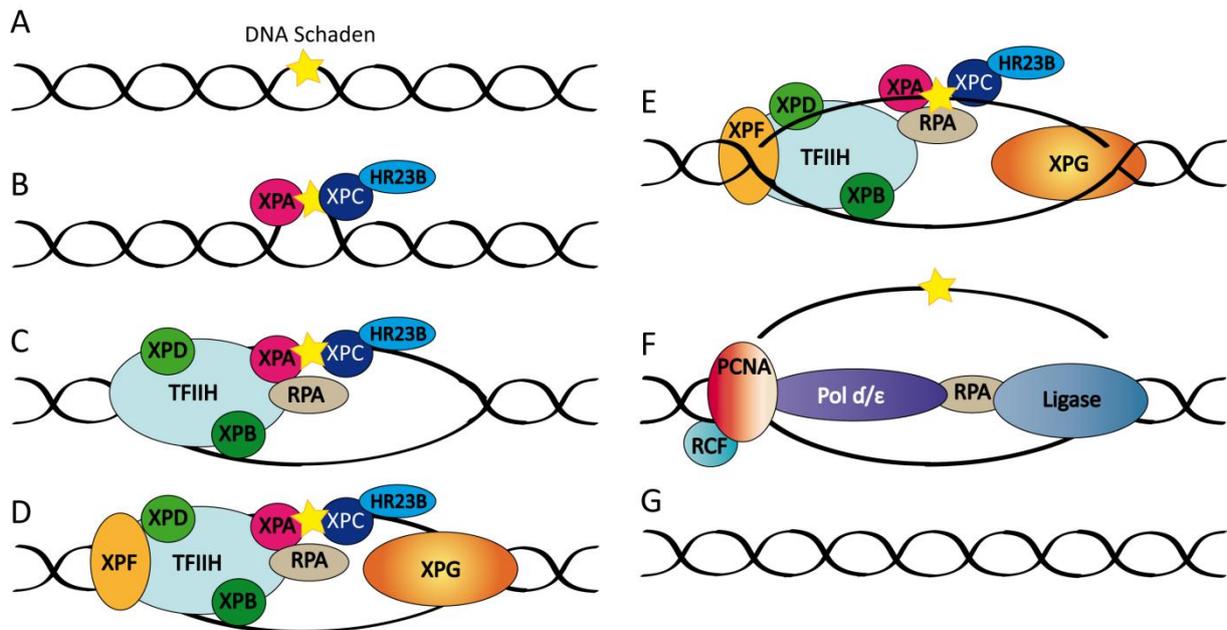


Abbildung 3.9: Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur.⁶⁸ A) Entstehung eines DNA-Schadens. B) Erkennung des Schadens durch Schadenserkennerproteine. C, D) Rekrutierung weiterer Faktoren. E) Beidseitige Inzision des geschädigten Stranges. F) Entfernung des Schaden-enthaltenden Fragments. G) *De novo* Synthese des DNA-Strangs durch die Polymerasen δ/ϵ und Verknüpfung durch die DNA-Ligase I. PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*, RFC: *Replication factor C*. RPA: *Replication protein A*.

Für das erfolgreiche Gelingen der NER ist ein koordiniertes Zusammenspiel von mindestens 10 verschiedenen Enzymen erforderlich. In Tabelle 3.1 werden die wichtigsten humanen NER-Enzyme sowie deren Homologe aus *S. cerevisiae* aufgelistet.

Tabelle 3.1: Hauptenzyme der eukaryotischen Nukleotidexzisionsreparatur.⁶⁹ ERCC: *Excision repair cross-complementing repair deficiency*, UV-DDB: *UV-damaged DNA binding protein*.

Human	<i>S. cerevisiae</i>	Funktion
XPA	Rad14	Interaktion mit RPA und DNA, Schadenserkennung, Rekrutierung weiterer Proteine
XPB (ERCC3)	Rad25	Untereinheit von TFIIH, 3'→ 5' -Helikase, lokale Entwindung der DNA
XPC	Rad4	Interaktion mit HR23B, Erkennung von ungepaarten DNA-Basen, Rekrutierung weiterer Proteine
XPB (ERCC2)	Rad3	Untereinheit von TFIIH, 5'→ 3' -Helikase, lokale Entwindung der DNA
XPG (ERCC5)	Rad2	Endonuklease, 3'-Inzision des geschädigten DNA-Strangs, Stabilisierung des offenen Komplexes
XPE (UV-DDB)		Interaktion mit XPC, Schadenserkennung
XPF (ERCC4)	Rad1	Endonuklease, 5'-Inzision des geschädigten DNA-Strangs
ERCC1	Rad10	Endonuklease, 5'-Inzision des geschädigten DNA-Strangs
HR23B	Rad23	Bindung an XPC, Interaktion mit dem Proteasom
RPA	RPA	Interaktion mit XPA und ssDNA, Stabilisierung des offenen Komplexes

3.3.4 Die Schadenserkenkung in der NER

Wie ist die Zelle in der Lage geschädigte DNA bei der großen Menge an ungeschädigter DNA zu erkennen? Die Schadenserkenkung in der Nukleotidexzisionsreparatur ist noch unklar. Da das NER Reparatursystem eine große Anzahl an unterschiedlichen DNA-Schäden erkennt und repariert, wird möglicherweise nicht der Schaden an sich erkannt, sondern eine Konformationsänderung in der DNA Helixstruktur. Eine Studie von Hess *et al.*⁷⁰ zeigt, dass kleine strukturelle Modifikationen in der DNA durch das NER System erst erkannt werden, wenn diese Modifikationen sich in einer Blase aus mindestens drei ungepaarten Basen befinden. Die Blase alleine wird auch nicht als Schaden erkannt. Dieses Modell der „*bipartite substrate discrimination*“ besagt, dass ein Schaden in der NER nur erkannt wird, wenn es sowohl eine chemische Modifikation beinhaltet als auch die DNA-Struktur verändert. Passend zu diesem Modell erzeugen Helix verzerrende Schäden eine stärkere NER Antwort: zum Beispiel wird (6-4)PP besser erkannt als CPD und 1,3-Cisplatin besser als 1,2-Cisplatin.^{70,71} Die Schadenserkenkung ist sicherlich der anspruchsvollste und limitierende Schritt aller Reparaturprozesse und besonders im Fall der NER ist dieser durch die hohe Vielseitigkeit an erkannten und reparierten Schäden faszinierend.

In dieser Arbeit soll auf die Schadenserkenkung in der globalen Genomreparatur (GGR) näher eingegangen werden. Während bei der TCR die Schadenserkenkung durch den Transkriptionskomplex selbst bewerkstelligt wird, ist bei der GGR eine separate Erkennung erforderlich. Bei dem Mechanismus der Schadenserkenkung in der GGR wird kontrovers diskutiert, ob XPC/Rad4 oder XPA/Rad14 als erstes an die Schadensstelle rekrutiert wird. Lange Zeit wurde XPA/Rad14 für den ersten Schritt der NER-Schadenserkenkung verantwortlich gemacht.^{35,72} Sugawara *et al.*⁷³ konnten in einem *in vivo* Experiment jedoch zeigen, dass zuerst XPC-HR23B an den Schaden bindet und schlagen vor, dass XPA/Rad14 für die Verifizierung des Schadens zuständig ist. Da XPC nur in der GGR von Bedeutung ist, vermuten sie seine Beteiligung in einem frühen Stadium. XPA hingegen ist sowohl in der GGR als auch in der TCR vorhanden, was auf eine spätere Handlung innerhalb der NER des Proteins hindeutet.^{73,74} Diese Hypothese ist jedoch experimentell nicht hinreichend belegt.

3.3.4.1 XPC als Schadenserkenngungsprotein

Es wird postuliert, dass XPC/Rad4 für die anfängliche Schadenserkenngung zuständig ist.^{75,76} Das Protein bindet geschädigte DNA und rekrutiert daraufhin weitere Proteine an die Schadensstelle.⁷³ Biochemische Studien haben gezeigt, dass der XPC-HR23B Komplex mit signifikanter Affinität an verschiedene DNA-Schäden bindet, wie z. B. (6-4)PP und AAF-Addukte.^{2,77} Ein *in vivo* Versuch von Volker *et al.*⁷⁸ beweist die Notwendigkeit von XPC in der Schadenserkenngung von UV-Licht induzierten DNA-Schäden. In dem Versuch konnten lokale UV-Schäden an definierten Positionen von Zellkernen lebender Zellen, mittels Bestrahlung der Zelle mit UV-Licht durch einen porösen Polykarbonatfilter, erzeugt werden (Abbildung 3.10, A1 und A2). Zur Visualisierung der UV-Schäden wurden spezifische Antikörper gegen CPD und (6-4)PP eingesetzt. Ebenso wurden XPC bzw. XPA spezifische Antikörper zur Detektion beider Schadenserkenngungsproteine eingesetzt. Das Experiment zeigt, dass XPC mit den UV-Schäden in XPA defizienten Zellen (XP-A) kolokalisiert (B5, B6), wohingegen XPA in XPC defizienten Zellen (XP-C) nicht mit den UV-Schäden kolokalisiert (C5, C6). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass XPA die Anwesenheit von XPC braucht, um an die DNA-Schadensstellen rekrutiert zu werden. Das Model besagt, dass XPC als erster an der Schadenstelle eintrifft.

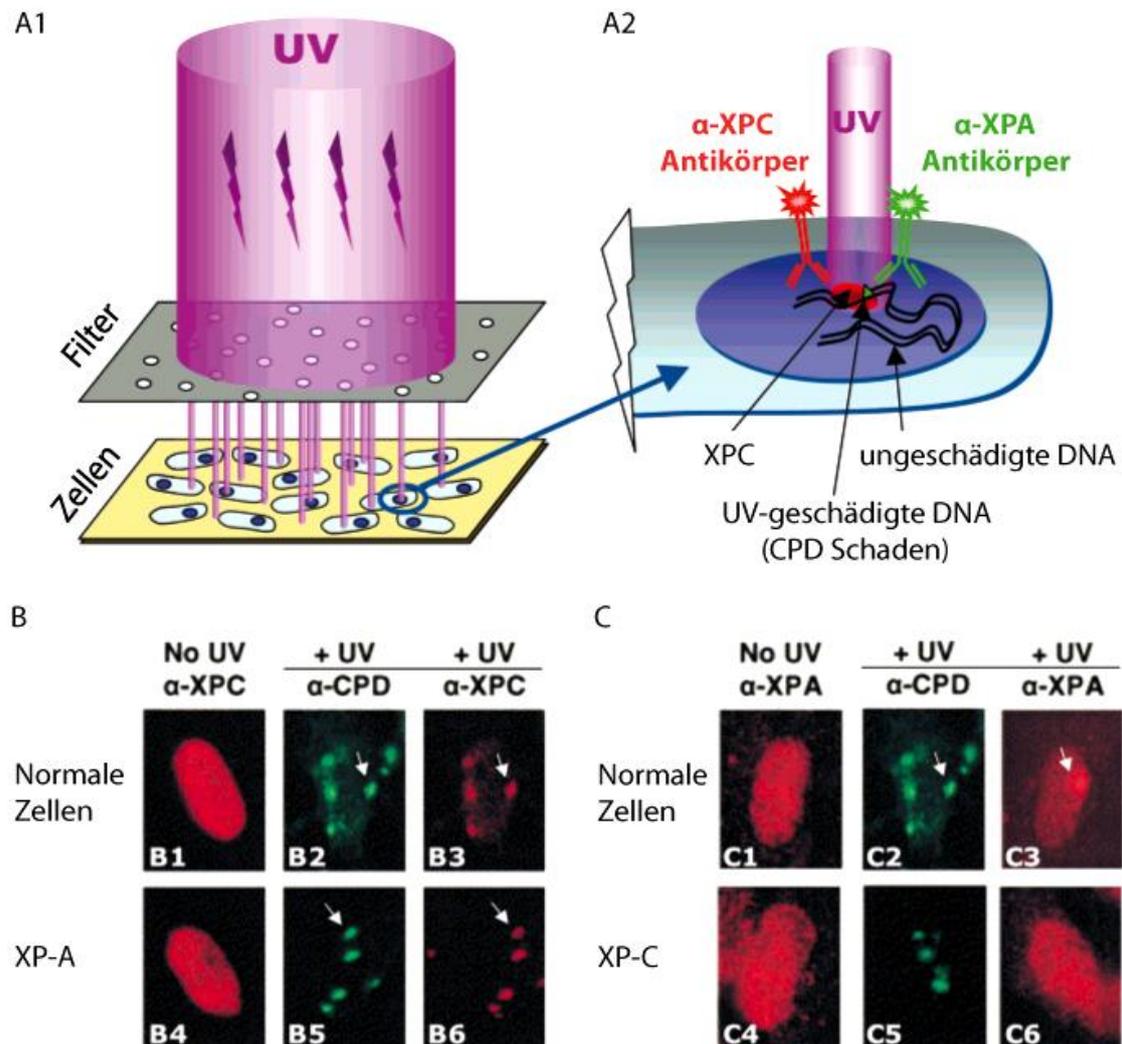


Abbildung 3.10: Kolokalisation der NER Schadenserkennungsproteine XPA und XPC an DNA UV-Schäden. A1) Zellkerne wurden lokal mit UV-Licht bestrahlt, wobei A2) Antikörper gegen UV-Schäden und XPC bzw. XPA zugesetzt wurden. B) In XP-A Zellen ist eine deutliche Kolokalisation von XPC an der Schadenstelle zu erkennen, wobei C) in XP-C Zellen keine Kolokalisation von XPA mit UV-Schäden stattfindet.⁵⁰

Im Jahr 2007 wurde in der Fachzeitschrift *Nature* die Kristallstruktur des Hefehomologs von XPC-HR23B, dem Rad4-Rad23 Protein, im Komplex mit einem CPD-Schaden veröffentlicht.⁷⁹ Es wurde ein verkürztes Fragment des Proteins (die DNA-bindende Domäne) kristallisiert, das eine ebenso hohe Affinität zu geschädigter DNA aufweist, wie das Vollängenprotein. Der DNA-Doppelstrang bestand aus 24 Basenpaaren und enthielt ein TT-CPD Photoschaden, der einen *Mismatch* mit zwei gegenüberliegenden Thyminen bildete

(Abbildung 3.11). Die Kristallstruktur zeigt, dass durch Einfügen eines β -Hairpins (*beta hairpin domain 3*, BHD3) in den destabilisierten DNA-Doppelstrang die zwei geschädigten Thyminide vollständig aus der Doppelhelix herausgedreht werden (base flipping). Diese liegen in der Struktur delokalisiert vor und treten nicht in Kontakt mit dem Rad4 Protein. Daraus resultiert eine Biegung der DNA von ca. 42° , was ebenfalls durch atomare Kraftmikroskopie (AFM) beobachtet wurde.⁸⁰ Die gegenüberliegenden ungeschädigten Nukleotide werden durch BHD1 und TGD (*transglutaminase homology domain*) des Proteins über van der Waals Wechselwirkungen erkannt. Das Protein zeigt während der Bindung an die geschädigte DNA eine Konformationsänderung (*induced fit*). Die Autoren schlossen aus der Struktur, dass das Protein eine destabilisierte Doppelhelix-Struktur erkennt ohne direkt an den Schaden zu binden. Dabei detektiert das Protein eine geschwächte und verzerrte DNA-Helixstruktur. Vermutlich erkennt der Rad4-Rad23 Komplex DNA-Schäden, die eine thermodynamische Instabilität der Doppelhelix erzeugen. Die Struktur bestätigt, dass Rad4-Rad23 über einen indirekten Erkennungsmechanismus die strukturellen Anomalitäten der DNA detektiert. Das Vorhandensein ungepaarter Basenpaare, nicht jedoch eine chemische Modifikation der Basen selbst, ist vielleicht notwendig für die Erkennung durch den Rad4-Rad23 Komplex. Diese Bindungscharakteristika von Rad4/XPC ermöglichen das Postulieren eines entscheidenden molekularen Mechanismus für die extrem vielseitige Substratspezifität des GGR Systems zu definieren.

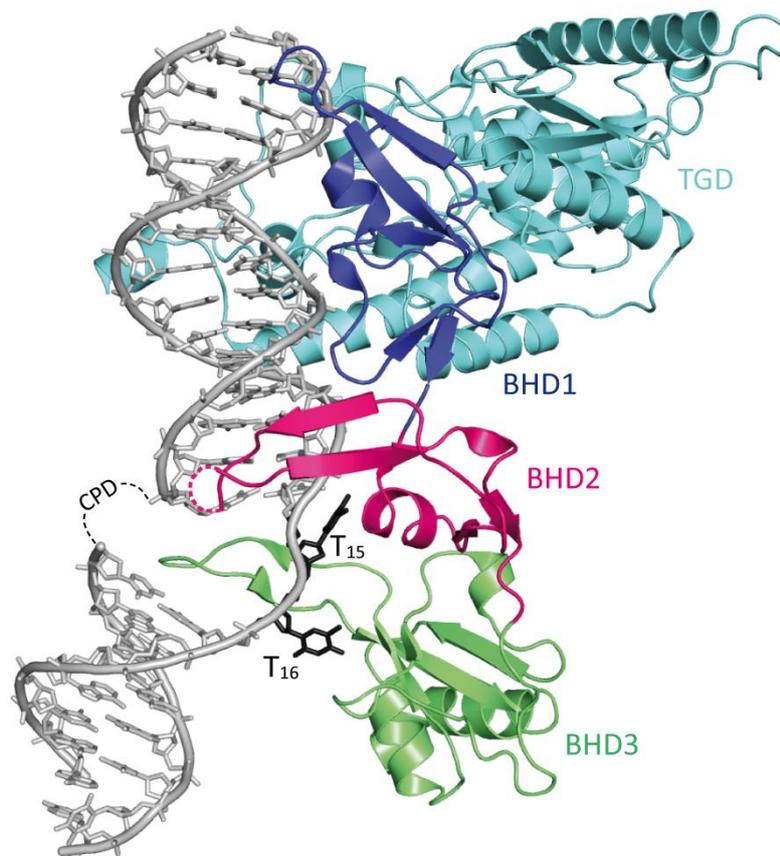


Abbildung 3.11: Gesamtstruktur des Rad4-DNA Co-Komplexes (PDB Code 2QSG).⁷⁹ TGD (*transglutaminase homology domain*) türkisfarben, BHD1 (*beta hairpin domain 1*) blau, BHD2 pink, BHD3 grün und die DNA grau dargestellt. Die zwei ungeschädigten Thymidine gegenüber dem Schaden sind schwarz abgebildet.

Bei der Erkennung des (6-4) Photoschadens scheint ein weiteres Protein, das *UV-damage DNA binding protein* (UV-DDB)/XPE die Bindung von XPC-HR23B zu vermitteln.⁸¹ Der DDB1-DDB2-Komplex zeigt eine starke Affinität zu Photoschäden. Die DNA-Schadenserkennung erfolgt durch das UV-DDB2 Protein und erfordert die Insertion eines β -*Hairpins* in die kleine Furche der DNA sowie die Stabilisierung der herausgedrehten geschädigten Basen und eine DNA Biegung um etwa 40° . DDB2 detektiert den UV-Schaden und transferiert ihn mit Hilfe von DDB2 an den XPC-HR23B Komplex. Daraufhin löst XPC eine Reihe aufeinanderfolgende Ereignisse aus, wie das Entwinden der DNA durch den TFIIH-Komplex, die Stabilisierung des aufgetrennten Doppelstrangs durch XPA, RPA und XPG und schließlich den Einschnitt der DNA durch XPF-ERCC1 und XPG.⁵⁹

Der (6-4) Photoschaden, der ein besseres NER Substrat als CPD ist⁷¹, benötigt jedoch zusätzlich zu XPC-HR23B einen weiteren Faktor, UV-DDB/XPE, für dessen Erkennung. Weiterhin scheint XPC bei CPD-geschädigter DNA nicht den Schaden selbst, sondern nur den künstlich erzeugten *Mismatch* zu erkennen. Ist also das XPC Protein wirklich für die initiale Schadenserkenkung in der NER zuständig oder werden noch weitere Faktoren benötigt?

3.3.4.2 XPA als Schadenserkenkungprotein

Experimentelle Daten zeigen, dass auch XPA/Rad14 als erster DNA-Schadenssensor agieren könnte und für die Rekrutierung weiterer NER Proteine zuständig sein könnte. Dieses Protein könnte zusammen mit RPA, die Schadenserkenkung vollbringen.⁸² Durch Bindungsstudien wurde bewiesen, dass XPA unabhängig von XPC an eine Vielzahl an DNA-Schäden wie DNA-Adduktschäden, Fluorescein, Photoschäden sowie Cisplatin-Addukte mit hoher Affinität bindet und somit als Schlüsselprotein in der Schadenserkenkung von NER fungiert.^{46,47,83} In XPA defizienten Zellen oder in Zellen, in denen XPA mutiert ist, findet kein NER statt. XPA zeigt eine gewisse Affinität zu einzelsträngiger DNA, dieser Einzelstrangcharakter wird durch DNA-Schäden erzeugt, die die Doppelhelix verzerren.³⁵ Das Protein erkennt möglicherweise konformationelle Änderungen in der DNA-Struktur (Verzerrung des DNA-Rückgrats), verursacht durch verschiedene DNA schädigende Substanzen.^{72,84} Die Fähigkeit von XPA an geknickte oder destabilisierte DNA Strukturen zu binden, zusammen mit der Fähigkeit weitere NER Faktoren zu rekrutieren und zu aktivieren, könnte der Hauptgrund sein für seine Bedeutsamkeit sowohl in der GGR als auch in der TCR.

3.3.4.3 XPA und XPC als Schadenserkennungproteine

Möglicherweise erfolgt die Schadenserkenkung durch beide Proteine, welche in beliebiger Reihenfolge an den DNA-Schaden binden und einen Komplex bestehend aus XPA, RPA, XPC-HR23B ergeben. XPA erkennt DNA-Schäden, die stark geknickte DNA erzeugen oder stabilisieren. Andere Schäden hingegen, wie CPD oder (6-4)PP, welche die DNA Struktur und Stabilität wenig beeinflussen,⁸⁵ könnten von XPC und XPE erkannt werden.⁸⁶ Das NER-Reparatursystem könnte möglicherweise über zwei zueinander komplementäre

Schadenserkennungsmechanismen verfügen. Welches der beiden Proteine tatsächlich für die Schadenserkennung zuständig ist, sollte dann von dem jeweiligen Schaden abhängig sein. In Abbildung 3.12 ist ein schematischer Ablauf der Schadenserkennung durch XPA und XPC dargestellt.

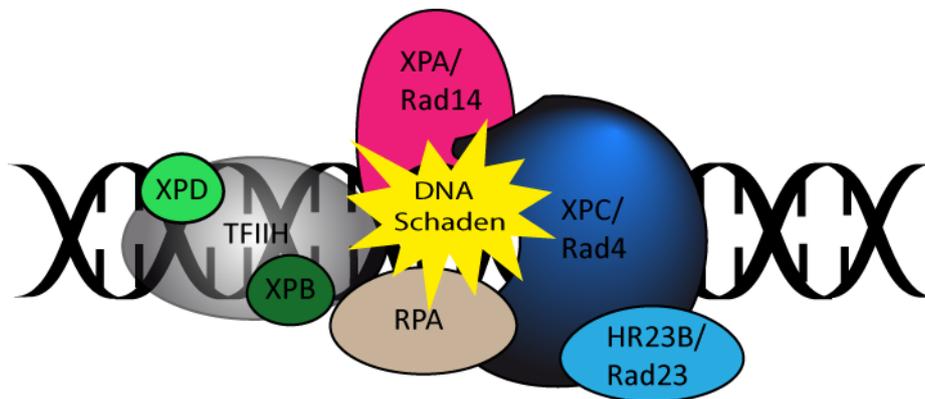


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des NER Prozesses und die dabei involvierten Reparaturenzyme.⁸⁷

3.4 Das XPA Protein

3.4.1 Allgemeines

Das humane XPA Gen ist auf dem Chromosom 9 (9q34.1) lokalisiert und besteht aus sechs Exons.

NLS 30 - 42		Zinkfinger 105 - 129		RPA70 153 - 175	
Exon 1 1 - 58	Exon 2 59 - 95	Exon 3 96 - 130	Exon 4 131 - 185	Exon 5 186 - 225	Exon 6 226 - 273
RPA34 1 - 58	ERCC1 72 - 84	DNA-Bindungsdomäne 98 - 219		TFIIH 226 - 273	

Abbildung 3.13: Aufbau und funktionelle Regionen des Schadenserkennungsproteins XPA.⁶⁵ Zinkfinger Domäne (blau), RPA70-Bindungsstelle (rot) und DNA-bindende Domäne (grün). NLS: *Nuclear localisation signal*.

Das relativ kleine XPA (*Xeroderma Pigmentosum Group A Complementation Group*) Protein bestehend aus 273 Aminosäuren (31 kDa) kann sowohl als Homodimer oder auch in einem Komplex mit anderen NER-Proteinen auftreten.^{88,89} Das XPA Protein besteht aus mehreren Domänen (Abbildung 3.13).^{65,84} Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 4 – 97) enthält RPA34- und ERCC1-bindende Regionen. Dieser Bereich von XPA ist nicht unbedingt notwendig für seine Funktion.⁹⁰ Die C-terminale Domäne (Aminosäuren 226 – 273) wechselwirkt mit dem Transkriptionsfaktor TFIIH. Die mittlere Domäne (Aminosäuren 98 – 219) ist für die Bindung an DNA verantwortlich und wurde als minimales DNA-bindende Fragment (XPA-DBD) definiert. In ihrem N-terminalen Bereich besitzt die zentrale Domäne von XPA das Zinkfinger-Motiv (Cys105-X₂-Cys108-X₁₇-Cys126-X₂-Cys129),⁹¹ wobei sich in der C-terminalen Region dieser Domäne die essentielle RPA70- Binderegion (die größte ssDNA-bindende Untereinheit des trimeren RPA Proteins) befindet.⁶⁷ Es wird vermutet, dass das C₄-Zinkfinger-Motiv einerseits zur Stabilität der funktionalen Domäne des Proteins dient und andererseits für die Wechselwirkung mit der 70 kDa Untereinheit von RPA benötigt wird.^{67,92,93} Durch Mutation eines oder aller Zink-bindenden Cysteine kommt es zu einem Funktionsverlust von XPA und einer fast vollständigen Hemmung der NER.^{83,94} Die NMR-Struktur des minimalen DNA-bindenden Fragments von XPA (Abbildung 3.14) offenbart die Anwesenheit einer Tasche mit geeigneten Dimensionen für die Aufnahme von dsDNA.^{67,95,96} Diese Region weist zahlreiche basische, positiv geladene Aminosäuren an ihrer Oberfläche auf, welche vermutlich mit den negativ geladenen Phosphatresten des DNA-Rückgrats in Wechselwirkung treten. Die Überlappung der DNA-bindenden Domäne von XPA und der RPA bindenden Regionen weist auf eine kooperative DNA-Bindung zwischen XPA-DBD und RPA, wobei Letzteres die Spezifität und Affinität der Bindung von XPA an DNA verstärkt.⁹⁷

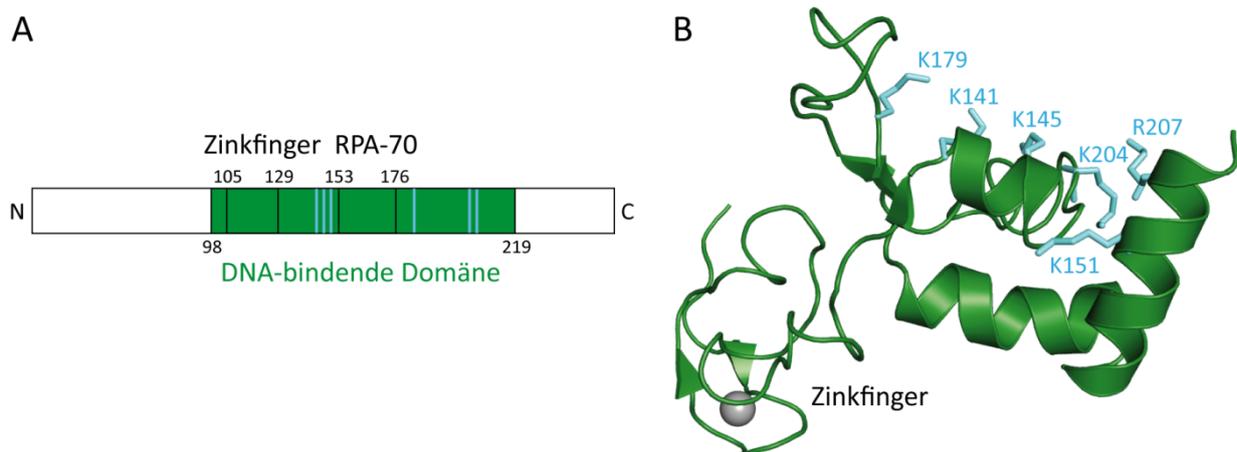


Abbildung 3.14: Struktur des humanen XPA Proteins. A) Minimales DNA-bindendes Fragment mit positiv geladenen Aminosäuren blau markiert. B) Dreidimensionale NMR-Struktur des minimalen DNA-bindenden Fragments.^{84,95} Zinkatom: grau; positiv geladene Aminosäuren: blau.

Es wurde gezeigt, dass XPA an ssDNA sowie dsDNA und denaturierte Basen in Kooperation mit RPA bindet.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Weiterhin zeigt XPA eine Affinität zu selektiv belichteter DNA,^{35,89} zu AAF-Schäden und zu Cisplatin-Addukten,¹⁰¹ sowie zu fehlgepaarten DNA Duplexen und DNA-Loops.⁸⁴ Es wird vermutet, dass große Addukte der DNA eine bessere konformationelle Flexibilität ermöglichen. Camenisch *et al.* konnten durch Mutationsanalysen zeigen, dass die Reste Lysin141 und Lysin179, die sich auf der Oberfläche des XPA Proteins angrenzend zur DNA-Bindungstasche befinden, zur Überprüfung der steigenden Verformbarkeit des DNA-Stranges, welche für geschädigte Stellen charakteristisch ist, dienen.^{84,94} Es wurde vermutet, dass beide Lysine eine Wechselwirkung mit dem DNA-Rückgrat eingehen, wobei die Bindung als RPA-XPA-Dimer bevorzugt an eine geknickte DNA stattfindet.^{102,103} Für die DNA-Bindung ist die loopreiche Domäne von XPA verantwortlich, deren Tertiärstruktur durch die Wechselwirkungen mit der Zinkfingerstruktur aufrecht erhalten wird.^{94,104} Die einzelnen Schritte, welche zur gerichteten Interaktion zwischen DNA und XPA führen, sind jedoch unbekannt. Somit sind weitere Untersuchungen mit dem Protein von Nöten, um ein besseres Verständnis des Mechanismus der Schadenserkennung von Rad14/XPA in der Nukleotidexzisionsreparatur zu bekommen.

3.4.2 Rad14, das Hefehomolog von XPA

Das Rad14 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ein hydrophiles Protein, welches aus 371 Aminosäuren (43 kDa) besteht und ein Zinkfingermotiv enthält. Es wurde zum ersten Mal 1992 von Bankmann *et al.* erwähnt und ist an der Erkennung und Bindung von geschädigter DNA beteiligt.⁹⁰ Der Aufbau des Proteins ähnelt dem des humanen XPA. Beide Proteine besitzen einen hohen Anteil an Glutaminsäuren (13%) und Lysine (11%) und sind an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt. Ihre DNA-bindende Domänen weisen eine hohe Sequenzhomologie auf; Sie sind zu 33% identisch und besitzen 61% ähnliche Reste (Abbildung 3.15).⁹⁰ Beim Vergleich der Vollängenproteine sind 27% der Aminosäuren identisch und 54% ähnlich. Beide besitzen ein Zinkfinger Motiv, welches für Protein-Protein Wechselwirkungen mit RPA bzw. dem hefeanalogen Protein verantwortlich ist. Mutationen in dem Protein führen zu einer stark verringerten NER-Aktivität in *S. cerevisiae*, begleitet von der charakteristischen UV-Hypersensibilität von Rad14-Mutanten. Der Sequenzteil, der für die DNA-Bindungsdomäne von XPA bzw. Rad14 kodiert, ist in Mensch und Hefe konserviert, deshalb eignet sich Hefe als Modellorganismus zur Untersuchung der genetischen und biochemischen Eigenschaften der NER Schadenserkennung in Eukaryoten. In Abbildung 3.15 ist der Sequenzvergleich von humanem XPA und seinem Homolog Rad14 aus *S. cerevisiae* dargestellt.

<i>S. cerevisiae</i>	1	----	APK	C	T	C	H	I	N	I	E	M	D	P	V	L	H	D	V	F	K	L	Q	V	C	K	C	S	K	E	H	P	K	Y	A	L	L	T	K	T	E	C	K	E	D	Y	F	L	T	D	P	E	L	N	D								
<i>Homo sapiens</i>	1		M	E	F	D	Y	V	I	C	E	C	G	K	E	-	F	M	D	S	Y	L	M	N	H	F	D	L	P	T	C	D	N	C	R	D	A	-	D	D	K	H	K	L	L	T	K	T	E	A	K	Q	E	Y	L	L	K	D	C	D	L	E	K
<i>S. cerevisiae</i>	59	E	D	-	L	F	R	L	E	K	P	N	P	H	S	G	T	F	A	R	M	Q	L	F	V	R	C	E	V	E	A	F	A	F	K	K	W	G	E	E	G	L	D	E	E	W	Q	R	R	E	E	G	K	A	H	R	R	E	K	K	Y		
<i>Homo sapiens</i>	61	R	E	P	P	L	K	F	I	V	K	N	P	H	S	Q	W	G	D	M	K	L	Y	L	K	L	Q	I	V	K	R	S	L	E	V	W	G	S	Q	E	A	L	E	E	A	K	E	V	R	Q	E	N	R	E	K	M	K	Q	K	F			

Abbildung 3.15: Sequenzvergleich von humanem XPA und seinem Hefehomolog Rad14 aus *S. cerevisiae*. Identische Reste sind schwarz markiert und ähnliche Reste grau. Die zu dem Zinkfinger gehörenden Cysteine sind orange abgebildet.

4 Aufgabenstellung

Die Nukleotidexzisionsreparatur spielt eine wichtige Rolle bei der Entfernung einer Vielfalt unterschiedlicher DNA-Schäden und ermöglicht die Aufrechterhaltung der Integrität der DNA. Trotz bekanntem Reparaturmechanismus ist der biochemische Mechanismus der Schadenserkennung in der globalen Genomreparatur (GGR) noch unklar. XPC/Rad4 und XPA/Rad14 scheinen eine wichtige Rolle in der Schadenserkennung innerhalb des NER Prozesses zu spielen. Bindungsstudien beider Proteine an DNA mit verschiedenen DNA-Schäden sind bekannt^{101,84,73} und von Rad4-Rad23 gibt es eine Kristallstruktur im Komplex mit CPD-geschädigter DNA.⁷⁹ Bis heute ist lediglich eine NMR Struktur der DNA-Bindedomäne von XPA ohne gebundenes Substrat bekannt, welche jedoch keine genaue Information über die Schadenserkennung gibt.⁶⁷ In dieser Arbeit sollte die Substratspezifität von XPA/Rad14 zu unterschiedlichen DNA-Schäden definiert werden sowie Kristallstrukturen von XPA/Rad14 mit strukturell unterschiedlichen DNA-Schäden erhalten werden, um Informationen zum Erkennungsmechanismus des Proteins in der NER zu erhalten. Nach erfolgter Überexpression und Aufreinigung von XPA und dessen Hefehomolog Rad14, sollten beide Proteine in biochemischen und strukturellen Versuchen eingesetzt werden. EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Studien mit verschiedenen Schaden enthaltenden DNA-Oligonukleotiden (AAF-dG, AF-dG, Cisplatin, Fluorescein-dU, CPD, (6-4)PP) sollten vorerst einen Hinweis über die Bindungsaffinitäten der Proteine zu den verschiedenen Schäden verschaffen. Die DNA-bindenden Domänen von XPA und Rad14 sollten daraufhin mit AAF-dG bzw. Cisplatin-geschädigter DNA kristallisiert werden. Die Erzeugung hochauflösender Kristalle, sollte die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse ermöglichen. Die erstrebte Kristallstruktur sollte einen atomaren Einblick in die Schadenserkennung von XPA/Rad14 liefern. Ziel war es eine genaue Analyse des Mechanismus der Schadensbindung möglich zu machen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von *Boehringer* (Mannheim), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *SigmaAldrich* (Deisenhofen) oder *AppliChem* (Darmstadt) bezogen. Alle Chemikalien waren in BioChemica Qualität.

5.1.2 Oligonukleotide

Bei der Amplifikation der *xpa* bzw. *rad14* Gene für die PCR wurden folgende Oligonukleotide (Tabelle 5.1) eingesetzt. Das gewünschte Oligonukleotid wurde an dem 5'-Ende phosphoryliert (Pho) und an beiden Enden mit 4 Basen versehen, da diese als wichtige Rekombinationssequenzen für den Transfer des Gens in den *Entry*- bzw. den Akzeptorvektor der *StarGate*[®] Technologie dienten. Die Primer wurden von der Firma *Metabion* (Martinsried) geliefert.

Tabelle 5.1: Verwendete Primer für die PCR. AATG und TCCC: Rekombinationssequenzen für die Klonierung mittels *StarGate*[®] Methode.

Bezeichnung	Nukleotidsequenzen (5' → 3')	Orientierung
XPAfl <i>for</i>	Pho-AATGGCGGGCGGCCGACGG	<i>sense</i>
XPAfl <i>rev</i>	Pho-TCCCCATTTTTTCATATGTCAGTTCA TGGCC	<i>antisense</i>
XPAs <i>for</i>	Pho-AATGGAATTTGATTATGTAATATGCG	<i>sense</i>
XPAs <i>rev</i>	Pho-TCCCAAATTTCTTCTGTTTCATTTTTT CTC	<i>antisense</i>
Rad14s <i>for</i>	Pho-AATGGCGCCGAAATGTATTGAATGT	<i>sense</i>
Rad14s <i>rev</i>	Pho-TCCCGTATTTTTTCTCCCTTCTGTG	<i>antisense</i>
Δ4CRad14s <i>for</i>	AGCGGCTCTTCAATGCTGGAAGTTCTGTT CCAGGGGCCAATGGCGCCGAAATGTATT GAATGTC	<i>sense</i>
Δ4CRad14s <i>rev</i>	AGCGGCTCTTCTCCCCCTTCTGTGAGCCT TTCCTC	<i>antisense</i>
Δ4CRad14s _{F262A} <i>for</i>	TTCGGGGACAGCGGCAAGAATGCAAC	<i>sense</i>
Δ4CRad14s _{F262A} <i>rev</i>	TGAGGGTTCGGCTTTTCTAG	<i>antisense</i>

DNA-Stränge, die für biochemische Versuche bzw. die Proteinkristallisation verwendet wurden, sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. AAF-dG und AF-dG geschädigte Oligonukleotide wurden von *Dr. Stefanie Schorr* und *Karola Gasteiger* synthetisiert. Cisplatin-enthaltene Stränge wurden von *Dr. Stefan Schiesser* und *Simon Geiger* vorbereitet. CPD- und (6-4)PP-enthaltende Oligonukleotide wurden von *Dr. Korbinian Heil* bereitgestellt und Fluor-modifizierte DNA wurde bei *Metabion* bestellt.

Tabelle 5.2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit unterschiedlichen DNA-Schäden. **G***: AAF-dG oder AF-dG, **GG**: 1,2-GG-Cisplatin, **X**: Fluo-dU, **YY**: CPD oder (6-4)PP.

ODN	Oligonukleotidsequenzen (5' → 3')	Länge	Anwendung
1	GCTCTACG*TCATCAC	15mer	Rad14 Kristallisation
2	TCTCTACGGTCATCAC	16mer	Rad14 Kristallisation
3	TCCTCTCTT X TTCTCTTCT	19mer	XPA Kristallisation
4	TCTCTC X CTCATCCAC	16mer	EMSA
5	TCCTCTCTTGGTTCTCTTCT	20mer	EMSA
6	ACAGCGGYGCAGGT	15mer	EMSA
7	TCTCTCG*CTCATCCAC	16mer	EMSA
8	GTAGCTAGGTCGATG* CACAGACATCGC ACACTGC	34mer	EMSA
9	TCCTCTCTT G *TTCTCTTCT	19mer	<i>Crosslinking</i> Versuch
10	TCTCTC X CTCATCCA	15mer	Fluoreszenzpolarisation
11	GCTGACAGATCAGAXCAATGACTAGCT GAG	30mer	Fluoreszenzpolarisation

5.1.3 Bakterien

In Tabelle 5.3 sind jene *E. coli* Stämme aufgeführt, welche für die Klonierung und Expression von Rad14 bzw. XPA verwendet wurden. TOP10 und NEB5 α wurden bei der Amplifizierung von Plasmiden verwendet. Für die Expression von Rad14 bzw. XPA wurde BL21(DE3), BL21(DE3)*pLysS*, B834(DE3)*pLysS* oder T7 Express verwendet. Diese *E. coli* Stämme sind Substämme der Spezies *E. coli* K12 und B834.

Tabelle 5.3: Verwendete Bakterien.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Firma
Top 10	F ⁻ , mcrA, Δ(mrr-hdsRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str ^R), endA1, nupG	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
NEB5α	fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	<i>NEB</i> , Frankfurt
BL21(DE3)	F ⁻ ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal, dcm, (DE3)	<i>Novagen</i> , Schwalbach
BL21(DE3) <i>pLysS</i>	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm, (DE3), <i>pLysS</i> , (Cam ^R)	<i>Novagen</i> , Schwalbach
B834(DE3) <i>pLysS</i>	F ⁻ ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm met (DE3), <i>pLysS</i> , (Cam ^R)	<i>Novagen</i> , Schwalbach
T7 Express	fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon]fpfu ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-- <i>TetS</i>)2 R(zgb-210::Tn10-- <i>TetS</i>) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10	<i>NEB</i> , Frankfurt

5.1.4 Enzyme

In Tabelle 5.4 sind alle in der Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 5.4: Verwendete Enzyme.

Enzym	Verwendung	Firma
<i>Phusion</i> [®] DNA Polymerase	Amplifikation von <i>xpa</i>	<i>Finnzymes</i> , Finnland
<i>Pfu Ultra</i> [™] DNA Polymerase	Amplifikation von <i>rad14</i>	<i>Finnzymes</i> , Finnland
<i>Q5</i> [™] Hot Start high fidelity Polymerase	Site directed mutagenesis von <i>rad14</i>	<i>NEB</i> , Frankfurt
<i>HindIII</i>	Restriktionsverdau	<i>NEB</i> , Frankfurt
<i>XbaI</i>	Restriktionsverdau	<i>NEB</i> , Frankfurt
<i>DpnI</i>	Verdau methylierter DNA	<i>NEB</i> , Frankfurt
BSA	Proteinstabilisierung	<i>NEB</i> , Frankfurt
Trypsin	Proteinverdau	<i>Promega</i> , Mannheim
Chymotrypsin	Proteinverdau	<i>Sigma</i> , Steinheim
Papain	Proteinverdau	<i>Applichem</i> , Darmstadt

5.1.5 Vektoren

Die verwendeten Vektoren, pENTRY-IBA10, pPSG-IBA3, pPSG-IBA43 und pPSG-IBA35 stammen aus der *StarGate*[®]-Technologie der Firma *IBA* aus Göttingen. Diese Vektoren enthalten für die jeweiligen Enzyme verschiedene Erkennungssequenzen sowie bestimmte Selektionskriterien wie z. B. Car^R, Kan^R. Unterschiedliche C- oder N-terminale Peptide (*tags*) ermöglichen es, das Protein anhand dieser *tags* gezielt aufzureinigen. In Tabelle 5.5 sind die verwendeten Vektoren sowie deren Verwendung angeführt.

Tabelle 5.5: Verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Größe	Resistenz	Affinitätstag	Verwendung
pOTB7	1815 bp	Cam	-	PCR von <i>xpa</i>
pENTRY- IBA10	1775 bp	Kan	-	Klonierung von <i>xpa</i> bzw. <i>rad14</i>
pPSG-IBA3	2806 bp	Car	C-terminaler Strep-tagII	Expression von XPAs bzw. Rad14s
pPSG-IBA43	2841 bp	Car	N-terminaler 6xHis-tag und C-terminaler Strep-tagII	Expression von XPAfl
pPSG-IBA35	2814 bp	Car	C-terminaler 6xHis-tag	Expression von Δ 4CRad14s

5.1.6 Medien und Puffer

5.1.6.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium: pH 7.5
 1% (w/v) Casein Pepton, tryptisch verdaut
 0.5% (w/v) Hefeextrakt
 1% (w/v) NaCl

Agar-Medium: 1.5% (w/v) Agar-Agar in LB-Medium
 0.1% (w/v) Antibiotika-Stammlösung (nach autoklavieren)

LeMaster Medium¹⁰⁵: Selenomethionin enthaltendes Medium
 Für die Zusammensetzung siehe Anhang

5.1.6.2 Lösungen zur Transformation von *E. coli*

1x TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.5
 1 mM EDTA

5.1.6.3 Agarosegel

TAE-Laufpuffer:	40 mM Tris-Acetat pH 8.3 2 mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O
TAE-Gelpuffer:	20 mM Tris pH 8.3 0.5 mM EDTA
DNA-Auftragspuffer:	50% (v/v) Glycerin
(in TAE gelöst)	0.2% (w/v) SDS 0.05% (w/v) Bromphenolblau 0.05% (w/v) Xylencyanol

5.1.6.4 Antibiotika

Carbenicillin	100 mg/mL in H ₂ O
Chloramphenicol	34 mg/mL in Ethanol
Kanamycin	50 mg/mL in H ₂ O

5.1.6.5 Plasmidpräparation

Puffer P1	50 mM Tris-HCl pH 8.0 10 mM EDTA 10 µg/mL RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat pH 5.5
Puffer EB	10 mM Tris-HCl pH 8.5

5.1.6.6 SDS-PAGE

10x SDS-Laufpuffer	0.25 M Tris 1.29 M Glycin 1% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	1.0 M Tris-HCl pH 6.8
Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
5x SDS-Auftragspuffer	160 mM Tris-HCl pH 6.8 8% (w/v) SDS 20% (w/v) Glycerin 10% (w/v) β -Mercaptoethanol 0.02% (w/v) Bromphenolblau 0.02% (w/v) Xylencyanol
Rotiphorese 30	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bisacrylamid
APS-Lösung	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS
Färbelösung	0.25% (w/v) Coomassie <i>Brilliant Blue</i> R 250 20% (v/v) HOAc 10% (v/v) EtOH
Entfärbelösung	20% (v/v) EtOH 10% (v/v) HOAc

5.1.6.7 Western Blot

BSN-Transferpuffer	50 mM Tris 40 mM Glycin 0.0375% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
TBS(T) Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl (0.1% (v/v) Tween 20)

5.1.6.8 Native PAGE

TBE-Puffer	98 mM Tris-HCl pH 8.0 2 mM EDTA 89 mM NaH ₂ BO ₃
Rotiphorese 30	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bisacrylamid
EMSA-Auftragspuffer	250 mM Tris-HCl pH 7.5 40% (v/v) Glycerin 0.2% (w/v) Bromphenolblau
Bindungspuffer	25 mM HEPES-KOH pH 8.3 100 mM KCl 10% (v/v) Glycerin 1 mM EDTA 1 mM DTT 45 µg/mL BSA
EMSA-Laufpuffer	0.25x TBE-Puffer

5.1.6.9 Proteinreinigung mit einer Strep-Tactin[®] Säule

Strep Puffer A 100 mM Tris-HCl pH 8.0
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA

Strep Puffer B Strep Puffer A
 2.5 mM Desthiobiotin

5.1.6.10 Proteinreinigung mit einer Ni-NTA-Säule

Ni-NTA Puffer A 25 mM Tris-HCl pH 7.5
 100 mM NaCl
 1 mM DTT
 10% (v/v) Glycerin
 10 μ M ZnCl₂
 20 mM Imidazol

Ni-NTA Puffer B Ni-NTA Puffer A
 500 mM Imidazol

5.1.6.11 Proteinreinigung mit einer Heparin-Säule

Heparin Puffer A 25 mM Tris-HCl pH 7.5
 50 mM NaCl
 1 mM DTT
 10% (v/v) Glycerin
 10 μ M ZnCl₂

Heparin Puffer B Heparin Puffer A
 1 M NaCl

5.1.6.12 Proteinreinigung mit einer MonoQ-Säule

MonoQ Puffer A 100 mM Tris-HCl pH 7.5
 100 mM NaCl
 5 mM DTT
 5% (v/v) Glycerin
 10 μ M ZnCl₂

MonoQ Puffer B MonoQ Puffer A
 600 mM NaCl

5.1.6.13 Kristallisation

Kristallisationspuffer 50 mM HEPES pH 8.0
 50 mM MgCl₂·6H₂O
 5 mM DTT
 5% (v/v) Glycerin
 10 μ M ZnCl₂

5.1.7 Protein- und DNA-Standards

In Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2 sind der Proteinstandard *SeeBlue*[®] Plus 2 von *Invitrogen*, der ungefärbte Proteinstandard *PageRuler*[™] von *Fermentas* sowie zwei DNA-Standards von *NEB* abgebildet.

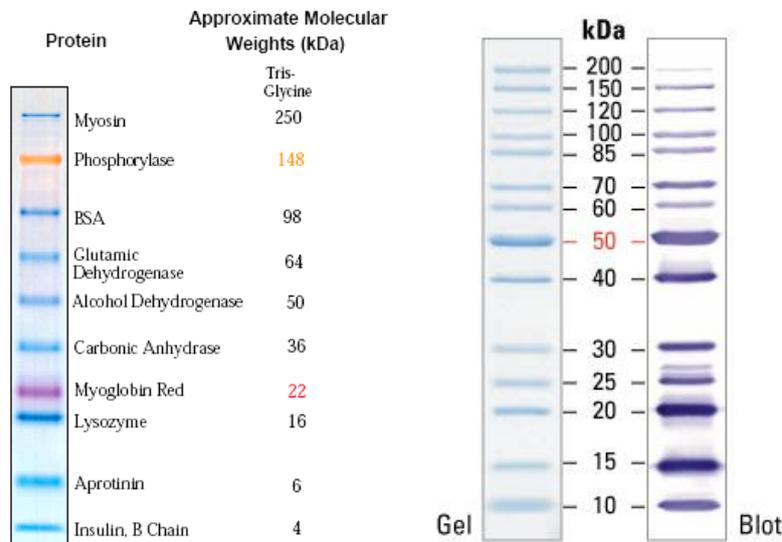


Abbildung 5.1: Proteinstandards. Links: *SeeBlue*[®] Plus 2. Rechts: *PageRuler*[™]

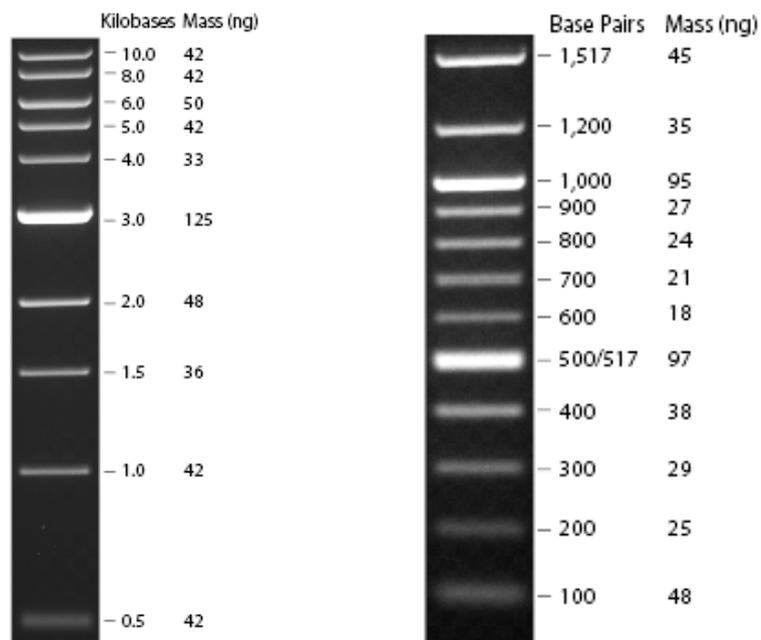


Abbildung 5.2: DNA-Standards. Links: 1 kb. Rechts: 100 bp

5.1.8 DNA-Isolations- und Präparationskits

In Tabelle 5.6 sind die verwendeten DNA-Isolations- und Präparationskits aufgeführt.

Tabelle 5.6: Verwendete Isolations- und Präparationskits.

Name	Verwendung	Firma
MinElute Gel Extraction Kit	Isolation rekombinanter DNA aus Agarosegelen	<i>Qiagen</i> , Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung der PCR-Reaktion	<i>Qiagen</i> , Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	<i>Qiagen</i> , Hilden
Q5 [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Einführung einer Punktmutation	<i>NEB</i> , Frankfurt
<i>StarGate</i> [®]	Klonierung	<i>IBA</i> , Göttingen

5.1.9 Geräte

In Tabelle 5.7 sind alle verwendeten Ausrüstungen und Geräte aufgelistet.

Tabelle 5.7: Verwendete Ausrüstungen und Geräte.

Gerät	Firma
Agarose Gelelektrophoresekammer	<i>Biorad</i> , München
Analysenwaage	<i>Sartorius</i> , Göttingen
ÄKTA Purifier Chromatographie System	<i>GE Healthcare</i> , München
Autoklav Vakulab S3000 V65	<i>Systec</i> , Gießen
Biofuge pico	<i>Heracore</i> , Hanau
BioPhotometer 6131	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
French Pressure Cell press	<i>Thermo</i> , Dreieich
Geldokumentationsgerät LAS3000	<i>Raytest</i> , Straubenhardt
Gelscanner IDA	<i>Raytest</i> , Straubenhardt
HPLC	<i>Waters</i> , Eschborn
Inkubator 1S	<i>Noctua</i> , Wiesloch
Inkubator 44R	<i>New Brunswick</i> , Nürtingen
MALDI-TOF Autoflex II-Spektrometer	<i>Bruker Daltonics</i> , Bremen
Mastercycler Personal	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Mini Protean 3 Cell	<i>Biorad</i> , München
Multicaster	<i>Biorad</i> , München
NanoDrop UV-Spektrometer	<i>Peqlab</i> , Erlangen
PCR Realplex	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
pH Meter MP220	<i>Mettler Toledo</i> , Gießen
Power Supply	<i>Biorad</i> , München
SDS Gelkammern	<i>Biorad</i> , München
Sorvall Zentrifuge, Evolution RC	<i>Thermo Life Science</i> , Dreieich
Speedvac	<i>Thermo Life Science</i> , Dreieich
Storm 860 TM	<i>GE Healthcare</i> , München
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
ThermoFluor Gerät, Mx3005P TM	<i>Stratagene</i> , Waldbronn
Tiefkühlschrank (- 86 °C)	<i>SANYO</i> , Bad Nenndorf
Tischzentrifuge 5415R	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Trans-Blotter, Semi-Dry	<i>Biorad</i> , München
Ultraschallbad	<i>Bandelin</i> , Berlin
Vortexer	<i>VWR</i> , Darmstadt
Wasserbad	<i>Labora</i> , Mannheim
Zentrifuge 5810R	<i>Eppendorf</i> , Hamburg

5.2 Methoden

5.2.1 Mikrobiologische Methoden

5.2.1.1 Bakterienkulturen

5.2.1.1.1 Anlegen einer Übernachtskultur von Bakterien

Für das Wachstum der Bakterien wurden Suspensionsschüttelkulturen (225 rpm) von 5 mL LB Medium in einem 13 mL Kulturröhrchen (*snap cap, Greiner*) bei 37 °C unter aeroben Bedingungen angesetzt. Die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums ermöglichte die Selektion resistenter Bakterienstämme. In Tabelle 5.8 sind die jeweiligen Endkonzentrationen der Antibiotika angegeben. Zur Inokulation wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von der Agar-Platte entnommen und in das LB Medium überführt.

Tabelle 5.8: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Kanamycin	50 mg/mL in ddH ₂ O	50 µg/mL
Carbenicillin	100 mg/mL in ddH ₂ O	100 µg/mL
Chloramphenicol	34 mg/mL in Ethanol	34 µg/mL

5.2.1.1.2 Bakterienplattenkulturen

Das Gießen der Platten erfolgte bei 55 °C mit LB-Medium und 15 g/L Agar. Das temperaturlabile Antibiotikum wurde dem Medium gemäß den Konzentrationen aus Tabelle 5.8 kurz vor dem Gießen zugegeben. Zum Animpfen der Platte wurde eine Bakteriensuspension auf den ausgehärteten Nährboden gegeben und mit einem Drygalski-Spatel gleichmäßig über die Platte verteilt. Nach einer Inkubation von 12 – 16 h bei 37 °C, erfolgte die Lagerung der Platten bei 4 °C.

5.2.1.1.3 Bakteriendauerkulturen

Für die Lagerung der Kulturen, wurden die Bakterien in einer Glycerinkultur aufbewahrt. Dazu wurden in einem Cryo-Röhrchen 850 µL Flüssigkultur mit 150 µL sterilem Glycerin versetzt, durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dies ermöglicht eine Lagerung der Kulturen bei -80 °C über mehrere Jahre.

5.2.1.2 Transformation von *E. coli*

5.2.1.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 500 mL Schüttelkultur mit einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.6 inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm, wurde das erhaltene Pellet in 100 mL eiskalter $CaCl_2$ -Lösung (50 mM) resuspendiert. Nach 90 minütiger Inkubation auf Eis, wurde erneut 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 20 mL eiskalter $CaCl_2$ -Lösung (50 mM) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Ein letzter Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min wurde durchgeführt und die Zellen in 2 mL eiskalter, sterilen Glycerin-Lösung (10%) resuspendiert. 100 µL Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

5.2.1.2.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die bei -80 °C gelagerten chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 1000 ng Plasmid-DNA versetzt und daraufhin 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2 minütigen Hitzeschock bei 37 °C erfolgte eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde 950 µL LB Medium zu den Zellen gegeben und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 5 minütigem Zentrifugieren (13000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C und die Lagerung bei 4 °C .

5.2.1.3 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

5.2.1.3.1 Proteinexpression von Rad14 und XPA

Nach erfolgreicher Transformation von Plasmid-DNA mit dem *rad14*- und *xpa*-Gen in einen *E. coli* Expressionsstamm (BL21(DE3) für XPAs und Rad14s bzw. BL21(DE3)*pLysS* für XPAfl) wurde eine 10 mL LB-Übernachtskultur mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt und mit jeweils einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurde zur Proteinreinigung 4 L LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika und der Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angesetzt und unter Schütteln (225 rpm) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion der Expression durch IPTG (1 mM). IPTG hat eine ähnliche Struktur wie Laktose und kann somit die Expression des *lac*-Operons induzieren. Es wird jedoch nicht von der β -Galaktosidase hydrolysiert und kann demzufolge vom Bakterium nicht metabolisiert werden, so dass die Konzentration während der Induktion konstant bleibt. Zusätzlich wurden ZnCl₂ (10 μ M) zugegeben, um den Aufbau des Zinkfingers im Enzym zu unterstützen. Es wurde 3 h bei 25 °C (bzw. 3 h bei 28 °C für XPA) unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C und 8000 rpm für 8 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden bei -20 °C gelagert.

5.2.1.3.2 Proteinexpression von Selenomethionin substituiertes Rad14

Zur Phasenbestimmung in der Röntgenstrukturanalyse wurde ein Selenomethionin Derivat von Rad14 hergestellt. Das Rad14s enthaltende Plasmid wurde in dem Methionin auxotrophen *E. coli* Stamm B834(DE3)*pLysS* transformiert. Die Expression erfolgte in Selenomethionin-enthaltenem *LeMaster*¹⁰⁵ Medium. Dafür wurden 10 mL in LB Medium angesetzte Übernachtskultur mit 100 μ g/mL Carbenicillin und 5 μ g/mL Chloramphenicol und einer Bakterienkolonie versetzt und in 1 L *LeMaster* Medium gegeben. Dieser wurde mit DL-Selenomethionin (50 mg/L) und den entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Da das *LeMaster* Medium ein Minimalmedium ist, dauerte die Inkubation bis zu 12 Stunden. Daraufhin folgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG (1 mM) und ZnCl₂ (10 μ M) bei 20 °C über Nacht.

Die Bakterien wurden dann bei 4 °C (8 min bei 8000 rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden bei –20 °C gelagert.

5.2.1.4 Aufschluss der Zellen mit der French Press

Die *French Press* dient sowohl zum Aufschluss von Bakterienzellen, als auch von Hefezellen. Für mittlere Expressionsansätze ist die *French Press* ein ideales Aufschlussgerät. Zuerst wurden die einzelnen Teile der *French Press* auf Eis vorgekühlt. Die Bakterienpellets wurden in dem entsprechenden Puffer A der verwendeten Säule (max. 35 mL) und einer Protease Inhibitor *Complete*[®] Tablette EDTA-frei (*Roche*) resuspendiert und in den eisgekühlten Zylinder der *French Press* gegeben. Der Aufschluss erfolgte bei einem maximalen Druck von 1500 psi in dem der Stempel nach unten gedrückt wurde. So trafen die Zellen auf einen Zapfen und zerplatzten dort durch auftretende Scherkräfte. Mit Hilfe eines Ventils wurden die aufgeschlossenen Zellen aufgefangen und auf Eis gelagert. Ein erfolgreicher Aufschluss konnte an einer am Boden fast klaren Suspension erkannt werden, oftmals bei 6- bis 7-facher Wiederholung des Vorganges. Nach Pelletierung der Suspension bei 18000 rpm für 30 min bei 4 °C wurde durch Affinitätschromatographie des Überstands, der die löslichen Proteine enthielt, das gewünschte Protein aufgereinigt.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 DNA-Isolierung

5.2.2.1.1 Mini-Plasmidpräparation von *E. coli*

Für die schnelle Isolierung kleiner Plasmid-DNA Mengen, wurde nach dem *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*) verfahren. Die 5 mL Übernachtskultur wurde bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 250 µL Puffer P1 mit RNase A resuspendiert und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse wurden 250 µL Puffer P2 zugegeben und 4-mal invertiert. Nach 5 min wurde mit 350 µL Puffer P3 neutralisiert. Anschließend wurde wiederum 4-mal invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand auf eine *HiBind*[®] DNA Säule gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA an die Säule zu binden. Die gebundene

DNA wurde mit Waschpuffer (750 μ L) gewaschen und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Ethanol wurde der Durchfluss verworfen und die Säule erneut bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden 50 μ L Elutionspuffer (Puffer EB) auf die Säule gegeben und erneut 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die gewünschte Plasmid-DNA.

5.2.2.1.2 DNA-Isolierung aus einem Agarosegel

Zur Isolierung der gewünschten DNA, wurde die DNA-Bande mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde nach dem *QIAquick PCR Purification Kit* Verfahren (*Qiagen*) vorgegangen. Das fünffache Volumen an Puffer PBI wurde zu einem Volumen des Gels (100 mg \sim 100 μ L) zugegeben und es wurde mehrmals invertiert. Anschließend wurde die Lösung in eine *QIAquick spin* Säule, deren Inhalt in einem Reaktionsgefäß aufgefangen wurde, gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das ermöglichte das Binden der DNA an die Säule. Der Durchfluss wurde verworfen und die DNA mit 750 μ L Waschpuffer gewaschen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde nach Entfernen des Durchflusses wiederholt, um die DNA von restlichem Ethanol zu befreien. Die DNA wurde mit 50 μ L Elutionspuffer (Puffer EB) 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Elution 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop Spektrometer bestimmt.

5.2.2.1.3 Entsalzen von Oligonukleotiden mittels Sep-Pak

Zur Entsalzung von Oligonukleotiden wurden C18 Sep-Pak Säulen von *Waters* verwendet. Die Säule wurde zuerst durch langsames Durchdrücken von 5 – 10 mL Acetonitril konditioniert. Dann wurde sie mit 20 mL ddH₂O gespült und durch Luftdurchdrücken getrocknet. Anschließend konnte die DNA-Lösung (maximal 1 mL) langsam (1 mL/min) auf die Säule gegeben werden und durch Nachwaschen mit 5 mL ddH₂O von dem Salz befreit werden. Die Elution erfolgte mit 5 mL eines Gemisches aus 80:20 Acetonitril:ddH₂O.

5.2.2.1.4 Reinigung von Oligonukleotiden mittels HPLC

Die Aufreinigung von selbst synthetisierten (durch Karola Gasteiger und Simon Geiger) oder gekauften Oligonukleotiden erfolgte über *reversed phase* HPL Chromatographie auf eine Nucleodur 120-5 (präparativ) oder 120-3 (analytisch) C18 Säule (*Macherey – Nagel*). Die in Wasser gelöste DNA wurde in Puffer A (0.1 M TEAA pH 7.0 in Wasser) auf die Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 25% Puffer B (0.1 M TEAA pH 7.0 in 80% Acetonitril) in 45 min bei einer Flussrate von 5 mL/min eluiert. Weitere Charakterisierung erfolgte über MALDI-TOF Analyse.

5.2.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurde mit dem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 von der Firma *Peqlab* Biotechnologie GmbH gearbeitet. Durch das Absorptionsmaximum der Basen bei 260 nm kann zur Mengenbestimmung an DNA folgende Beziehung erstellt werden:

$$A_{260} - \text{Einheit} = 50 \mu\text{g/mL dsDNA} = 33 \mu\text{g/mL ssDNA} = 40 \mu\text{g/mL in H}_2\text{O}$$

Aromatische Aminosäuren eines Proteins absorbieren bei 280 nm, so dass aus dem Verhältnis 260nm/280nm die Verunreinigung der DNA mit Protein und somit deren Reinheit festgestellt werden kann. Man kann von reiner DNA sprechen, wenn dieser Wert zwischen 1.8 – 2.0 liegt, schwankt er, so liegen Verunreinigungen z. B. durch Proteine vor.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Gerät zunächst mit 1.5 μL ddH₂O kalibriert, dann mit dem Puffer, indem sich die zu messende DNA befand, bzw. ddH₂O (1.5 μL) eine Leerwertmessung durchgeführt. Anschließend konnte mit einem Probenvolumen von 1.5 μL die entsprechende Konzentration gemessen werden.

5.2.2.1.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäure-Stränge von 0.1 bis 25 kb nach ihrer Größe und Konformation aufzutrennen. Durch Vergleich der Laufstrecke mit DNA-Strängen bekannter Länge (DNA-Standards) im Gel, kann die

Größe der Fragmente bestimmt werden. Bei einer angelegten Spannung von 90 V wandert die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Elektrode (Anode), wobei die Agarosepolymere ihre Laufgeschwindigkeit beeinflussen. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller als größere. Zur Detektion der DNA-Banden wird eine Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/mL in ddH₂O) vor dem Gießen zu der Agarose-Lösung zugegeben. Das Reagenz interkaliert zwischen den Basenpaaren von doppelsträngiger DNA und erzeugt eine Fluoreszenz der DNA-haltigen Gelbereiche bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ($\lambda_{\text{abs}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$). Je nach Fragmentlänge des Nukleinsäure-Stranges kann eine unterschiedliche Konzentration an Agarose eingesetzt werden (Tabelle 5.9). Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die verwendeten DNA Größen- und Massenstandards sind in Abbildung 5.2 dargestellt.

Tabelle 5.9: Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit der DNA-Länge.

Agarosekonzentration	Fragmentlänge
0.8%	ab 6 kb
1.0%	0.5 bis 6 kb
2.0%	0.1 bis 2 kb

5.2.2.2 Primer-Design

Die Primer wurden so gewählt, dass sie mit etwa 25 Basen an das Templat binden, wobei beachtet wurde, dass beide Primer ähnliche Schmelztemperaturen besitzen (50 – 60 °C). Ebenso wurde auf einen ausgeglichenen dA/dT- und dG/dC-Gehalt geachtet und dass sich vor allem am 3'-Ende der Primer keine Haarnadelstrukturen ausbilden. Die *Phusion*[®] DNA Polymerase sorgt für eine fehlerfreie Synthese der DNA-Sequenz, ihr Temperaturoptimum liegt bei 72 °C und sie besitzt eine Fehlerrate von 4.4×10^{-7} .¹⁰⁶ Die Primer für die ortsspezifische Mutagenese von Rad14s wurden über das Programm *NEBaseChanger*[™] (*NEB*) errechnet. Sie sollten nicht überlappend sein und sich jeweils am 5'-Ende treffen. Nur einer der beiden Primer enthält die Mutation.

5.2.2.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt eine Alternative zur Methode der Klonierung dar und ermöglicht spezifische DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch direkt zu amplifizieren. Durch Verwendung von zwei kurzen Oligonukleotiden, den Primern, die komplementär zur Templat-DNA sind, kann eine enzymatische Duplikation der DNA-Sequenz stattfinden. Es kommt zunächst zu einer Denaturierung des Doppelstrangs bei 98 °C. Durch Senken der Temperatur auf 51 – 61 °C, können sich die Primer, die in höherer Konzentration vorliegen, mit den entstandenen DNA-Einzelsträngen hybridisieren (*Annealing*-Temperatur T_m). Durch Zugabe von Triphosphaten und einer thermophilen DNA-Polymerase, beginnt die Synthese in 5' → 3'-Richtung komplementärer Sequenz zu der Templat-DNA (*Extension*) bei 72 °C. Die Primer müssen so orientiert sein, dass die Synthese der DNA-Moleküle aufeinander zuläuft. Durch wiederholte Zyklen (25 – 30), kann eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnitts erzielt werden. Das Erlangen des gewünschten PCR-Produkts ist stark abhängig von der Konzentration des eingesetzten Templats. Standardmäßig wird mit drei verschiedenen Mengen gearbeitet (10 – 100 ng). In Tabelle 5.10 ist der Ansatz für die PCR angegeben.¹⁰⁷

Tabelle 5.10: Ansatz einer PCR Reaktion.

Reagenzien	Menge
ddH ₂ O	50 - x µL
5x HF Puffer	10 µL
DNA-Templat	x µL
dNTPs (10mM)	1 µL
Primer <i>for</i> (10 mM)	2.5 µL
Primer <i>rev</i> (10 mM)	2.5 µL
<i>Phusion</i> [®] DNA Polymerase	0.5 µL
Gesamt	50 µL

Das PCR-Programm wurde nach folgendem Schema (Tabelle 5.11) entwickelt:

Tabelle 5.11: Schema für das PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit/ min	Funktion
1	98 °C	5.00	DNA-Denaturierung
2	98 °C	0.30	DNA-Denaturierung
3	($T_m + 3$) °C	0.30	Primer- <i>Annealing</i>
4	72 °C	0.10/kb	<i>Extension</i> durch Polymerase
5		25x	Zyklus-Wiederholung (2 – 4)
6	72 °C	7.00	<i>Extension</i> durch Polymerase
7	4 °C	Hold	Ende

Dabei führen die Schritte 1 bis 6 zur spezifischen Bindung des Primers und zur *Extension*. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* von *Qiagen* aufgereinigt.

5.2.2.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Um gezielt Mutationen in Nukleinsäuren einzuführen, verwendet man die Polymerase Kettenreaktion. Diese kann durch zyklische Neusynthese und Amplifikation sowohl Insertionen, Deletionen als auch Substitutionen einzelner Basenpaare erzeugen. Auch die gleichzeitige Mutation von mehreren benachbarten Basen ist möglich. Die benötigten Primer sollten nicht überlappen und treffen sich jeweils an ihrem 5'-Ende. Sie sollten 20 – 40 bp lang sein und einen idealen GC-Gehalt von 40 – 60 % aufweisen. Nur einer der beiden Primer enthält die gewünschte Mutation. Durch Binden der Primer an die komplementären Stränge der Templat-DNA und Strandverlängerung mit der *Q5TM Hot Start High Fidelity* Polymerase von NEB werden Amplifikationsprodukte erzeugt, die an der gewünschten Stelle die eingeführte Mutation enthalten. Tabelle 5.12 gibt das Pipettierschema der PCR-Reaktion zur ortsspezifischen Mutagenese an.

Tabelle 5.12: Ansatz der PCR zur ortsspezifischen Mutagenese.

Reagenzien	Menge
ddH ₂ O	15.75 µL
5x Q5 Reaktionspuffer	5 µL
DNA-Templat (40 ng/µL)	1 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 µL
Primer <i>for</i> (10 mM)	1.25 µL
Primer <i>rev</i> (10 mM)	1.25 µL
<i>Q5TM Hot Start High-Fidelity Polymerase</i>	0.25 µL
Gesamt	25 µL

Das Programm der ortsgerichteten Mutagenese wurde nach folgendem Schema (Tabelle 5.13) entwickelt:

Tabelle 5.13: Schema für das Programm der ortsgerichteten Mutagenese.

Schritt	Temperatur	Zeit/ min	Funktion
1	98 °C	2.00	DNA-Denaturierung
2	98 °C	0.10	DNA-Denaturierung
3	62 °C	0.30	Primer- <i>Annealing</i>
4	72 °C	0.30/kb	<i>Extension</i> durch Polymerase
5		25x	Zyklus-Wiederholung (2 – 4)
6	72 °C	5.00	<i>Extension</i> durch Polymerase
7	4 °C	Hold	Ende

5.2.2.5 KLD-Reaktion

Nach Überprüfung der erfolgten PCR mittels Agarosegel wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen aufgereinigt. Das lineare Fragment wurde mit Hilfe der KLD Reaktion zyklisiert und verdaut. Durch Zugabe der Kinase (K) wurden die 5'-Enden des PCR-Produktes phosphoryliert und konnten durch die Ligase (L) verknüpft werden. Weiterhin musste die eingesetzte, methylierte Templat-DNA von der amplifizierten, mutierten DNA abgetrennt werden. Dafür kam das Enzym *DpnI* (D) zum

Einsatz, welches ein methylierungssensitives Restriktionsenzym ist und somit die Templat-DNA degradiert. Das Ansetzen der KLD-Reaktion ist in Tabelle 5.14 angegeben. Für die Reaktion wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid DNA in chemisch kompetente NEB5 α Zellen transformiert.

Tabelle 5.14: Ansatz der KLD Reaktion.

Reagenzien	Menge
ddH ₂ O	3 μ L
PCR Produkt	1 μ L
2x KLD Reaktionspuffer	5 μ L
10x KLD Enzym Mix	1 μ L
Gesamt	10 μ L

5.2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsanalyse ist eine wichtige Methode in der Nukleinsäureanalytik. Sie dient zur Identifizierung, Charakterisierung und Isolierung von dsDNA, meist von Klonierungsprodukten. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs. Sie spalten hydrolytisch die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls und unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus (Restriktionsenzymen I, II, und III). Durch die Spaltung der DNA an spezifischen Erkennungsstellen entstehen charakteristische Restriktionsfragmente verschiedener Längen, die in einem Agarosegel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. In der Molekularbiologie werden fast nur Restriktionsenzyme des Typs II eingesetzt, da diese an palindromischen Sequenzen schneiden und die Erkennungssequenz nahe der Spaltstelle liegt. Typ II Endonukleasen schneiden dsDNA indem sie glatte Enden (*blunt ends*) oder Überhänge (*sticky ends*) ausbilden. Für einen Restriktionsansatz wurde die DNA mit 0.2 μ L (4 U) des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 10 μ L eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei der optimalen Temperatur des Enzyms (37 °C) für 2 h. Die erfolgreiche Restriktion wurde mit einem Agarosegel überprüft. In folgender Tabelle sind die verwendeten Restriktionsenzyme aufgelistet.¹⁰⁶

Tabelle 5.15: Bei dem Verdau eingesetzte Restriktionsenzyme. Die Spaltstelle ist durch / gekennzeichnet.

Restriktionsenzym	Erkennungsspaltstelle	Ursprungsorganismus
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	<i>Xanthomonas badrii</i>

5.2.2.7 Klonierung mittels *StarGate*[®]-Technologie

Die *StarGate*[®]-Technologie erlaubt die Kombination verschiedener Promotoren und weiterer genetischer Elemente mit dem gewünschten Gen in einem Klonierungssystem. Durch die *StarCombinase*[™] kann die Klonierung vielseitig, schnell und einfach durchgeführt werden. Das durch PCR vervielfältigte Gen wird zunächst in einen Donorvektor eingefügt, und kann durch Transfer in einen Akzeptorvektor mit vielen verschiedenen genetischen Umgebungen fusionieren und somit unterschiedliche Ziel-Vektoren ergeben. Dies ermöglicht die Expression des Proteins mit diversen Eigenschaften (zum Beispiel unterschiedlichen *tags*) in verschiedenen Wirtszellen. Vorteilhaft bei der *StarGate*[®]-Technologie ist die minimale Modifikation des erwünschten Gens, eine hohe Klonierungseffizienz und die Möglichkeit das gewünschte Gen in Destinationsvektoren mit unterschiedlichen Bedingungen zu integrieren.¹⁰⁸

Als erster Schritt muss das gewünschte Gen an beiden Enden mit 4 Basen (5'-AATG und 3'-TCCC) versehen werden, da diese als wichtige Rekombinationssequenzen für den Transfer des Gens in den *Entry* bzw. Akzeptorvektor dienen. Dies geschieht während der PCR, in der diese Rekombinationssequenzen sowie das Startkodon (ATG) am 5'-Ende des Gens, durch die Primer vermittelt werden. Als zweiter Schritt kann durch eine einfache Reaktion das vervielfältigte Gen mit Hilfe der *StarCombinase*[™] in einen *Entry* Vektor (Kanamycin-Resistenz) transformiert werden, wodurch der Donorvektor entsteht. Die erfolgreiche Insertion des gewünschten Gens in den Donorvektor kann durch Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* überprüft werden. Nach Bestätigung der Sequenz des Donorvektors dient dieser als Ausgangsvektor für den Transfer des gewünschten Gens in eine Vielzahl von Akzeptorvektoren, die jeweils eine unterschiedliche genetische Umgebung für das Gen verschaffen. Dazu wird ein Akzeptorvektor mit dem Donorvektor inkubiert in Anwesenheit der *StarCombinase*[™] und anschließend in *E. coli* Zellen transformiert. Zur

Überprüfung des erwünschten Destinationsvektors, kann man auch hier eine Restriktionsanalyse mit *HindIII* und *XbaI* durchführen.

5.2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde durch die Firma *GATC* (Konstanz) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen konnten mit dem Programm *Blast-Align* (bl2seq)¹⁰⁹ auf Übereinstimmung mit der theoretischen Sequenz überprüft werden.

5.2.2.9 Hybridisierung von komplementären Strängen

Für die Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Stränge wurden die äquimolaren Mengen an Oligonukleotiden zusammen gegeben und das Reaktionsgefäß in einem Thermocycler auf 95 °C erhitzt und 1 °C/min abgekühlt.

5.2.2.10 Schmelzpunktbestimmung von Oligonukleotiden

Die Schmelzpunktbestimmungen von Oligonukleotiden wurden von Karola Gasteiger durchgeführt. Schmelzkurven von DNA-Doppelsträngen wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit einer Temperaturkontrolle, eine Transporteinheit und einem *MultiCellBlock* gemessen. Bei einem Temperaturgradienten von 0.5 °C/min wurden pro Messung je fünf Abkühlkurven (85 °C – 10 °C) und fünf Aufheizkurven (10 °C – 85 °C) bei 260 nm und 420 nm aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte in einer Referenzküvette. Während der gesamten Messung wurde der Probenraum mit Stickstoff gespült, um ein Beschlagen der Küvetten bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Es wurden Küvetten mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang (*Hellma*) verwendet. Für die Messung wurde dsDNA (1 – 7 µM) in 200 µL DNA Puffer (150 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl pH 7.4) angelöst. Der Küvetteninhalt wurde mit Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe von *Microcal Origin*. Die bei 260 nm erhaltenen Kurven wurden gemittelt und hiervon die gemittelte Hintergrundmessung bei 420 nm subtrahiert. Die so erzeugte Kurve wurde durch ein Polynom approximiert, die Nullstelle der 2. Ableitung der Näherungsfunktion entsprach

dem gesuchten Schmelzpunkt. Es wurden jeweils drei Schmelzkurven von sechs verschiedenen Konzentrationen gemessen. Die Enthalpie (ΔH°) und die Entropie (ΔS°) wurden mit Hilfe eines bereits bekannten Protokolls berechnet.^{110,111} Der Van't Hoff Plot von T_m^{-1} gegen $\ln(C_t)$ wurde auf folgende Gleichung angepasst $T_m^{-1} = R/\Delta H^\circ \ln(C_t/4) + \Delta S^\circ/\Delta H^\circ$, wobei T_m der Schmelzübergangspunkt in K ist, C_t die gesamte Duplex Konzentration und R die universelle Gaskonstante (1.978 cal/Kmol); $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - \Delta S^\circ$. Die angegebenen Enthalpie und Entropie-Werte sind Mittelwerte und die Fehlerberechnungen ergaben die Standardabweichungen für die Daten. Die freie Gibbs Energie (ΔG°) der Duplexbildung wurde anschließend mit Hilfe dieser Werte berechnet.

5.2.3 Proteinchemische Methoden

5.2.3.1 Strep-Tactin[®] Affinitätschromatographie

Gewünschte Proteine können genetisch mit dem Strep-tagII (WSHPQFEK) versehen werden und mittels Affinitätschromatographie unter nahezu physiologischen Bedingungen von anderen Proteinen getrennt werden. Der Strep-tagII zeigt eine hohe Bindungsaffinität zu Strep-Tactin, welches an der Matrix der Säule gebunden ist. Abbildung 5.3 zeigt schematisch den Ablauf der Affinitätschromatographie.

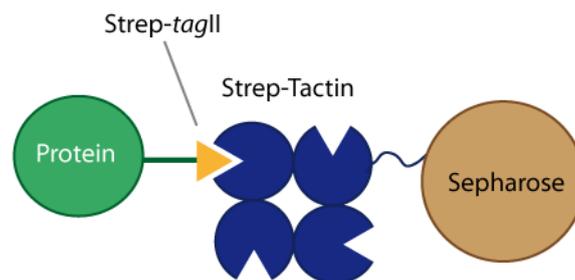


Abbildung 5.3: Interaktion eines mit Strep-tagII fusionierten Proteins mit Strep-Tactin[®].

Für die Elution des Proteins von der Säule wurde Desthiobiotin (2.5 mM) verwendet. Diese Substanz konkurriert kompetitiv mit dem gebundenen Protein und verdrängt dieses von der Säule. Vor Verwendung der *Strep-Tactin Superflow* 5 mL Säule (IBA) musste diese mit 75 mL Regenerationspuffer (HABA 1:10) regeneriert werden, um das gebundene Desthiobiotin vollständig zu eluieren. Eine erfolgreiche Regeneration der Säule konnte an

dem Farbumschlag von farblos zu orange erkannt werden. Die Säule wurde an das FPLC-System (ÄKTA) angeschlossen und die zu reinigende Proteinlösung wurde in den 50 mL *Super-Loop* gegeben und ebenfalls an die ÄKTA angeschlossen. Zum Equilibrieren der Säule wurde zunächst mit 5 Säulenvolumina Strep Puffer A gewaschen, anschließend konnte die Probe auf die Säule aufgetragen werden. Das spezifisch gebundene Protein wurde mit Strep Puffer B bei einer Flussrate von 1 mL/min eluiert und in 1 mL Fraktionen gesammelt. Um die Denaturierung und Degradation der Proteine zu vermeiden, wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt. Die Protein enthaltenden Fraktionen konnten mittels SDS-PAGE identifiziert werden und wurden nach Vereinigung mittels Ultrafiltration (*Amicon* Röhrchen, *Millipore*) aufkonzentriert.

5.2.3.2 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Metallchelatchromatographie wird häufig bei der Isolierung heterolog exprimierter Proteine verwendet. Sie zeichnet sich durch eine besonders hohe Bindungskapazität aus. An eine Agarosematrix werden metallchelatierende Gruppen wie z. B. Nitriooessigsäure (NTA) immobilisiert, an welche Ni^{2+} -Ionen gebunden sind. Das Protein wird C- oder N-terminal mit einer Polyhistidin-Sequenz versehen (*6xHis-tag*). Der daraus resultierende oktaedrische Komplex mit dem Trägermaterial und Wasser-Molekülen kann einen stabilen Chelat-Komplex mit Histidinen bilden. Die Elution des Proteins erfolgt mit Hilfe von freiem Imidazol, welches kompetitiv um die Bindungsstellen des Ni^{2+} -Ions konkurriert und das Histidin verdrängt. Alternativ kann auch der pH-Wert verringert werden, was zur Protonierung des Imidazol-Rings im Histidin führt. Zur Proteinreinigung wurde das Zellysate über einen *Super-Loop* auf eine *HiTrap* Ni-NTA 5 mL HP-Säule (*GE Healthcare*) in NTA Puffer A mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Um das Binden von unspezifischen Proteinen zu unterdrücken, enthielt der Auftragspuffer 20 mM Imidazol. Es wurde mit 5 Säulenvolumina gewaschen und das Protein anschließend mit einem linearen Gradienten (100% in 30 min) an Ni-NTA Puffer B (500 mM Imidazol) von der Säule eluiert. Protein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert.

5.2.3.3 Heparin Affinitätschromatographie

XPA zeigt trotz seines negativen isoelektrischen Punktes eine starke DNA-Bindungsaffinität und kann somit in einem weiteren Reinigungsschritt über eine Heparinsäule (Affinitätschromatographie) aufgereinigt werden. Heparin weist DNA-ähnliche Struktureigenschaften auf und kann diese dadurch imitieren.¹¹² Diese Eigenschaft wird genutzt, um das Fusionsprotein von genomischer *E. coli* DNA zu befreien. Die Proteinlösung wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 mL/min auf die mit 5 Säulenvolumina XPA Heparin Puffer A equilibrierte *HiTrap* Heparin HP-Säule (1 mL) gegeben. Es wurde mit 5 Säulenvolumina Heparin Puffer A gewaschen und anschließend das Protein mit einem Konzentrationsgradienten von 100% Heparin Puffer B (1M NaCl) in einem Zeitraum von 30 min bei einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Die Protein-enthaltenden Fraktionen konnten anhand der UV-Spur des FPLC-Chromatogramms detektiert werden und erneut vereinigt und eingeeengt werden. Da das Protein sich in einem Hochsalzpuffer befand, musste es in Heparin Puffer A umgepuffert werden. Die erfolgreiche Aufreinigung des Proteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Bei einer Konzentration von 10 mg/mL wurde das Protein schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.3.4 Anionenaustauschchromatographie

Die *MonoQ*-Säule kann durch ihr positiv geladenes Säulenmaterial negativ geladene Proteine binden. Das Rad14s Protein hat bei einem pH-Wert von 7.5 eine negative Gesamtladung (-5.3). Somit bindet das Protein an die Säule und kann von Verunreinigungen abgetrennt werden. Nach Equilibrieren der 1 mL Säule (*GE Healthcare*) mit 5 Säulenvolumina *MonoQ* Puffer A erfolgte die Injektion der Probe mit Hilfe einer Spritze über den 500 μL Loop. Das Protein wurde mit einem Konzentrationsgradienten von 100% *MonoQ* Puffer B in einem Zeitraum von 30 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min eluiert. Die Rad14s enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, in einem *Amicon Ultra* Zentrifugenfilter aufkonzentriert und in *MonoQ* Puffer A umgepuffert.

5.2.3.5 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie oder Größenausschlusschromatographie kann verwendet werden, um mögliche Aggregate und restliche Verunreinigungen zu entfernen. Diese Aufreinigungsmethode wird bei Proteinen, die zur Kristallisation dienen, standardmäßig durchgeführt. Der Trennungseffekt beruht auf unterschiedliche Diffusionsvolumina für unterschiedlich große Moleküle. Die stationäre Phase besteht aus porösen und stark hydratisierenden Kügelchen aus einem Polymer (z. B. Agarose), in die kleinere Moleküle eindringen können. Durch das Eindringen kleiner Moleküle in die Hohlräume der stationären Phase, verlängert sich deren Retentionszeit. Größere Proteine eluieren demnach als erstes von der Säule. Je geringer das Volumen der eingesetzten Probe, desto besser ist die Auflösung. Es wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade* Säule (*GE Healthcare*) verwendet und in Rad14 MonoQ Puffer A bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min eluiert. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, eingeeengt und in Kristallisationspuffer umgepuffert. Nach Überprüfung der Reinheit des Proteins mittels SDS-PAGE, wurde das Rad14s-His Protein mit einer Konzentration von 5 mg/mL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.3.6 Übersicht der verschiedenen Chromatographieschritte

In Tabelle 5.16 sind die allgemeinen Aufreinigungsschritte der verschiedenen Proteine, die in dieser Arbeit isoliert wurden, zusammengefasst.

Tabelle 5.16: Verschiedene Chromatographieschritte zur Reinigung der in dieser Arbeit isolierten Proteine.

Protein	Verwendete Chromatographieschritte
XPAfl	1. Strep-Tactin [®] Affinitätschromatographie 2. Ni-NTA Affinitätschromatographie 3. Heparin Ionenaustauschchromatographie
XPAs	1. Strep-Tactin [®] Affinitätschromatographie 2. Heparin Ionenaustauschchromatographie
Rad14s	1. Strep-Tactin [®] Affinitätschromatographie 2. MonoQ Anionenaustauschchromatographie
Δ 4CRad14s Δ 4CRad14s _{F262A}	1. Ni-NTA Affinitätschromatographie 2. MonoQ Anionenaustauschchromatographie 3. Gelfiltration HiLoad 16/60 Superdex 75

5.2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin haben bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum. Sind diese drei Aminosäuren statistisch im Protein verteilt, entspricht eine Absorptionseinheit bei 280 nm einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL. Bei bekannter Aminosäure-Sequenz kann die genaue Proteinkonzentration durch Multiplikation des Extinktionswertes mit dem jeweiligen Extinktionsfaktor des Proteins bestimmt werden. Die Messung erfolgte am NanoDrop Spektrophotometer ND-100 von der Firma *Peqlab Biotechnologie GmbH* (Erlangen) analog der DNA-Konzentrationsbestimmung.

5.2.3.8 Konzentrierung der Proteinlösung

Nach Aufreinigung des Proteins wurden die vereinigten Fraktionen mit Hilfe des *Amicon Ultra 15 (Millipore)* Zentrifugenfilters, der eine Ausschlussgröße von 30 bzw. 10 kDa hat,

aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde hierbei während einer Zentrifugation bei 4000 rpm bei 4 °C durch eine semipermeable Membran gedrückt, bis ein Restvolumen von etwa 500 µL zurückblieb.

5.2.3.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS ist ein anionisches Detergens, das die Eigenladung von Proteinen effektiv überdecken kann. So erhält man eine konstante negative Ladung pro Masseneinheit: ca. 1.4 g SDS pro 1 g Protein.¹¹³ Durch Erhitzen (5 min) der Proben mit SDS bei 95 °C, werden Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen des Proteins zerstört, so dass man lineare, negativ geladene Polypeptidketten erhält. Weiterhin können Disulfidbrücken durch Reduzierung (DTT, β-Mercaptoethanol) gespalten werden. Diese Methode ermöglicht es, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wobei kleinere Proteine schneller in Richtung Anode wandern als große Proteine. Mit Hilfe von Standards können die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden. Zur Trennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese angewendet. Die dazu verwendete Gelmatrix ist in zwei Bereiche geteilt: das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Mit Hilfe von unterschiedlichen Puffersystemen in den jeweiligen Bereichen werden die Proteine im Sammelgel zu schärferen Banden zusammen geschoben, um im Trenngel eine bessere Auftrennung zu ermöglichen.¹⁰⁶ Die SDS-PAGE wurden gemäß den Angaben in Tabelle 5.17 gegossen.

Tabelle 5.17: Anleitung zum Gießen von 2 SDS-Gelen.

Reagenzien	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O	3.3 mL	2.3 mL	2.1 mL
Rotiphorese 30	4.0 mL	5.0 mL	500 µL
Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	-
Tris-HCl pH 6.8	-	-	0.38 mL
SDS-Lsg. (10%)	100 µL	100 µL	30 µL
APS-Lsg. (10%)	100 µL	100 µL	30 µL
TEMED	40 µL	40 µL	3 µL

Ammoniumpersulfat (APS) dient als Radikalstarter und das Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator der Polymerisationsreaktion. Durch radikalische Polymerisation der Acrylamidmonomere mit dem Bisacrylamid als Quervernetzer entsteht das Gel nach etwa 1 h. Gele können begrenzte Zeit in feuchten Tüchern bei 4 °C gelagert oder sofort eingesetzt werden. Nach dem Aufkochen der Proben mit SDS-Auftragspuffer (5 min, 95 °C), wurden jeweils 10 µL in die Taschen aufgetragen und in 1× SDS-Laufpuffer das Gel bei 150 V bis zum Auslaufen des Bromphenolblaus laufen gelassen.

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden im Gel wurde Coomassie Brilliant Blau R-250 verwendet. Dieser Farbstoff bildet einen stabilen Komplex mit den Proteinen, der bei 465 nm sein Absorptionsmaximum hat. Das Gel wurde zuerst mit Färbelösung bedeckt, dann in Entfärbelösung gegeben und anschließend unter Schwenken bis zum Erscheinen der Banden entfärbt.

5.2.3.10 Western Blot

Der Western Blot dient zur Detektion und Identifikation spezifischer Proteine in Proteingemischen. Nach einer SDS-PAGE werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und fixiert. Die Proteine können anschließend durch Markierung mit einem primären bzw. sekundären Antikörper nachgewiesen werden.

Zunächst wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach 30 minütiger Inkubation des Gels in BSN-Transferpuffer wurden die Proteine über ein elektrisches Feld in einem Semi-Dry-Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer angepassten Stromstärke von 5 mA/cm² Gelfläche. Während dem 30 minütigem Übertragen auf die Membran musste darauf geachtet werden, dass die Spannung nicht über 15 V anstieg. Durch *Ponceau S* Färbung konnte ein erfolgreicher Transfer der Proteine auf die Membran nachgewiesen werden. Dieser rote Farbstoff färbt Proteine reversibel und kann durch Abwaschen mit Wasser wieder entfernt werden. Freie Bindungsstellen wurden mithilfe von BSA (3% in TBST Puffer) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach Waschen der Membran mit TBST Puffer konnte diese mit einer Antikörperlösung behandelt werden. Diese

indirekte Nachweismethode ermöglicht es z. B. Strep-tag versehene Proteine auf der Membran sichtbar zu machen. Hierzu wurde ein Strep-Tactin[®]-HRP konjugierter Antikörper (IBA) verwendet (1:2000 in TBST Puffer). HRP (*horseradish peroxidase*) kann durch Chemolumineszenz mit Luminol sichtbar gemacht werden. Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST Puffer (10 min) und einmaligem Waschen mit TBS Puffer, wurde die Membran kurz in Tris pH 8.8 (0.5 M) gespült. Durch Zugabe einer Luminol/H₂O₂-Lösung (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, *Thermo Scientific*) wurde der Antikörper detektierbar gemacht. Das Visualisieren der Chemolumineszenz erfolgte am LAS3000 Image Reader.

5.2.4 Biochemische Methoden

5.2.4.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Die Wechselwirkung von Proteinen mit DNA findet in vielen biochemischen Prozessen, wie z. B. der Transkription oder der Replikation, statt. Der EMSA ist eine wichtige Methode, um DNA-Protein-Interaktionen zu bestimmen. Auch als *band shifts* oder *gel retardation assay* bezeichnet, beruht diese Methode auf der im Gegensatz zu freier DNA langsameren Migration der Protein-DNA-Komplexe in einer elektrophoretischen Auftrennung. Die Auftrennung wird auf einem nativen Polyacrylamidgel verfolgt und kann durch anschließende Detektion anhand einer Markierung visualisiert werden. Viele Parameter und Bedingungen müssen optimiert werden, um eine erfolgreiche DNA-Protein-Bindung zu erhalten. So spielen die Inkubationszeit, aber auch die Temperatur und der pH-Wert eine zentrale Rolle. Die Detektion kann über radioaktiv markierte DNA erfolgen oder mittels Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorescein, AlexaFluor 555 oder Atto 550). Die 4% nativen TBE-Gele wurden gemäß den Angaben in Tabelle 5.18 gegossen.

Tabelle 5.18: Anleitung zum Gießen von vier nativen TBE-Gelen.

Reagenzien	Volumen
H ₂ O	23.25 mL
Rotiphorese 30	4.5 mL
Glycerin 100%	0.75 mL
10x TBE	1.5 mL
APS (10%)	225 µL
TEMED	15 µL

5.2.4.1.1 EMSA mit Fluoreszenz-markierter DNA

Ein am 5'-Ende Fluorescein markierter DNA-Gegenstrang wurde bei der Firma *Metabion* gekauft. Dieser wurde in äquimolarem Verhältnis mit dem Schaden enthaltenden Strang in Bindungspuffer gemischt und hybridisiert (siehe Abschnitt 5.2.2.9). Die Ausbildung des Doppelstranges wurde mit Hilfe von nativen Gelen kontrolliert. Für ein Bindungsexperiment wurde ein 10 µL Ansatz mit dsDNA (2 µM) und steigender Konzentration an Protein in Bindungspuffer hergestellt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C (Rad14) oder 37 °C (XPA) inkubiert, anschließend mit 2 µL Auftragspuffer versetzt und auf ein natives Polyacrylamidgel (4%) gegeben (100 V, 45 min, 4 °C, Laufpuffer: 0.25x TBE).

5.2.4.1.2 EMSA mit radioaktiv-markierter DNA

Die ungeschädigten Gegenstränge wurden zunächst durch die T4 Polynukleotid Kinase [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) am 5'-Ende radioaktiv-markiert (*Hartmann Analytik*). Daraufhin wurde das Schaden enthaltende Oligonukleotid mit dem jeweiligen ungeschädigten markierten Gegenstrang in äquimolarem Verhältnis zusammengegeben und hybridisiert. Die Bildung des DNA- Doppelstrangs konnte durch native Gelelektrophorese überprüft werden. Die radioaktive Markierung ermöglichte die Detektion der Banden durch Autoradiographie (StormTM860, GE). Ein typisches Experiment bestand aus 33 fmol dsDNA und steigender Menge an Protein in Bindungspuffer (10 µL Endvolumen). Nach 30 minütiger Inkubation bei 30 °C wurden 2 µL EMSA-Auftragspuffer zugegeben und auf das bereits 30 min vorgefahrene Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C, 100 V in 0.25x TBE-Laufpuffer.

5.2.4.2 Chemisches *Crosslinking* Experiment

Die Kombination aus chemischem *Crosslinking* und Massenspektrometrie (MS) ermöglicht die Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen. Es wird eine kovalente chemische Bindung zwischen den Seitenketten zweier Aminosäuren eines Proteins (intramolekular) oder von interagierenden Proteinen (intermolekular) geknüpft. Beispielsweise reagieren freie Aminogruppen an den N-terminalen Enden von Proteinen oder die ϵ -Aminogruppen von Lysinresten im Protein mit Bis-*N*-Hydroxysuccinimidester (NHS) aktivierte PEG Verbindungen bei einem pH Wert von 7–9 und bilden eine kovalente Amidbindung aus. Dabei wird NHS freigesetzt (Abbildung 5.4). *Crosslinker* dienen als „molekulare Lineale“, um Distanzen zwischen Aminosäuren innerhalb eines Proteins oder Proteinkomplexen abzuleiten. Die Analyse der verknüpften Peptidfragmente erlaubt die Lokalisierung der verknüpften primären Amine und ermöglicht somit deren räumliche Zuordnung.¹¹⁴ Nach Inkubation des Proteins mit AAF-dG DNA für 30 min bei 4 °C wurde eine steigende Konzentration an *Crosslinker* zugegeben (molares Verhältnis 1:1 bis 1:200) und das Gemisch für 2 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit SDS-Auftragspuffer 5 min bei 95 °C aufgeköcht und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die (Rad14)₂ Bande wurde aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten, anschließend mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut und entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 5.2.4.3 präpariert. Die erhaltenden Peptide wurden zuletzt massenspektrometrisch (LC-MSMS) analysiert (Abschnitt 5.2.4.3).

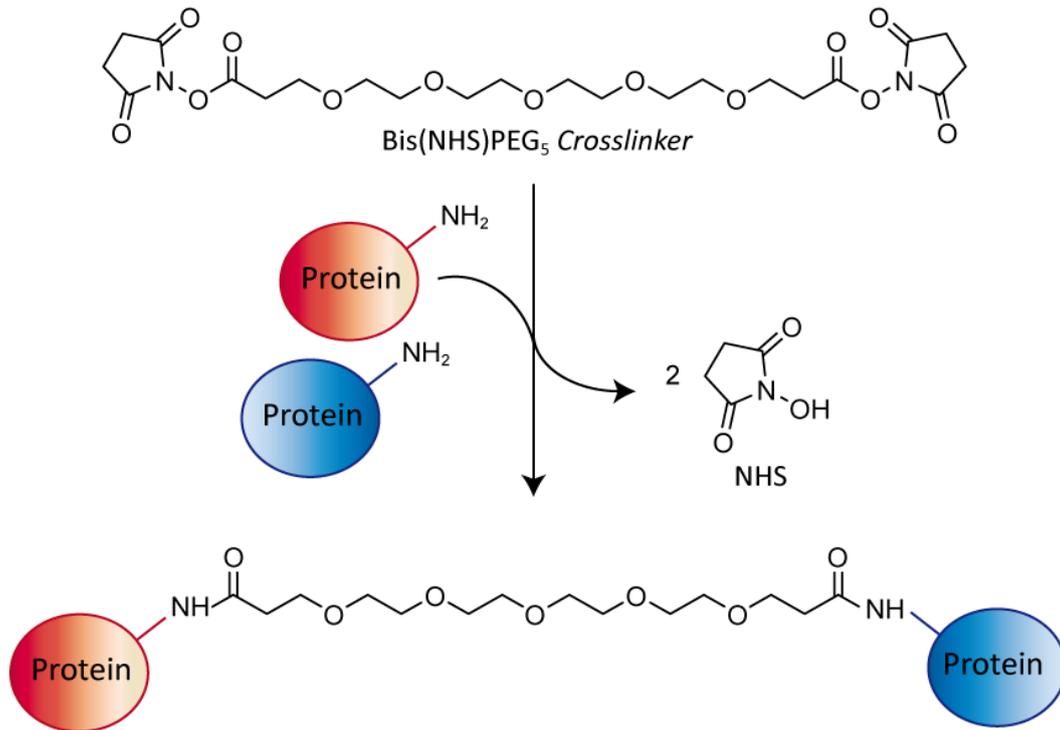


Abbildung 5.4: Chemische Reaktion der freien Aminogruppe eines Proteins mit einem NHS Ester. Durch Freisetzung von NHS (N-Hydroxysuccinimid) entsteht eine Verknüpfung des Proteins mit dem *Crosslinker* unter Bildung einer Amidbindung.

5.2.4.3 Enzymatischer Verdau von Proteinen

Das Enzym Trypsin katalysiert die C-terminale Spaltung von Peptidbindungen nach Arginin und Lysin ebenso wie deren Amide und Ester. Chymotrypsin spaltet C-terminal von aromatischen Aminosäuren. Diese Serinproteasen werden häufig in der Proteinanalytik zur Erstellung von sogenannten *Peptid-Maps* in Verbindung mit der Massenspektrometrie verwendet. Somit können Proteine aufgrund ihres Peptid- und Fragmentierungsmusters durch einen Datenbankabgleich identifiziert werden. Bei bereits bekannten Proteinen stellt der enzymatische Verdau somit eine elegante Nachweismethode dar.

Für den Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin wurde die entsprechende Proteinbande zunächst mithilfe eines Skalpells aus dem SDS-PAGE isoliert, das Gelstück zerkleinert und in ein 0.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden mit jeweils 100 μL ddH₂O und NH₄HCO₃/Acetonitril (50 mM, 1:1, v/v) versetzt und für 15 min bei 600 rpm inkubiert. Nach Entfernen der Waschlösung wurde das Gelstück komplett mit Acetonitril überdeckt. Das

Acetonitril wurde entfernt, die Gelstücke in 100 μL NH_4HCO_3 (50 mM) rehydratisiert und nach fünf Minuten mit gleichem Volumen an Acetonitril versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit komplett entfernt und so viel Acetonitril dazugegeben, dass die Gelstücke bedeckt waren. Nach Schrumpfen der Gelpartikel wurden diese nach Entfernen des Acetonitrils in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden die Gelpartikel mit frisch zubereitetem Dithiothreitol (10 mM)/ NH_4HCO_3 (50 mM) versetzt und für 45 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Überschuss an Flüssigkeit entfernt, die Gelpartikel sofort in einer frisch hergestellten Lösung aus Iodacetamid (55 mM) in NH_4HCO_3 (50 mM) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen der Iodacetamid-Lösung wurden die Gelpartikel mit NH_4HCO_3 (50 mM) und Acetonitril (1:1, v/v) zweimal für 15 min gewaschen. Die Waschlösung wurde entfernt und die Gelstücke mit ACN überdeckt. Nach Schrumpfen der Gelstücke wurde das ACN entfernt und die Gelpartikel wurden erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für den *In-Gel*-Verdau wurden die Gelstücke mit 100 μL frisch zubereiteter Trypsinlösung bzw. Chymotrypsinlösung (50 μg in 25 mM NH_4HCO_3) bedeckt und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die 100 μL entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die zurückbleibenden Gelstücke wurden mit 100 μL NH_4HCO_3 (25 mM) versetzt und 15 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Nach Zugabe von 100 μL Acetonitril wurden sie erneut 15 min mit Ultraschall behandelt. Diese 200 μL wurden zu den vorher entnommenen 100 μL des Proteaseverdaus gegeben. Nach Wiederholen dieses Vorgangs mit 100 μL Ameisensäure (5%) und anschließend mit 100 μL Acetonitril wurden die vereinigten Lösungen (ca. 500 μL) an der Vakuumzentrifuge bis auf ca. 20 μL eingengt. Zum Entfernen von unerwünschten Partikeln wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die unter Kapitel 5.2.4.4 beschriebene Massenspektrometrie weiterverwendet.¹¹⁵

5.2.4.4 ESI-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung des Masse/Ladung-Verhältnisses (m/z) von Molekülen und findet ihren Einsatz beispielsweise bei der Analyse komplexer

Proteingemische. Die zu untersuchende Substanz wird in die Gasphase überführt, ionisiert und durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Die gängigsten Ionisierungsmethoden für Peptid- bzw. Proteinanalysen sind MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionisation*) und ESI (*electrospray ionization*), da diese Methoden besonders schonend sind. Unterschiedliche Analysator-Techniken erlauben die Trennung der Teilchen nach ihrem m/z-Verhältnis. Ein Detektor registriert die Anzahl an Ionen bei jedem m/z-Verhältnis.

Die Probe wurde mit einem UltiMate 3000 Flüssigkeitschromatographiesystem (Dionex, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), gekoppelt an ein LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) analysiert. Das verdaute Protein (10 µL) wurde injiziert, die Probe auf einer µ-Vorsäule aufkonzentriert und entsalzt und auf einer analytischen Säule (ReproSil-Pur, C18, 3 µM, 120 Å) aufgetrennt. Die analytische Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 300 nL/min in 85 min. In den ersten 50 min wurde ein linearer Gradient von 5% Lösungsmittel B (3% DMSO und 0.1% Ameisensäure in Acetonitril) und 95% Lösungsmittel A (3% DMSO und 0.1% Ameisensäure in Wasser) bis zu 95% Lösungsmittel B angelegt. Die Zusammensetzung wurde für 5 min konstant gehalten und dann innerhalb von 2 min wieder auf 5% Lösungsmittel B abgesenkt.

Anschließend wurden die Peptidsequenzen durch Abgleich der Fragmentspektren mit Peptiden, die durch einen *in silico* Verdau einer Proteindatenbank generiert wurden, bestimmt.

5.2.4.5 Thermofluor Experiment

Die Stabilität und Homogenität eines Proteins ist stark anhängig von dem Puffer, indem es sich befindet. Eine elegante Methode, um herauszufinden welche Pufferzusammensetzung die Stabilität des Proteins maximiert, ist der Thermofluor Versuch.¹¹⁶ Diese Methode ermöglicht es ebenfalls die Stabilität des Proteins in Anwesenheit von Kofaktoren oder Additiven zu testen. Lösliches Protein besitzt eine hydrophile Oberfläche, denaturiert es jedoch, so präsentiert es hydrophobe Reste an seiner Oberfläche. Die Proteinlösung wird mit einem Fluorophor (SYPRO® Orange) versetzt, welches stark fluoresziert, sobald es mit hydrophoben Bereichen wechselwirkt. Mit steigender Temperatur beginnt das Protein zu denaturieren, so dass der Fluorophor an dessen freiliegenden, hydrophoben Bereichen bindet und Fluoreszenz

verstärkt emittiert wird.¹¹⁷ Es wird die Steigerung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der steigenden Temperatur gemessen. Je höher die Temperatur, bei der das Protein in dem jeweiligen Puffer denaturiert, desto stabiler ist das Protein in diesem Puffer. Das Experiment wurde im 96-well Format durchgeführt. Für den Versuch wurde 5 µL Proteinlösung (Endkonzentration 20 µM) mit 5 µL SYPRO® Orange (*Sigma-Aldrich*) in 15 µL des zu testenden Puffers (100 mM) gegeben. Das Experiment wurde in einer Real-Time PCR Maschine durchgeführt (*Stratagene Mx3005P™*). Es erfolgte ein Temperaturanstieg von 25 – 95 °C in 1 °C Schritten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand einer Excel-Datei bereitgestellt von dem *Structural Genomics Consortium* (SGC) aus Oxford.

5.2.4.6 Partielle Proteolyse

Die partielle oder limitierte Proteolyse stellt eine weitere Methode dar, um die Stabilität des Proteins festzustellen. Proteasen schneiden nur an spezifischen Stellen in flexiblen Bereichen von Proteinen und bauen diese zu definierten Fragmenten ab. Diese Fragmente können anschließend durch Massenspektrometrie analysiert werden und gewünschte, stabile Sequenzen des Proteins können neu kloniert werden und für biochemische Versuche dienen. Alternativ kann der Ansatz nach der limitierten Proteolyse direkt durch Gelchromatographie aufgetrennt werden, um das erhaltene Fragment zu isolieren und zu kristallisieren. Bei dem Versuch wurden unterschiedliche Konzentrationen (0.5 – 5 mg/mL) der Proteasen Trypsin, Papain und Chymotrypsin mit dem zu analysierenden Protein (2 mg/mL) 45 min bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 µL SDS-Auftragspuffer zugegeben, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und die Probe auf einem SDS-PAGE analysiert.

5.2.4.7 Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarisation ermöglicht die Bestimmung von DNA-Protein-Wechselwirkungen direkt in Lösung. Das Fluorescein markierte, kleinere Molekül (in diesem Fall dsDNA) verändert seine Polarisation sobald es mit größeren Molekülen (z. B. Proteinen) interagiert. Die Anregung des Fluorescein-markierten Moleküls erfolgt mit linear polarisiertem Licht. Durch Rotation des Moleküls aus dieser Ebene heraus emittiert es Fluoreszenzlicht in einer anderen Ebene als der Anregungsebene und ermöglicht die Einteilung des emittierten Lichts in eine horizontale und eine vertikale Ebene. Je kleiner das

Molekül, desto größer seine Mobilität was zur Depolarisation des emittierten Lichtes führt. Ist ein Molekül sehr groß, weist es eine geringe Mobilität während der Anregung auf, wobei dies eine hohe Polarisierung des emittierten Lichtes zur Folge hat. Größere Moleküle hingegen rotieren langsamer und weisen eine hohe Polarisierung des Lichtes auf. Die Fluoreszenzpolarisation ermöglicht demzufolge Bindungsstudien zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen durchzuführen, da freie DNA eine geringere Polarisierung aufweist als ein DNA-Protein-Komplex. In Abbildung 5.5 ist eine graphische Darstellung der Fluoreszenzpolarisation schematisch dargestellt. Folgende Gleichung beschreibt die Fluoreszenzpolarisation:

$$P = \frac{I - I_{\perp}}{I + I_{\perp}}$$

I : Intensität bei parallelen Anregungs- und Emissionspolarisatoren

I_{\perp} : Intensität bei perpendicularen Anregungs- und Emissionspolarisatoren

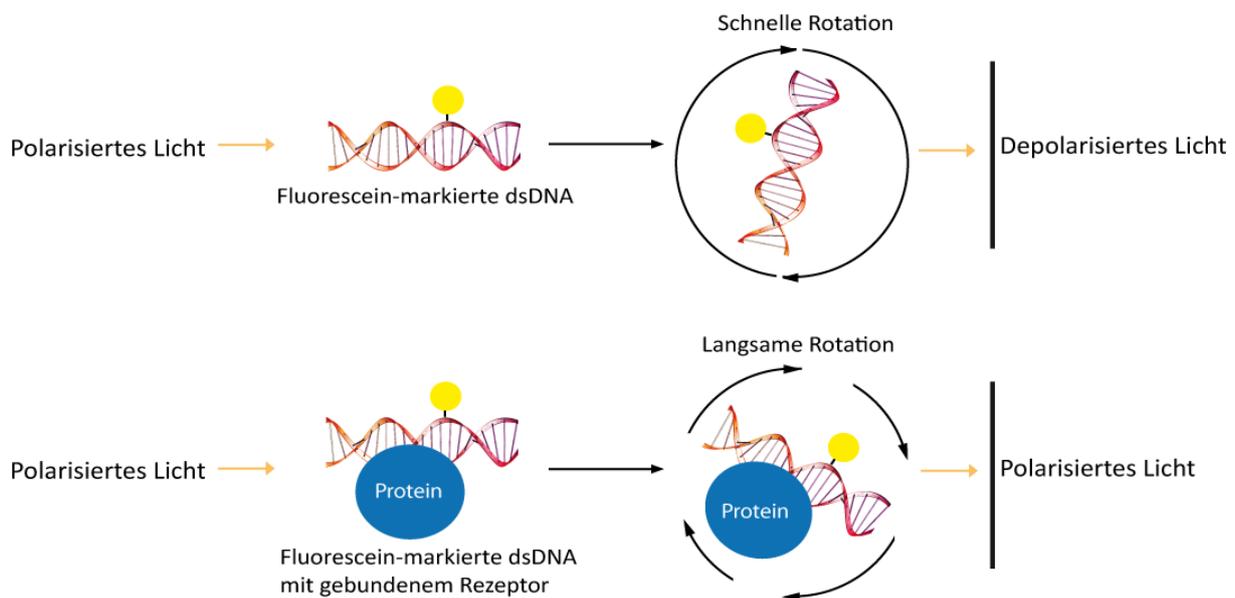


Abbildung 5.5: Schema zum Ablauf der Fluoreszenzpolarisation.

Die Messungen wurden am GeniusPro Fluoreszenzphotometer (*Tecan*) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Bindungsstudien zwischen dem $\Delta 4\text{CRad14s}$ -His Protein (Wildtyp und Mutante) und Fluorescein (Fluo) enthaltener DNA gemacht. Für die Messungen wurden verschiedene Stränge an dsDNA mit interner Fluo-Markierung (50 nM) und steigender Rad14s-Konzentration für 30 Minuten bei 25 °C in Bindungspuffer (100 μL) inkubiert. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm wurden die Proben schließlich bei Raumtemperatur gemessen. Jede Messungen wurden jeweils zweimal wiederholt, wobei ein Fehler von 2 – 5% bestimmt wurde.

5.2.5 Proteinkristallisation

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann mittels röntgenkristallographischer Methoden bis zu atomarer Auflösung bestimmt werden. Die Beugung von Röntgenstrahlen an einem Kristall gibt Informationen über die Anordnung der Atome im Kristall. Es ermöglicht die Analyse des katalytischen Mechanismus eines Enzyms auf atomarer Ebene oder die spezifische Interaktion eines Proteins mit der DNA. Bei der Kristallisation gehen Moleküle aus einer übersättigten Lösung in eine feste Phase über. Die Übersättigung der Proteinlösung wird meistens durch Zugabe eines Präzipitans wie z. B. Salze, organische Verbindungen wie Polyethylenglykol (PEG) oder Alkohole erreicht. Der pH-Wert sowie die Temperatur spielen beim Kristallisationsansatz eine wichtige Rolle. Diese zwei Parameter sind abhängig vom zu kristallisierenden Protein. Meistens liegt der pH-Wert zwischen vier und zehn wobei Kristallisationsexperimente bei 4 °C oder 18 °C durchgeführt werden. Somit müssen viele verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet werden. Am häufigsten wird die *hanging drop*-Methode angewendet. Ein kleines Volumen der Protein-DNA-Lösung (ca. 1 μL) wird mit demselben Volumen an Präzipitans/Puffer-Lösung auf ein Deckglas pipettiert, vermischt und das Deckglas umgedreht auf eine Kunststoffplatte über einer Vertiefung aufgesetzt und durch einen Film von Silikonfett abgedichtet. Somit befindet sich der Tropfen in einem geschlossenen System. In die Vertiefungen wurde vorher die unverdünnte Präzipitans/Puffer-Lösung pipettiert (500 μL). Die Präzipitanskonzentration im *hanging drop* ist nur halb so groß wie die im Reservoir, so dass sich das Tropfenvolumen durch Dampfdiffusion verringert. Die Konzentration im *hanging drop* erhöht sich langsam, bis eine Übersättigung eintritt, was zur Kristallisation des Proteins führt. In Abbildung 5.6 ist die *hanging drop vapour diffusion* Methode schematisch dargestellt.

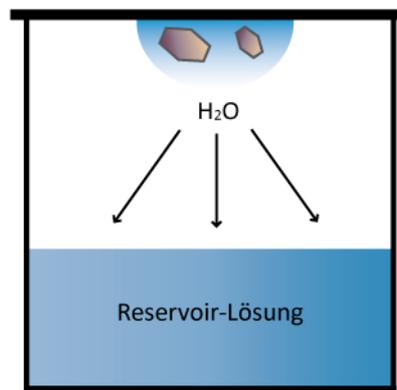


Abbildung 5.6: Prinzip der *hanging drop vapour diffusion*-Methode.

5.2.5.1 Pre-Kristallisationstest

Der Pre-Kristallisationstest (PCTTM, *Hampton Research*)¹¹⁸ wurde verwendet, um die optimale Proteinkonzentration für Kristallisationsversuche zu bestimmen, da diese ein kritischer Faktor für eine erfolgreiche Kristallisation ist. Ist die Probe zu konzentriert, so erhält man Präzipitat. Ist jedoch die Probe zu verdünnt, bleiben die Tropfen klar. Das Protein wurde mittels *hanging drop vapour diffusion* Methode mit zwei Reagenzien versetzt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Je nachdem ob Präzipitat oder ein klarer Tropfen zu erkennen war, konnte die Proteinkonzentration verändert werden.

5.2.5.2 Hochdurchsatz Kristallisation

Um optimale Kristallisationsbedingungen für den Protein-Komplex zu finden, wurden initiale Screens von der Firma *Qiagen* angesetzt. Dies wurde am Max-Planck-Institut (Martinsried) in der Arbeitsgruppe von *Prof. Elena Conti* durchgeführt. Mit der *hanging drop vapour diffusion* Methode konnten am Kristallisationsroboter bei einer Tropfengröße von 100 nL und einer Reservoirmenge von 60 μ L über 500 Bedingungen getestet werden. Es wurden folgende Kits von *Qiagen* verwendet: AmSO₄, PEGS, MPD, pH Clear, Classics. Die Kristallisationsplatten wurden bei 4 °C gelagert.

5.2.5.3 Strukturbestimmung mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse

Es gibt drei wichtige Techniken zur Erforschung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins: Die Röntgenkristallographie, die Elektronenmikroskopie (EM) und die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR).

Die Röntgenstrukturanalyse ist ein Verfahren, bei dem Röntgenstrahlen mit den Elektronen der Moleküle im Proteinkristall in Wechselwirkung treten, wobei man ein Beugungsmuster erhält. Aus dem beobachteten Beugungsmuster kann nach verschiedenen Prozessierungs- und Verfeinerungsschritten auf die Struktur des Proteins geschlossen werden. Die Intensität der einzelnen Reflexe gibt die Amplitude der aufgetroffenen Welle wieder. Die Aufnahmen ermöglichen jedoch keine Aussage über die Phase der Welle zu treffen, die für die Berechnung der Elektronendichte notwendig ist: man spricht von dem Phasenproblem der Kristallographie. Im nächsten Kapitel wird auf die Lösung des Phasenproblems näher eingegangen. Die Auflösung der Röntgenstruktur hängt im Wesentlichen von der Qualität des Proteinkristalls ab. Durch die regelmäßige Anordnung der Moleküle in einem geordneten Kristallgitter wird die Interaktion mit der Röntgenstrahlen verstärkt. Um die benötigte hohe Intensität an Röntgenstrahlung zu erreichen, werden die Beugungsexperimente am Synchrotron durchgeführt.

5.2.5.3.1 Phasenbestimmung

Zur Lösung des Phasenproblems greift man auf verschiedene Strukturlösungsmethoden zurück, wie zum Beispiel dem einfachen (SIR) oder multiplen (MIR) isomorphen Ersatz, dem molekularen Ersatz (MR) oder der anomalen Dispersion bei einzelnen (SAD) oder mehreren Wellenlängen (MAD).

Die Methode der *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) nutzt die Eigenschaft einiger Elemente die Röntgenstrahlung bei einer Wellenlänge nahe ihrer Absorptionskante anomal zu streuen (Resonanzeffekt). Es kommt zu einer intrinsischen Phasenverschiebung, welche als anomale Streuung bezeichnet wird. In dieser Arbeit wurden Schweratomderivate (Selenomethionin modifiziertes Protein und Brom/Iod-modifizierte DNA) der Proteinkristalle hergestellt und Datensätze bei der Wellenlänge, die der Resonanzkante des jeweiligen Schweratoms entspricht, aufgenommen.

Die Methode des molekularen Ersatzes (MR) kann angewendet werden, wenn die Struktur eines ähnlichen Moleküls schon bekannt ist, welches als Suchmodell genutzt wird. Diese ähnliche Struktur sollte mindestens eine Sequenzidentität von 30% mit der zu untersuchenden Struktur aufweisen. Durch Rotation und Translation des Suchmodells, wird dieses mit Hilfe der Patterson-Methode in die korrekte Position der Elementarzelle der unbekannt Struktur gebracht. Die bekannten Phasen des Suchmodells werden dann zusammen mit der Amplitude der Diffraktion der gesuchten Struktur benutzt, um eine anfängliche Elektronendichtekarte zu berechnen.

5.2.5.3.2 Datensammlung, Strukturbestimmung, Modellbau und Verfeinerung

Alle Daten wurden an den Beamlines PXI und PXIII der *Swiss Light Source* (SLS) in Villigen, Schweiz oder an der Beamline ID29 und der Mikrofocus Beamline ID23-2 der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble, Frankreich aufgenommen. Die Datensammlung und die Strukturbestimmungen wurden von *Dr. Sabine Schneider* und *Dr. Jochen Kuper* durchgeführt. SAD Daten des SeMet Rad14/AAF-dG Kristallkomplexes wurden am Mikrodiffraktometer der PXI Strahlenlinie (SLS) aufgenommen. Für die Strukturbestimmung wurden Datensätze von vier verschiedenen Kristallen mit dem Programm AUTOPROC kombiniert¹¹⁹⁻¹²¹ und die experimentellen Phasen mit Hilfe von PHENIX Autosol bestimmt.^{122,123} Ein erster Modellbau wurde mit Hilfe von PHENIX Autobuild^{124,125} durchgeführt. Alle weiteren Strukturen wurden durch molekularen Ersatz (MR) unter Verwendung der SeMet Rad14 Koordinaten gelöst (PHASER^{126,127}). Der manuelle Aufbau des Modells erfolgte mit COOT¹²⁸ und die Strukturverfeinerung in Refmac5¹²⁹ und Phoenix¹²⁵ wurde mit der Verwendung von TLS durchgeführt.^{130,131} Die Positionen der Iod- und Platinatome wurden festgelegt und ihre Besetzung von ihren anomalen Differenzdaten abgeschätzt.

6 Ergebnisse und Diskussion

Für ein besseres Verständnis der Schadenserkenkung in der NER, wurden in dieser Arbeit Bindungsstudien und Kristallisationsexperimente von XPA und dessen Hefehomolog Rad14 mit geschädigten Oligonukleotiden durchgeführt.

6.1 Das humane XPA Protein

6.1.1 Allgemeines

Das humane Zinkfinger Protein XPA besteht aus 273 Aminosäuren und besitzt eine Größe von 31 kDa. Die mittlere Domäne des Proteins (Aminosäuren 98 – 219) ist für die Bindung an DNA verantwortlich und wurde als minimales DNA-bindendes Fragment definiert.⁹⁰ Das Fragment besteht aus 122 Aminosäuren und hat eine Größe von 16 kDa. In dieser Arbeit wurde sowohl das Volllängenprotein (XPAfl) als auch dessen DNA-Bindedomäne (XPAs) kloniert und überexprimiert. Tabelle 6.1 zeigt einen Überblick der beiden XPA Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 6.1: Übersicht der verschiedenen Konstrukte von XPA.

Protein	Plasmid	Variante	Affinitätstag
XPAfl	pPSG-IBA43	Volllängenprotein	C-term. Strep-tagII, N-term. 6xHis-tag
XPAs	pPSG-IBA3	DNA-Bindedomäne	C-term. Strep-tagII

6.1.2 Klonierung und heterologe Expression von XPA

Für die Gewinnung der *xpa* Gene wurde eine PCR gemäß Abschnitt 5.2.2.3 durchgeführt. Die PCR-Produkte von XPAfl und XPAs wurden zuerst in pPSG-IBA10 mit Hilfe der *StarCombinase*TM (Abschnitt 5.2.2.7) kloniert und anschließend mittels der *StarGate*[®] Methode in die jeweiligen Destinationsvektoren (Tabelle 6.1) überführt. Die Vektorkarten beider Konstrukte sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

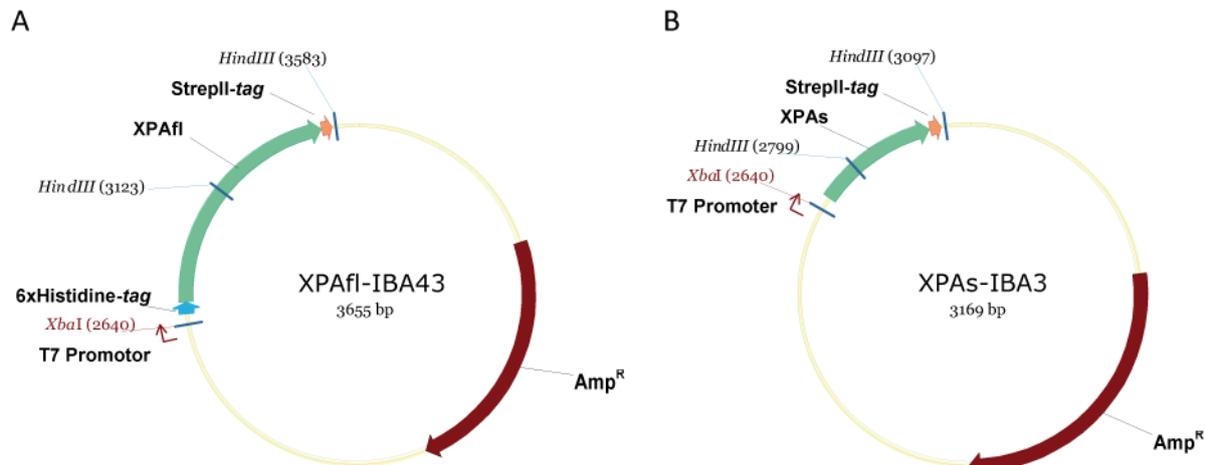


Abbildung 6.1: Vektorkarten der A) XPAfl-IBA43 und B) XPAs-IBA3 Plasmide. Rot: Antibiotika-Resistenz; grün: Protein; hellblau: 6xHis-tag; orange: Strep-tagII.

Nach Transformation der Destinationsvektoren in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Tabelle 6.2) erfolgte die heterologe Proteinexpression gemäß Abschnitt 5.2.1.3.1. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht der verschiedenen Expressionsbedingungen der XPAfl und XPAs Proteine.

Tabelle 6.2: Darstellung der optimalen Expressionsbedingungen von XPAfl und XPAs.

Protein	XPAfl	XPAs
<i>E. coli</i> Stamm	BL21(DE3) <i>pLysS</i>	BL21(DE3)
OD ₆₀₀	0.6	0.6
Induktion	IPTG (1 mM)	IPTG (1 mM)
Induktionstemperatur	28 °C	28 °C
Schüttlergeschwindigkeit	225 rpm	225 rpm
Dauer der Induktion	3 h	3 h
Zusatz	ZnCl ₂ (10 µM)	ZnCl ₂ (10 µM)

6.1.3 Aufreinigung von XPA

Nach Aufschließen der Zellen wurden diese abzentrifugiert und aus dem Überstand das Protein gewonnen.

6.1.3.1 XPAfl

Nach einem ersten Reinigungsschritt über die Strep-Tactin[®]-Säule (Abbildung 6.2 A) folgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels Ni-NTA-Säule (Abbildung 6.2 B). Anschließend wurde eine Reinigung über eine Heparin-Säule (Abbildung 6.2 C) durchgeführt. Proteinenthaltende Fraktionen wurden in Heparin Puffer A umgepuffert und bis zu einer Endkonzentration von 3 mg/mL aufkonzentriert. Das Protein konnte nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert werden. Auf der SDS-PAGE (Abbildung 6.2 D) erkennt man das aufgereinigte XPAfl Protein. Theoretisch sollte es eine Größe von etwa 32.5 kDa aufweisen (XPAfl: 31 367 Da + Strep-tagII: 1 255 Da). Es wurde jedoch festgestellt, dass das Protein in einer SDS-PAGE als Bande zwischen 38 – 42 kDa erscheint. Dieses Phänomen kann durch das Vorhandensein geladener Glutaminsäure-reicher Domänen sowie ungeordneter Bereiche im Protein erklärt werden.¹³²

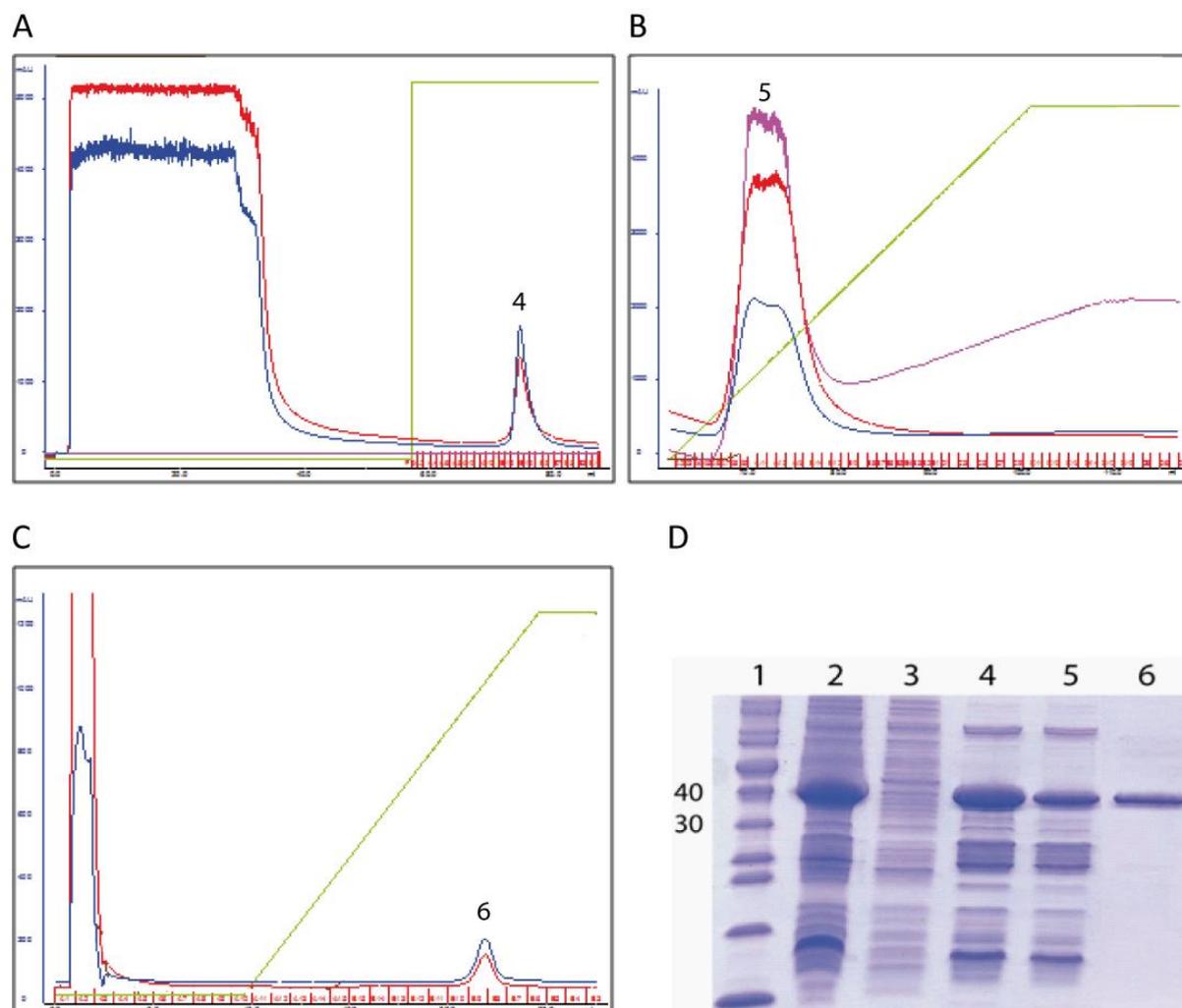


Abbildung 6.2: Chromatogramme der ÄKTA-Affinitätschromatographien und SDS-PAGE der Reinigungsschritte von XPAfl. x-Achse: Retentionszeit (min); y-Achse: Absorption (mAU); blau: Absorption bei 280 nm, rot: Absorption bei 260 nm; pink: Absorption bei 230 nm; grün: Gradient des Elutionspuffers. A) Strep-Tactin®-Säule. B) Ni-NTA-Säule. C) Heparin-Säule. D) SDS-PAGE der Reinigungsschritte von XPAfl, 1: Proteinstandard *PageRuler*™, 2: Pellet nach dem Aufschluss, 3: Lysat nach dem Aufschluss, 4: XPAfl-Eluat der Strep-Tactin®-Säule, 5: XPAfl-Eluat der Ni-NTA-Säule 6: XPAfl-Eluat der Heparin-Säule.

6.1.3.2 XPAs

Weil das aufgereinigte XPAfl Protein sehr instabil war und nur in geringer Ausbeute erhalten werden konnte, sollte für Kristallisationsexperimente die DNA-bindende Domäne des Proteins isoliert werden. Das mit einem Strep-*tagII* versehene XPAs konnte mittels Strep-Tactin® Affinitätschromatographie (Abbildung 6.3 A) und anschließender Heparin-Säule aufgereinigt werden (Abbildung 6.3 B). Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereint und bis zu einer

Konzentration von etwa 8 mg/mL aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das SDS-PAGE (Abbildung 6.3 C) zeigt das aufgereinigte XPAs Protein (Spur 6) mit einer Größe von etwa 16 kDa (XPAs: 14 570 Da + Strep-tagII: 1 255 Da).

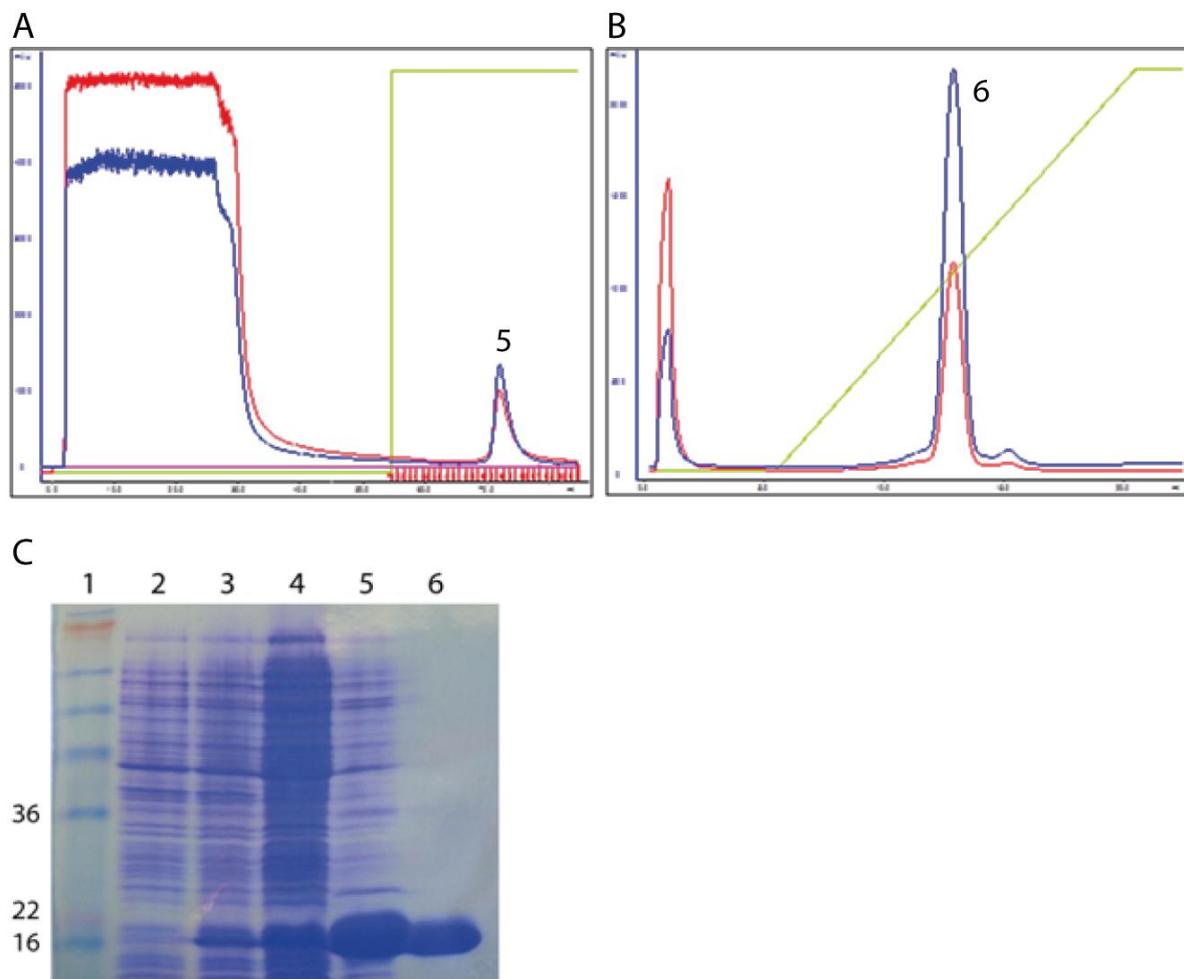


Abbildung 6.3: Chromatogramme der ÄKTA-Affinitätschromatographien und SDS-PAGE der Reinigungsschritte von XPAs. x-Achse: Retentionszeit (min); y-Achse: Absorption (mAU); blau: Absorption bei 280 nm, rot: Absorption bei 260 nm; pink: Absorption bei 230 nm; grün: Gradient des Elutionspuffers. A) Strep-Tactin[®]-Säule und B) Heparin-Affinitätschromatographie. C) SDS-PAGE der Reinigungsschritte von XPAs. 1: Proteinstandard *SeeBlue[®] Plus 2*, 2: Zellextrakt vor der Induktion, 3: Zellextrakt nach der Induktion, 4: Protein nach Aufschluss der Zellen, 5: XPAs-Eluat der Strep-Tactin[®]-Säule, 6: XPAs-Eluat der Heparin-Säule.

6.1.4 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Um einen Einblick der Bindungsaffinität von XPAfl bzw. XPAs zu geschädigter DNA zu erhalten, wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Es wurde sowohl mit Fluorescein- als auch mit ^{32}P -radioaktiv-markierter DNA gearbeitet.

6.1.4.1 EMSA mit Fluorescein-markierter DNA

Durch seine ähnliche Struktur zu *bulky adducts* fungiert Fluorescein (Fluo) sehr häufig als natürliches Erkennungssubstrat von XPA in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER).^{56,133} Daher wurden DNA-Stränge mit interner Fluo-dU Markierung für die Bindungsversuche verwendet. Es konnte so z. B. die Affinität von XPAfl und XPAs zu unterschiedlich langen Fluo-markierten DNA-Oligonukleotiden getestet werden. Zu einer konstanten Menge an Fluo-dU-dsDNA (2 μM) wurden steigende Konzentrationen an Protein (0 – 10 μM) in Bindungspuffer zugegeben (10 μL Endvolumen) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der erhaltenen Gele am *Image Reader* LAS3000 ausgelesen. Abbildung 6.4 zeigt EMSA-Experimente von XPAfl und XPAs mit Fluo-markierter dsDNA.

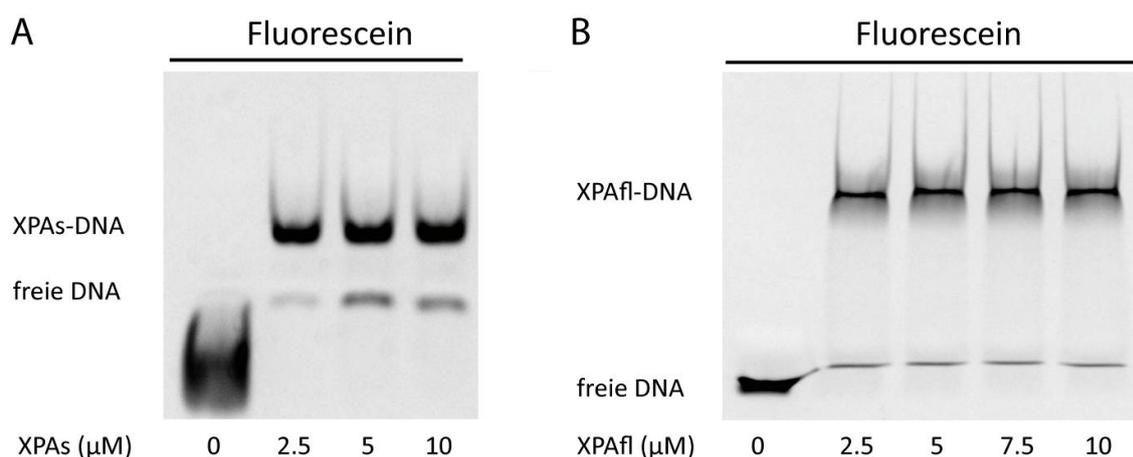


Abbildung 6.4: Fluoreszenzaufnahmen von 4.5% nativen Polyacrylamidgelen. A) EMSA-PAGE von XPAs mit Fluorescein-markierter 16mer dsDNA (ODN11) und B) EMSA-PAGE von XPAfl mit Fluorescein-markierter 19mer dsDNA (ODN10).

Die Bindungsaffinitätsstudien von XPAfl und XPAs mit Fluo-modifizierter DNA zeigen eine deutliche Bindung beider Proteine an diese *bulky adduct* ähnliche Struktur. Das kürzere XPAs Konstrukt zeigt eine ähnliche Bindungsaffinität wie das Vollängenprotein und wurde deshalb für weitere Bindungsstudien verwendet.

6.1.4.2 EMSA mit radioaktiv-markierter DNA

Wie im vorherigen Kapitel besprochen, wird Fluorescein durch das NER Reparatursystem als Substrat erkannt und würde somit immer eine Bindung des Proteins an die DNA zeigen, wenn es als Marker verwendet wird. Deshalb wurden EMSA-Experimente mit ^{32}P -radioaktiv-markierter dsDNA durchgeführt. NER relevante Schäden, wie aromatische Amine oder Cisplatin Addukte wurden hier analysiert. Die dsDNA enthielt in einem der beiden Stränge einen Schaden. Der Gegenstrang wurde am 5'-Ende ^{32}P -radioaktiv markiert. Zu einer konstanten Menge radioaktiv-markierter dsDNA (5 pM) wurden steigende Konzentrationen an Protein (0 – 10 pM) in Bindungspuffer zugegeben (10 μL Endvolumen) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der nativen PAGE erfolgte nach einer Inkubation von 24 h bei –80 °C durch Autoradiographie. In Abbildung 6.5 sind die EMSA-Gele von XPAs mit AAF-dG und 1,2-GG-Cisplatin geschädigter DNA dargestellt.

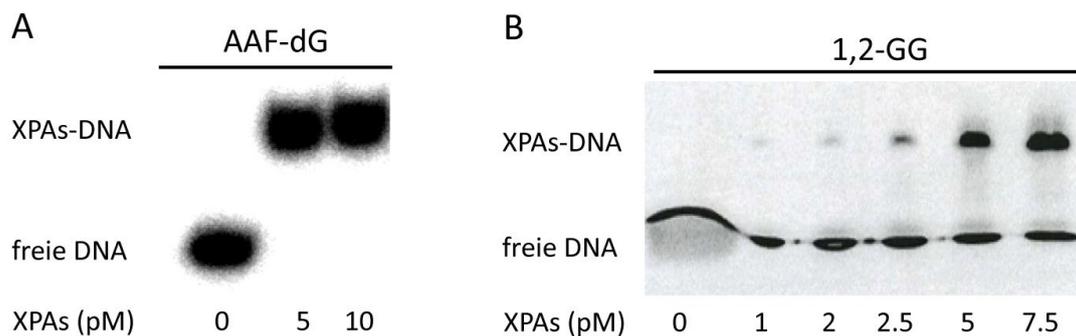


Abbildung 6.5: A) EMSA-PAGE von XPAs mit AAF-dG geschädigter 16mer dsDNA (ODN7) und B) EMSA-PAGE von XPAs mit 1,2-GG-Cisplatin geschädigter 20mer dsDNA (ODN5).

XPAs bindet mit hoher Affinität sowohl an *bulky adducts* (Abbildung 6.5 A), wie z. B. AAF-dG, als auch an Cisplatin geschädigte DNA (Abbildung 6.5 B). Diese beiden Schäden sind typische NER Substrate.⁵⁰ Weiterhin zeigt das Ergebnis, dass XPAs die Schäden in einem Doppelstrang Kontext erkennt.

6.1.5 Kristallisation von XPAs

Für die Kristallisationsexperimente wurde das XPAs Protein mit C-terminalem Strep-tagII bei einer Konzentration von 7 mg/mL und einem molaren Verhältnis von Protein:DNA von 1:1.3 mit intern Fluorescein-markierter dsDNA (ODN10) vermischt. Nach Testen verschiedener Bedingungen konnten Kristalle (Abbildung 6.6 A) nach der *hanging drop vapour diffusion* Methode in folgender Kristallisationslösung erhalten werden: 0.1 M Zitronensäure und 4 M Natriumchlorid. Die Ansätze wurden bei 4 °C inkubiert und die ersten Kristalle erschienen nach 30 Tagen. Die Kristalle hatten eine büschelartige Form, was das Messen an einer Strahlenquelle unmöglich machte. Auch nach mehreren *Mikro seeding*^{134,135} Schritten konnte keine bessere Kristallform erhalten werden (Abbildung 6.6 B). Da jedoch ein erster Anhaltspunkt gegeben war, dass das Protein prinzipiell kristallisierbar ist, sollten die Kristallisationsexperimente weiter optimiert werden, um möglichst hochauflösende Kristalle und eine Röntgenstruktur zu erhalten. Weitere Kristallisationsansätze mit AAF-dG und 1,2-GG Cisplatin geschädigter DNA als Substrat ergaben jedoch keine Proteinkristalle.

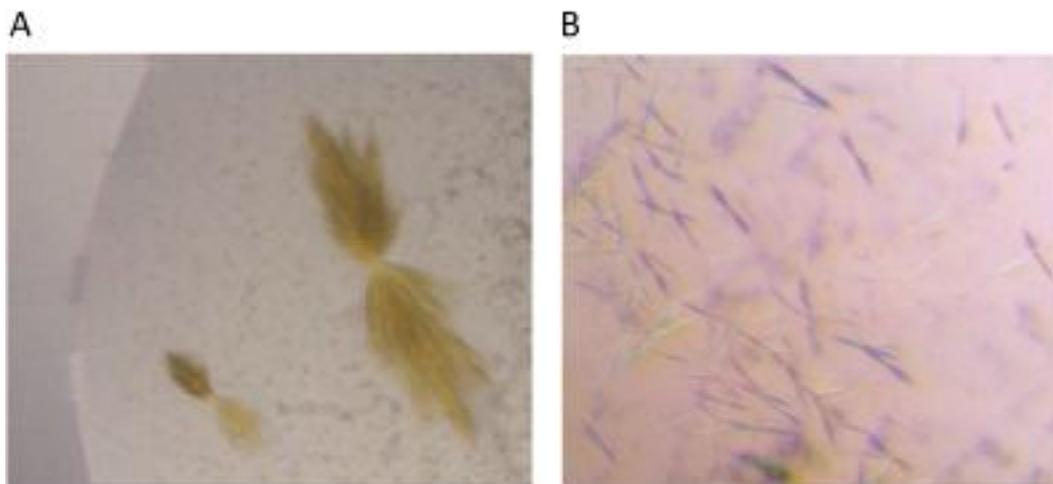


Abbildung 6.6: A) Kristalle von XPAs im Komplex mit Fluo-dU dsDNA. B) Weiterer Kristallisationsansatz mit Optimierung der Kristallform durch *Mikro seeding*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl das Volllängenprotein (XPAfl) als auch dessen DNA-Bindedomäne (XPAs) erfolgreich kloniert und in *E. coli* überexprimiert werden konnten. Durch EMSA-Studien wurde bewiesen, dass XPA an NER relevante Substrate, wie Acetylaminofluoren und Cisplatin, mit hoher Affinität bindet. Auch Fluorescein-modifizierte DNA wird durch das Protein erkannt. Diese *bulky adduct* ähnliche Struktur fungiert

bekanntlich als NER Substrat.^{56,133} Kristallisationsexperimente mit dem DNA-bindenden Fragment und Fluo- bzw. AAF-geschädigten Oligonukleotiden ergaben keine messbaren Kristalle. In Zukunft wäre eine weitere Optimierung der Kristallisationsexperimente nötig, um hochauflösende Protein-DNA Co-Kristalle für eine Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Dies würde einen atomaren Einblick in den Mechanismus der Schadenserkennung durch XPA in der NER verschaffen.

6.2 Das Hefeprotein Rad14

6.2.1 Allgemeines

Als Alternative zum humanen XPA wurde sein Hefehomolog aus *S. cerevisiae*, das Rad14 Protein, untersucht. Mit einer Sequenzidentität beider Proteine von 27%⁹⁰ eignet sich Hefe als attraktiver Modellorganismus zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der NER Schadenserkennung in Eukaryoten.

Rad14 ist ein hydrophiles Protein, welches aus 371 Aminosäuren (43 kDa) besteht und auch ein Zinkfingermotiv enthält. Die Expression des Volllängenproteins wurde zum ersten Mal 1993 von Guzder *et al.* beschrieben und erfolgte in *S. cerevisiae*.¹³⁶ Einige Jahre später konnte eine um neun Aminosäuren N-terminal verkürzte Version ($\Delta 9\text{NRad14}$) mit denselben Eigenschaften wie das Volllängenprotein in *E. coli* exprimiert werden.¹³⁷ Die DNA-bindende Domäne von Rad14 (Aminosäuren 188 – 306, Rad14s) besteht aus 120 Aminosäuren und hat eine Größe von 15 kDa. Das Rad14s sowie eine um vier Aminosäuren C-terminal verkürzte Version ($\Delta 4\text{CRad14s}$) und eine Mutante dieser Version ($\Delta 4\text{CRad14}_{\text{SF262A}}$) wurden für diese Arbeit kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Tabelle 6.3 gibt einen Überblick über die verschiedenen Rad14 Konstrukte, die in dieser Arbeit für biochemische und strukturelle Versuche verwendet wurden.

Tabelle 6.3: Übersicht über die verschiedenen Rad14 Konstrukte.

Protein	Plasmid	Variante	Affinitätstag
Rad14s	pPSG-IBA3	DNA-Bindedomäne	C-term. Strep-tagII
$\Delta 4\text{CRad14s}$	pPSG-IBA35	C-terminal verkürzte Version der DNA-Bindedomäne	N-term. 6xHis-tag
$\Delta 4\text{CRad14}_{\text{SF262A}}$	pPSG-IBA35	C-terminal verkürzte Version der DNA-Bindedomäne	N-term. 6xHis-tag

6.2.2 Klonierung und heterologe Expression von Rad14

Die PCR-Amplifikation und Klonierung von Rad14s wurden von *Dr. Ralf Strasser* durchgeführt.⁸⁷ Gemäß Abschnitt 5.2.2.7 wurden die PCR-Produkte von $\Delta 4\text{CRad14s}$ und $\Delta 4\text{CRad14s}_{\text{F262A}}$ mit Hilfe der *StarGate*[®] Methode in die jeweiligen Destinationsvektoren überführt (Tabelle 6.3). In Abbildung 6.7 sind die Vektorkarten der beiden Rad14-Konstrukte dargestellt.

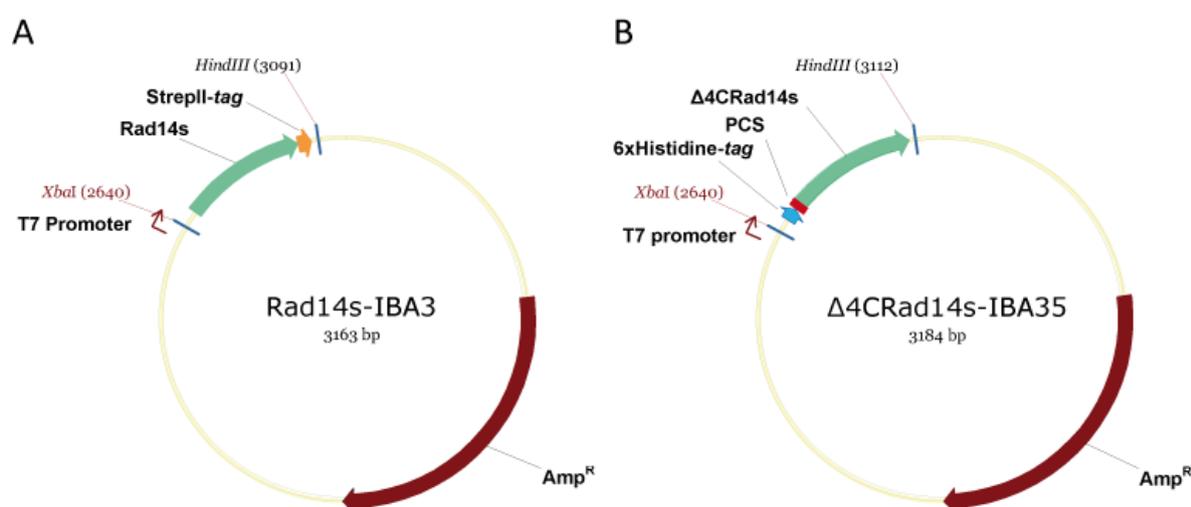


Abbildung 6.7: Vektorkarten der A) Rad14s-IBA3 und B) $\Delta 4\text{CRad14s-IBA35}$. PCS: *PreScission*[®] *Cleavage site*. Rot: Antibiotika-Resistenz; grün: Protein; hellblau: 6x His-tag; orange: Strep-tagII.

Die erzeugten Destinationsvektoren wurden in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert (Tabelle 6.4). Die Proteinexpression erfolgte gemäß der Abschnitte 5.2.1.3.1 und 5.2.1.3.2. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht der optimalen Expressionsbedingungen der Rad14s Proteine.

Tabelle 6.4: Darstellung der optimalen Expressionsbedingungen von Rad14s, $\Delta 4\text{CRad14s}$ und SeMet Rad14.

Protein	Rad14s/ $\Delta 4\text{CRad14s}$	SeMet Rad14s
<i>E. coli</i> Stamm	BL21(DE3)	B834(DE3) <i>pLysS</i>
OD ₆₀₀	0.8	0.6
Induktion	IPTG (1 mM)	IPTG (1 mM)
Induktionstemperatur	25 °C	20 °C
Schüttlergeschwindigkeit	225 rpm	225 rpm
Dauer der Induktion	3 h	16 h
Zusatz	ZnCl ₂ (10 μM)	ZnCl ₂ (10 μM)

6.2.3 Aufreinigung von Rad14

6.2.3.1 Rad14s

Das mit einem C-terminalen Strep-*tagII* versehene Rad14s Protein konnte mittels Strep-Tactin[®]-Säule (Abbildung 6.8 A) und MonoQ-Säule (Abbildung 6.8 B) aufgereinigt werden. Das Protein wurde anschließend in Rad14 Puffer A umgepuffert und bis zu einer Konzentration von 5 mg/mL aufkonzentriert. Die Aufreinigung von Selenomethionin substituiertem Rad14s erfolgte identisch, nur dass jedem Puffer DTT (10 mM) zugefügt wurde, um eine Oxidation der Selenomethionine zu verhindern. In der SDS-PAGE (Abbildung 6.8 C) erkennt man das aufgereinigte Rad14s Protein (Spur 7), das eine Größe von etwa 15.5 kDa aufweist (Rad14s: 14 329 Da + Strep-*tagII*: 1 255 Da).

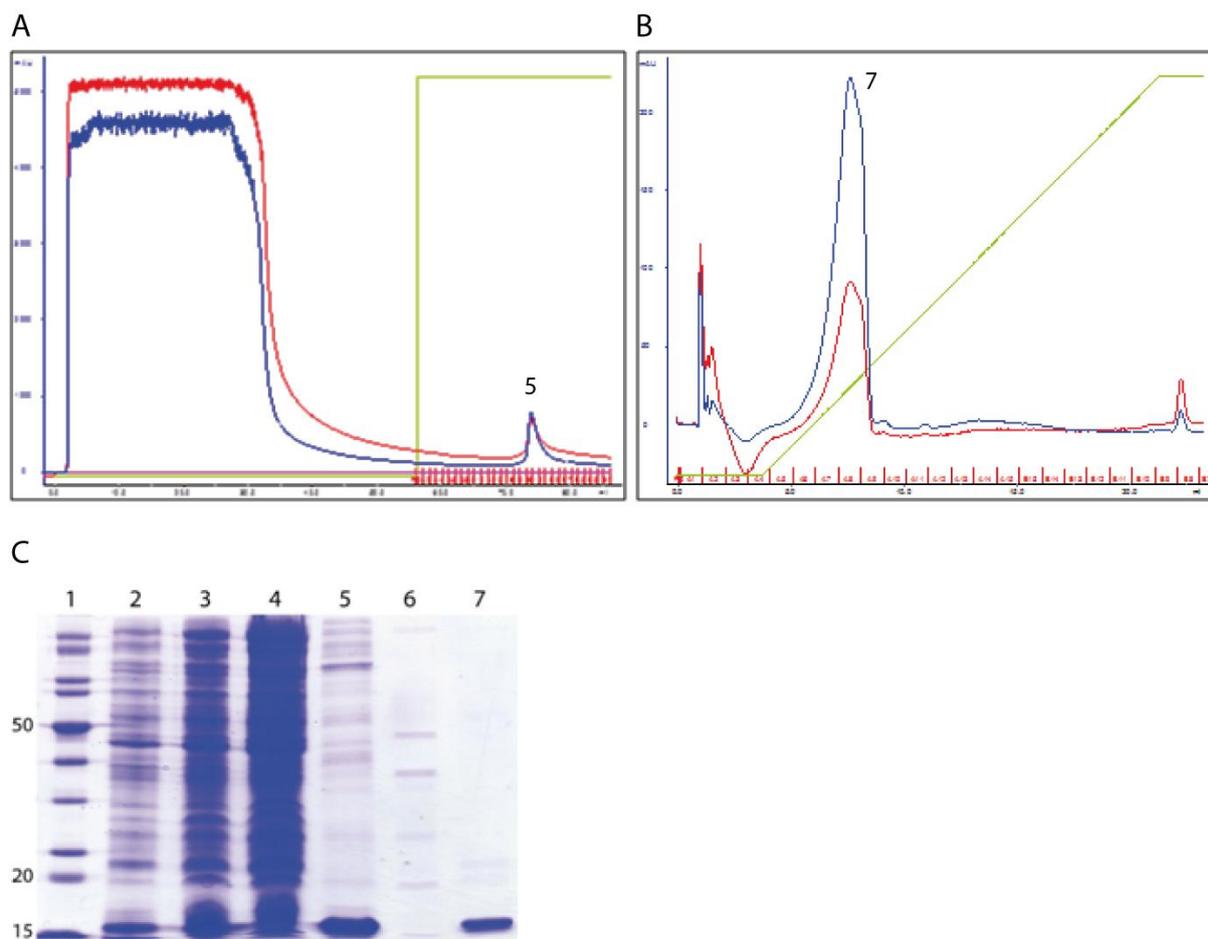


Abbildung 6.8: Chromatogramme der Aufreinigungsschritte und SDS-PAGE der Reinigungsschritte von Rad14s. x-Achse: Retentionszeit (min); y-Achse: Absorption (mAU); blau: Absorption bei 280 nm, rot: Absorption bei 260 nm; pink: Absorption bei 230 nm; grün: Gradient des Elutionspuffers. A) Strep-tagII Aufreinigung. B) Aufreinigung über eine MonoQ-Säule. C) SDS-PAGE der einzelnen Reinigungsschritte von Rad14s. 1: Proteinstandard *PageRuler*TM, 2: Zellextrakt vor der Induktion, 3: Zellextrakt nach der Induktion, 4: Protein nach Aufschluss der Zellen, 5: Rad14s-Eluat der Strep-Tactin®-Säule, 6: Durchfluss der MonoQ-Säule, 7: Rad14s-Eluat der MonoQ-Säule.

6.2.3.2 $\Delta 4\text{CRad14s}$ und $\Delta 4\text{CRad14s}_{\text{F262A}}$

Bei dem Destinationsvektor pPSG-IBA35 handelt es sich um einen Vektor mit T7 Promotor, welcher das Protein mit einem N-terminalen 6xHistidin-tag versieht. Das Protein wurde somit in einem ersten Schritt mittels Ni-NTA-Chromatographie (Abbildung 6.9 A) aufgereinigt. Als zweiter Reinigungsschritt diente die Anionenaustauscher-Chromatographie mit einer MonoQ-Säule (Abbildung 6.9 B). Ein letzter Reinigungsschritt erfolgte mittels der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 6.9 C). Proteinenthaltende Fraktionen wurden mittels

SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, in Kristallisationspuffer umgepuffert und bis zu einer Konzentration von 5 mg/mL aufkonzentriert. Nach Schockfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff, wurden diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die SDS-PAGE (Abbildung 6.9 D) zeigt das aufgereinigte $\Delta 4\text{CRad14s}$ Protein (Spur 8) mit eine Größe von etwa 16 kDa ($\Delta 4\text{CRad14s}$: 13 793 Da + His-tag: 1 203 Da + *PreScission*[®] Protease Spaltstelle: 1 033 Da)

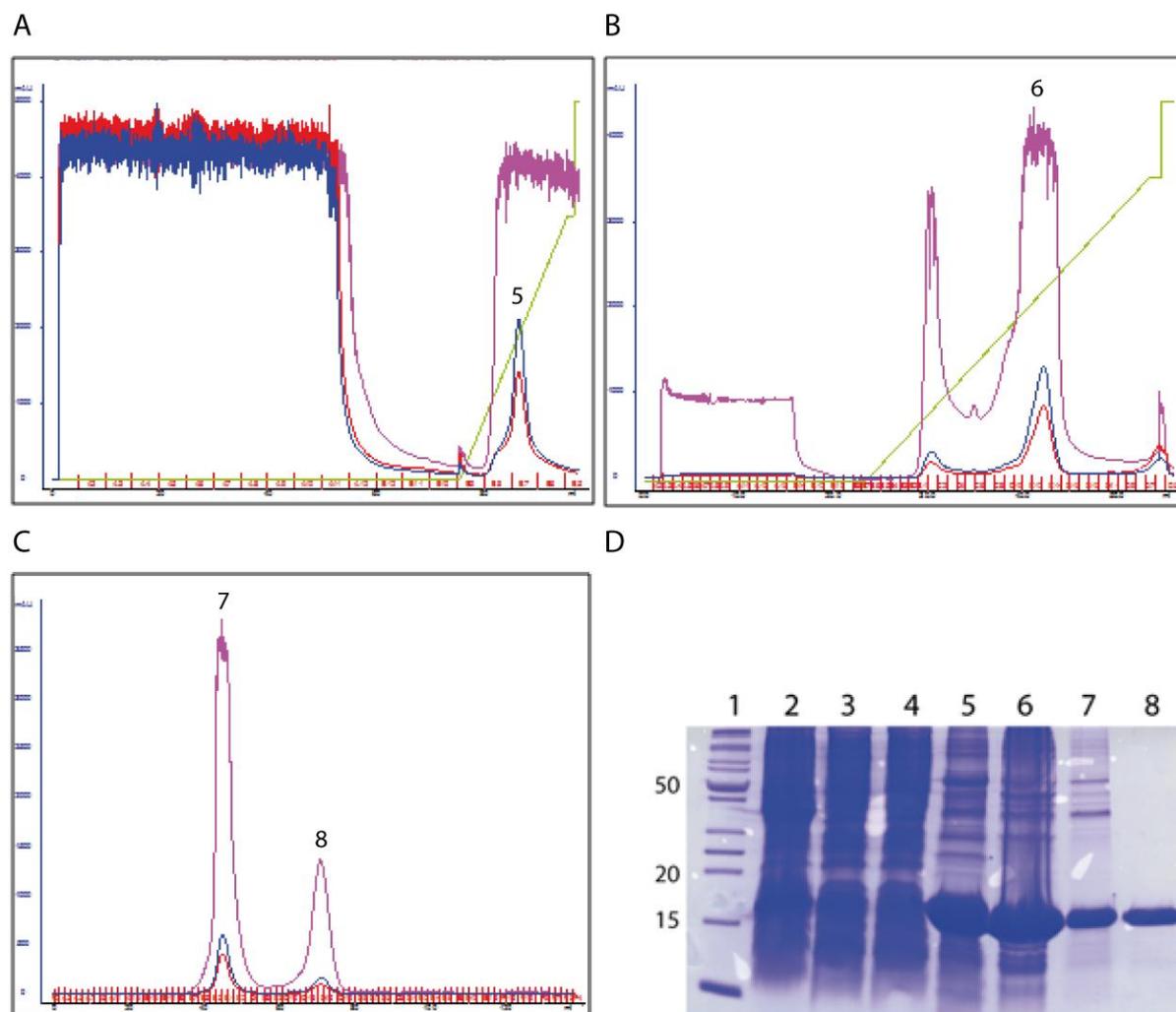


Abbildung 6.9: Chromatogramme der Aufreinigungsschritte und SDS-PAGE der Reinigungsschritte von $\Delta 4\text{CRad14s}$. x-Achse: Retentionszeit (min); y-Achse: Absorption (mAU); blau: Absorption bei 280 nm, rot: Absorption bei 260 nm; pink: Absorption bei 230 nm; grün: Gradient des Elutionspuffers. A) Ni-NTA-Säule, B) MonoQ-Säule, C) Superdex 75 Säule, D) SDS-PAGE der verschiedenen Aufreinigungsschritte: 1: Proteinstandard *PageRuler*[™], 2: Zellextrakt vor der Induktion, 3: Zellextrakt nach der Induktion, 4: Lysat nach Aufschluss der Zellen, 5: Protein-Eluat der Ni-NTA-Säule, 6: Protein-Eluat der MonoQ-Säule, 7: Protein-Eluat der Superdex 75 Säule, 8: Protein-Eluat der Superdex 75 Säule.

6.2.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Auch mit dem Hefeprotein Rad14 wurden Bindungsstudien mit unterschiedlich geschädigten Oligonukleotiden durchgeführt. Fluorescein- und radioaktiv-markierte DNA wurde dazu verwendet.

6.2.4.1 EMSA mit Fluorescein-markierter DNA

Das Fluorescein wurde hier einerseits als Marker für die Detektion und andererseits als Substrat von Rad14s, eingesetzt. Für die EMSA-Experimente wurden intern Fluo-markierte dsDNA (2 μM) und verschiedene Konzentrationen an Protein (0 – 20 μM) in Bindungspuffer 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Fluoreszenz der Gele wurde am *Image Reader* LAS3000 ausgelesen. Abbildung 6.10 zeigt die Ergebnisse der EMSA-Experimente von Rad14s und Fluo-dU-DNA. Um festzustellen ob sich bei einer höheren Proteinkonzentration ein (Rad14)₂-DNA-Komplex bildet, wurde Protein in zehnfachem Überschuss zugegeben (Abbildung 6.10 B).

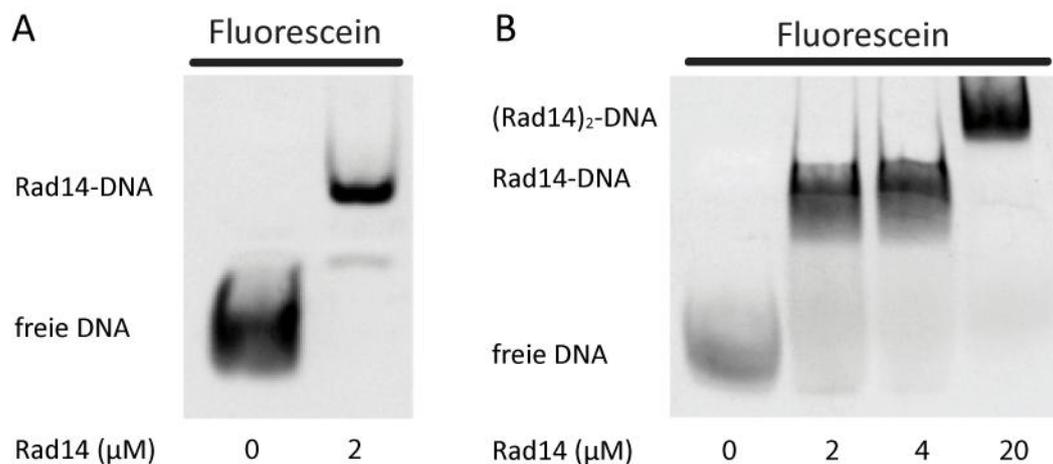


Abbildung 6.10: Fluoreszenzaufnahme der nativen Polyacrylamidgele. A) EMSA-PAGE von Rad14s mit Fluorescein-markierter 15mer dsDNA (ODN10). B) Bei hoher Proteinkonzentration (10facher Überschuss) erkennt man eine weitere Verschiebung der Banden.

Die EMSA-PAGE zeigen eine deutliche Verschiebung der DNA-Banden in Anwesenheit des Proteins. Rad14s weist also eine Affinität zu Fluo-geschädigte DNA auf. Bei steigender Konzentration an Protein erkennt man eine zweite Bande im Gel, welche auf eine

Dimerisierung des Proteins hinweist. Rad14s bildet also in Anwesenheit von geschädigter DNA ein Homodimer. Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur für das XPA Protein beschrieben.^{88,89}

6.2.4.2 EMSA mit radioaktiv-markierter DNA

Weil das Fluorescein als artifizielles Substrat in der NER fungiert, zeigt es wie schon beschrieben immer eine Bindung des Proteins an die DNA, wenn es als Marker verwendet wird. Um die Bindungsaffinität von Rad14s an NER relevante Schäden zu untersuchen, wurden deshalb EMSA-Gele mit ³²P-radioaktiv-markierter DNA durchgeführt. Durch die radioaktive Markierung wird die DNA strukturell nicht verändert. Die Inkubation der Proben erfolgte 30 min bei 30 °C. Die verwendeten Schäden sind typische NER Substrate, wobei der CPD-Schaden die schwächste NER Antwort hervorruft.⁵⁰ Für die Synthese von AAF-dG,¹³⁸⁻¹⁴⁰ AF-dG und CPD¹⁴¹-geschädigte Oligonukleotide wurden die Phosphoramidite der Schäden synthetisiert und durch Festphasensynthese^{142,143} in DNA-Einzelstränge eingebaut. Die 1,2-GG Cisplatin und (6-4)PP enthaltenen Oligonukleotide wurden hergestellt, indem einzelsträngige DNA entweder mit Cisplatin^{47,144} oder durch Belichtung mit UV-Strahlung (254 nm) unter Luftausschluss behandelt wurden.¹⁴⁵ Nach Aufreinigung der Einzelstränge mittels HPLC (>99% Reinheit) wurden diese mit den komplementären ³²P-markierten Gegensträngen zu einem stabilen Duplex hybridisiert. Abbildung 6.11 zeigt die EMSA-Gele von Rad14s mit unterschiedlich geschädigter dsDNA.

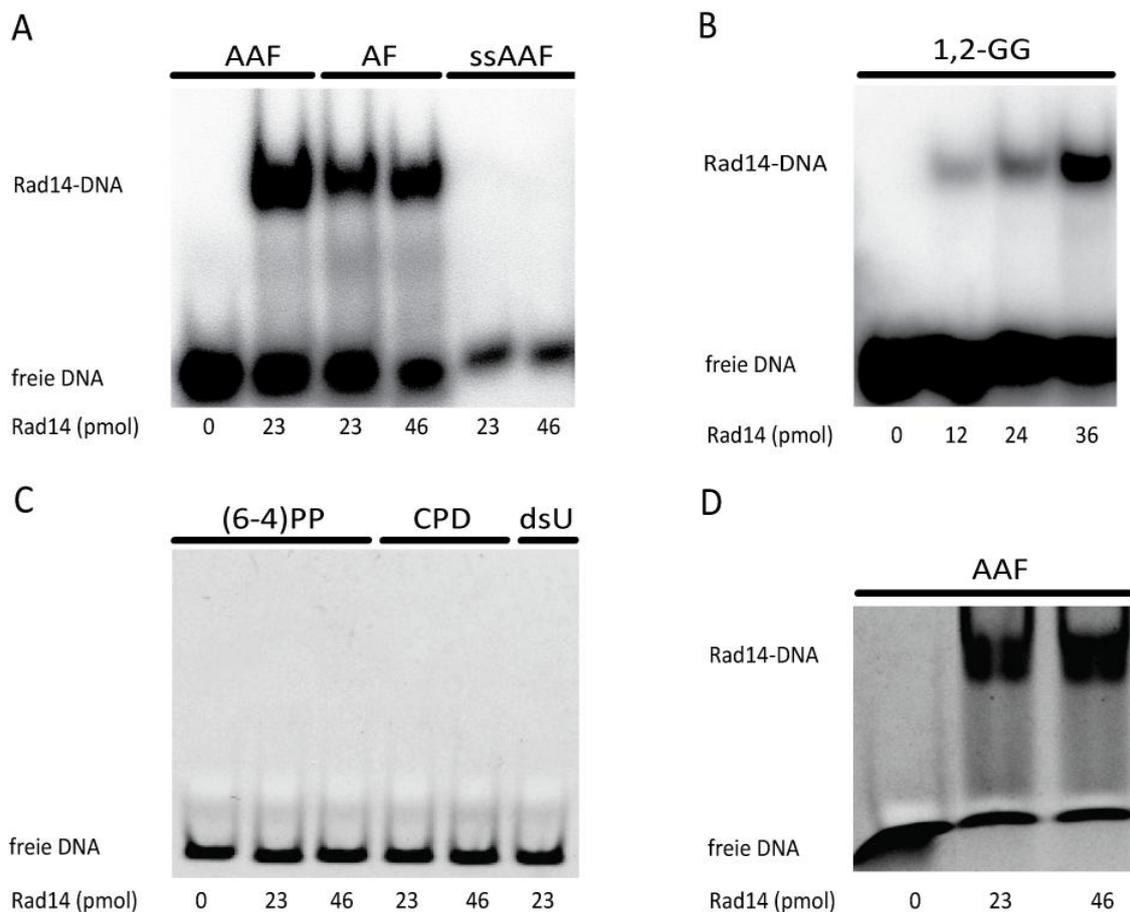


Abbildung 6.11: DNA-Bindungsstudien von Rad14s mit verschiedenen DNA-Schäden. A) Studie mit AAF-dG und AF-dG geschädigte dsDNA bzw. ssDNA (ODN7). B) Studie mit 1,2-GG Cisplatin (ODN5) geschädigter dsDNA. C) Studie mit den UV-Schäden (6-4)PP und CPD (ODN9) sowie mit ungeschädigter dsDNA. D) Studie mit AAF-dG geschädigte 34mer dsDNA (ODN8).

Die EMSA-Studien zeigen eine deutliche Affinität von Rad14 an *bulky adducts* und Cisplatin-Schäden. Sowohl AAF-dG als auch AF-dG sind hervorragende Substrate für eine NER Antwort.⁵⁰ AAF-dG wird jedoch stärker gebunden als AF-dG (Abbildung 6.11 A) und auch *in vivo* konnte dieses Phänomen nachgewiesen werden.¹⁴⁶ Einzelsträngige AAF-dG enthaltene DNA hingegen wird nicht durch das Protein gebunden. Dieses Phänomen unterstreicht, dass Rad14 zur Schadenserkenkung doppelsträngige DNA als Substrat benötigt. Es wird ebenfalls keine Komplexbildung zwischen dem Protein und den UV-Schäden CPD und (6-4)PP beobachtet (Abbildung 6.11 C), obwohl es sich z. B. bei (6-4)PP um ein exzellentes NER Substrat handelt.⁵⁰ Diese Schäden beeinflussen die DNA Struktur und Stabilität nur wenig⁸⁵ und werden vermutlich durch andere NER Proteine wie Rad4 (XPC) und UV-DDB (XPE) erkannt.^{79,81} Das Ergebnis deutet darauf hin, dass Rad14 nur Schäden erkennt, die zur

Destabilisierung der Doppelhelix führen. Um festzustellen, ob auch längere DNA Oligonukleotide von dem Protein gebunden werden, wurde ein EMSA-Experiment mit einem 34mer AAF-dG (ODN8) enthaltenen DNA-Strang gemacht. Das Gel zeigt die Anwesenheit eines Protein-DNA Komplexes (Abbildung 6.11 D), so dass die Länge des DNA-Stranges keine Rolle für die Bindungsaffinität zu spielen scheint.

In Abbildung 6.12 ist ein EMSA-Experiment von Rad14s mit AAF-geschädigter DNA zu sehen. Hier wurde Protein in großem Überschuss (1:10) zugegeben, um festzustellen ob sich bei einer höheren Konzentration an Protein ein (Rad14)₂-DNA-Komplex bildet.

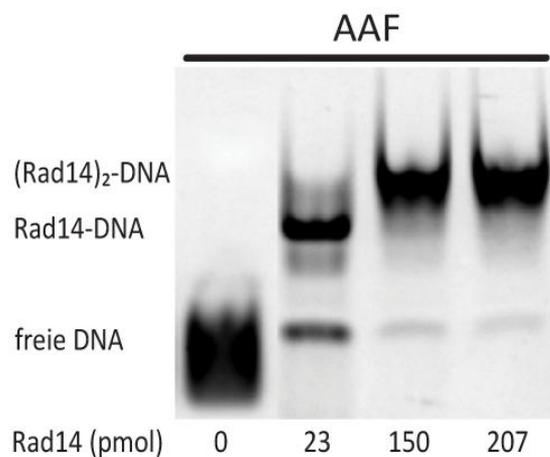


Abbildung 6.12: EMSA-PAGE von Rad14s mit AAF-geschädigter DNA (ODN1). Bei steigender Konzentration an Protein bildet sich eine zweite Bande auf dem Gel was auf einen (Rad14)₂-DNA-Komplex deutet.

Bei einem zehnfachen Überschuss an Protein bildet Rad14 ein Homodimer und bindet an die AAF-dG geschädigte DNA als 2:1 Komplex. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine kooperative Bindung.

6.2.5 Western Blot: Bestätigung des (Rad14)₂-DNA-Komplexes

Um herauszufinden, ob das Rad14s als Dimer an die geschädigte DNA bindet, wurde ein Versuch mit Hilfe des Western Blots durchgeführt. Der Aufbau des Versuchs ist in Abbildung 6.13 dargestellt. Dazu wurden zwei verschieden *getaggte* Rad14s Proteine (Rad14_{Strep} und Rad14_{His}) mit AAF-dG oder Fluo-dU geschädigter DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im

Durchfluss sollte sich Rad14_{Strep} und Rad14_{Strep}-DNA befinden. Eluierte man mit Imidazol (500 mM) erhielt man alle His-*getaggt* Proteine: als Monomer, als Dimer und im Komplex mit dsDNA oder mit Rad14_{Strep}. Daraufhin wurde zur Detektion von Strep-*getaggt* Protein ein Western Blot durchgeführt, wobei mit einem Strep-Tactin[®]-HRP konjugierten Antikörper (IBA) detektiert wurde. Konnte nach Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie Strep-*getaggt* Protein auf dem Western Blot identifiziert werden, so deutete das auf die Komplexbildung von Rad14_{Strep} und Rad14_{His} mit dsDNA hin und eine Dimerbindung des Proteins an die geschädigte DNA konnte somit bestätigt werden.

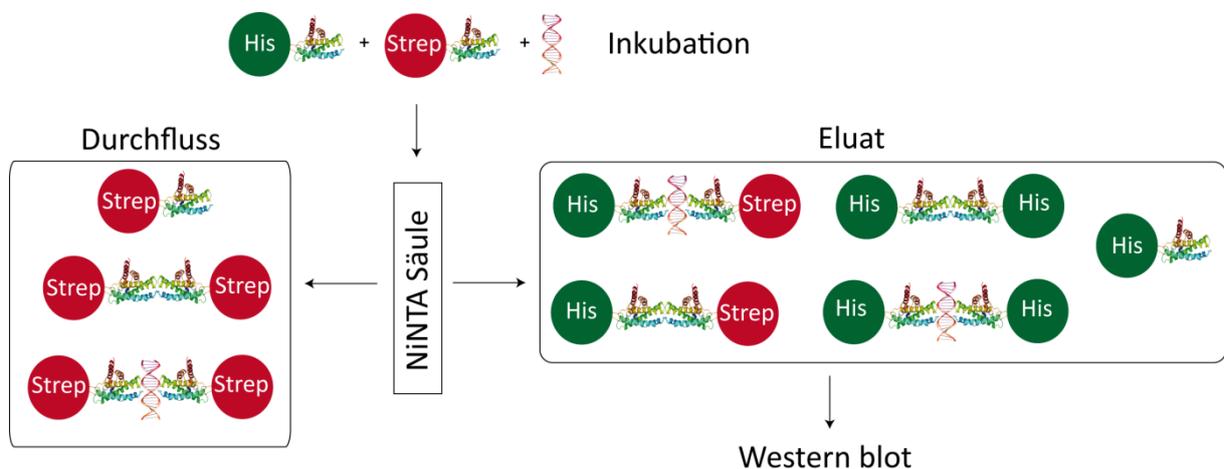


Abbildung 6.13: Schema zur Durchführung des Versuches, um herauszufinden ob ein oder zwei Proteine an die geschädigte DNA binden. Die DNA wurde mit Rad14_{His} (grün) und Rad14_{Strep} (rot) inkubiert, der Komplex über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend Rad14_{Strep} über einen Western Blot mit einem Strep-Tactin[®]-HRP konjugierten Antikörper detektiert.

Das Protein wurde mit der geschädigten DNA im Verhältnis 2:1 vermischt und 30 min bei 4 °C inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Anschließend wurde der Komplex mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach Elution mit Imidazol (500 mM) wurden die Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen und anschließend gemäß Abschnitt 5.2.3.10 der Western Blot durchgeführt. Für die Durchführung des Versuchs wurde ein Ansatz gemäß Tabelle 6.5 vorbereitet. In Abbildung 6.14 sind die SDS-PAGE Daten und der Western Blot zu sehen.

Tabelle 6.5: Ansatz für den Western Blot Versuch.

	1	2	3	4	5	6	7
Protein	Rad14 _{His}	Rad14 _{Strep}	Rad14 _{His} Rad14 _{Strep}	Rad14 _{His} Rad14 _{Strep}	Rad14 _{His} Rad14 _{Strep}	Rad14 _{His}	Rad14 _{Strep}
dsDNA				AAF-dG (ODN1)	Fluo-dU (ODN10)	AAF-dG (ODN1)	AAF-dG (ODN1)

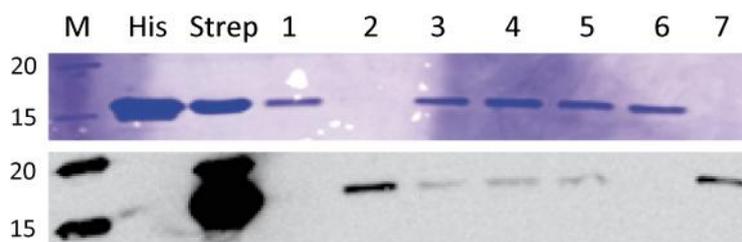


Abbildung 6.14: SDS-PAGE und Western Blot. His: Positivkontrolle mit Rad14_{His} Protein (bzw. Strep: Rad14_{Strep}) Protein. Fraktionen 1–7 sind der Tabelle 6.5 zu entnehmen. Diese wurden der Ni-NTA-Affinitätschromatographie und dem Western Blot unterzogen.

Die SDS-PAGE zeigt keine Anwesenheit von Protein in den Spuren 2 und 7, was darauf hindeutet, dass das Strep-getaggte Protein bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie von dem Gemisch abgetrennt wurde. Im Western Blot sind jedoch in den Spuren 2 und 7 deutliche Banden zu erkennen, was auf die Anwesenheit von Rad14_{Strep} hindeutet. Die Detektion von Western Blots ist deutlich sensitiver als die einer SDS-PAGE und somit kann auf der SDS-PAGE (Spuren 2 und 7) kein Protein detektiert werden, weil dessen Menge zu gering ist. Der Versuch lieferte somit kein eindeutiges Ergebnis, weil die Negativkontrollen (Spuren 2 und 7) sich als positiv erwiesen. Um herauszufinden, ob Rad14 als Monomer oder Dimer an geschädigte DNA bindet, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. In Abschnitt 6.2.9.1 ist der *Crosslinking* Versuch beschrieben.

6.2.6 Kristallisation von Rad14

6.2.6.1 Verwendete DNA-Stränge

Für die Kristallisation von Rad14s wurden zwei bestimmte Schäden analysiert: Das AAF-dG und das 1,2-GG Cisplatin. Die Reparatur von Cisplatin-Schäden kann zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika führen, was ein Hauptproblem der Chemotherapie darstellt.¹⁴⁷

Neben *intrastrand crosslinks* kann das NER System eine Vielfalt an sperrigen DNA Addukten, die durch Umweltkarzinogene erzeugt werden, reparieren.^{37,148,149} Diese Schäden kommen häufig vor und sind charakteristische NER Substrate.⁵⁰ Weiterhin konnte mit Hilfe von EMSA-Experimenten gezeigt werden, dass das Protein mit hoher Affinität an diese Schäden bindet. In Abbildung 6.15 sind die Sequenzen der kristallisierten Stränge sowie die Strukturformeln der Schäden, abgebildet.

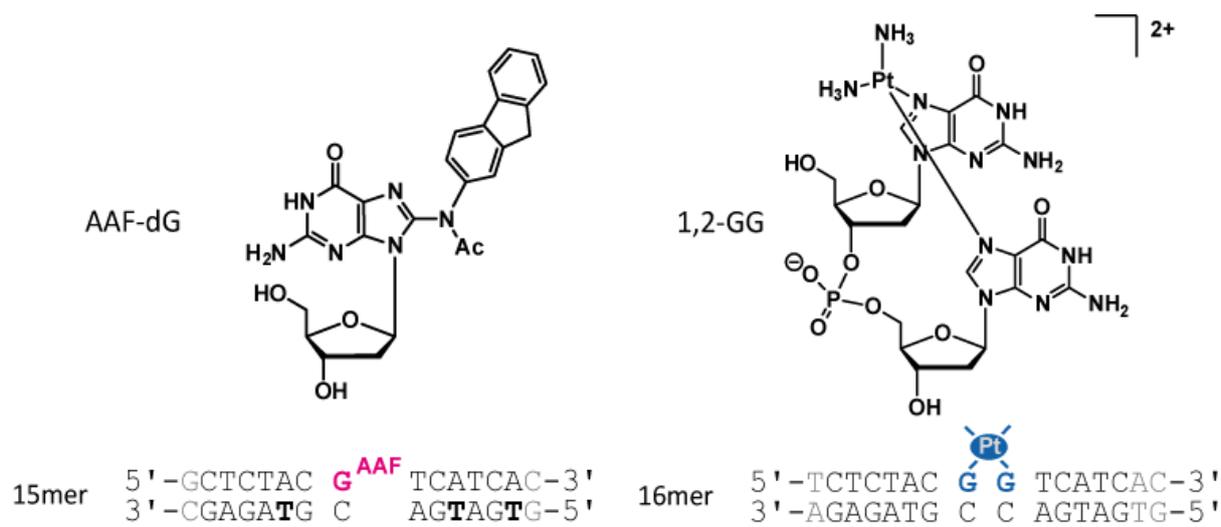


Abbildung 6.15: Strukturformeln der AAF-dG (ODN1) und 1,2-GG Cisplatin (ODN2) Schäden sowie die Sequenzen der mit Rad14 kristallisierten Stränge. Fett markierte Thyminide (T) wurden teilweise durch 5-Iodo- oder 5-Bromo-desoxyuridine substituiert.

6.2.6.2 Phasenbestimmung für die Strukturaufklärung der Rad14 Kristalle

Bei der Strukturaufklärung des Rad14-DNA Komplexes wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, um die experimentelle Phaseninformation mittels *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) zu ermitteln. Einerseits wurden alle drei Thyminide des Gegenstrangs durch 5-Bromo-deoxyuridine (5-Br-dU) oder 5-Iodo-deoxyuridine (5-I-dU) ersetzt. Andererseits wurde Selenomethionin-substituiertes Protein (SeMet Rad14) für die Kristallisation verwendet. Die jeweiligen Derivative kristallisierten unter denselben Bedingungen wie das native Protein bzw. die nicht-modifizierte DNA.

6.2.6.3 Kristallisation der DNA-bindende Domäne: Rad14s

6.2.6.3.1 Kristallisation von Rad14s und bromierte AAF-dG DNA

Rad14s wurde im Komplex mit einem 15mer AAF-dG enthaltenen dsDNA (ODN1) kristallisiert. Die Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit *Dr. Stefanie Schorr* gemacht. Für die Phasenbestimmung wurden die drei Thymidine des Gegenstrangs (Abbildung 6.15) durch 5-Bromo-desoxyuridin substituiert. Nach Erfassung der optimalen Proteinkonzentration mit dem Pre-Kristallisationstest (Abschnitt 5.2.5.1) wurden über 500 Bedingungen in einem Hochdurchsatz-Kristallisationsexperiments getestet. Die dadurch erhaltenen Kristalle (Classics Kit: 0.20 M Calciumacetat, 18% PEG 8000 und 0.1 M Natriumcacodylat pH 6.5) konnten in einem manuellen Screen um die initiale Bedingung reproduziert werden und zeigten eine plättchenförmige Morphologie (Abbildung 6.16, A). Das Protein wurde bei einer Konzentration von 5.5 mg/mL und im Verhältnis von Protein:DNA von 1:1.13 kristallisiert. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4 °C gelagert und erste Kristalle erschienen nach 2 – 5 Tagen.

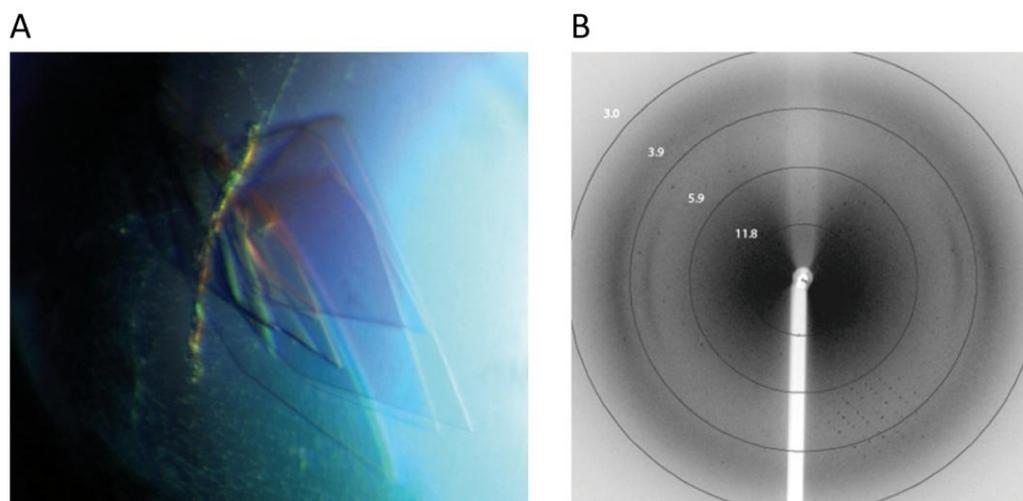


Abbildung 6.16: A) Co-Kristall von Rad14s im Komplex mit 5-Bromo-dU AAF-dG geschädigter DNA,¹⁵⁰ B) Röntgenbeugungsmuster des Rad14/AAF-dG Co-Kristalls.

Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der PXI MD2 Mikrodiffraktometer Strahlenlinie der *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) oder an der ID23-2 Strahlenlinie der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble,

Frankreich) gemessen und beugten Röntgenstrahlen bis 2.9 Å. Die Indizierung der gemessenen Daten ergab, dass die Rad14/AAF-dG Komplexkristalle zur orthorhombischen Raumgruppe $C222_1$ gehören, mit einer Einheitszelle von $a = 54.1 \text{ \AA}$, $b = 145.2 \text{ \AA}$, $c = 99.3 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Aufgrund der plättchenförmigen Morphologie sowie der geringen dicke in eine Dimension der Kristalle kam es zu anisotrope Röntgenbeugung. Es mussten hohe Strahlenintensitäten verwendet werden, um ausreichend Strahlenbeugung zu erhalten. Durch das daraus resultierende frühe Einsetzen von Strahlungsschäden, konnte kein vollständiger Datensatz erhalten werden.

6.2.6.3.2 Kristallisation von SeMet Rad14s und AAF-dG DNA

Da die ersten Kristalle nicht genug Informationen für die Strukturaufklärung des Komplexes lieferten, wurden weitere Bedingungen getestet. Hier wurde mit dem Selenomethionin-substituierten Protein und AAF-dG geschädigter DNA (ODN1) gearbeitet. Bei einer Proteinkonzentration von 5.8 mg/mL und einem molaren Verhältnis von Protein:DNA von 1:1 konnten in einem Hochdurchsatz-Kristallisationsexperiments unter folgenden Bedingungen erneut Kristalle gezüchtet werden: 0.1 M Calciumacetat, 0.1 M Tris pH 7.5, 22% PEG 8000. Die Kristallisationsexperimente wurden bei 4 °C angesetzt und gelagert. Kristalle erschienen nach 2–3 Tagen als feine, zusammengewachsene Plättchen. In Abbildung 6.17 ist ein Co-Kristall von SeMet Rad14s mit AAF-dG geschädigter DNA abgebildet sowie dessen Diffraktionsmuster.

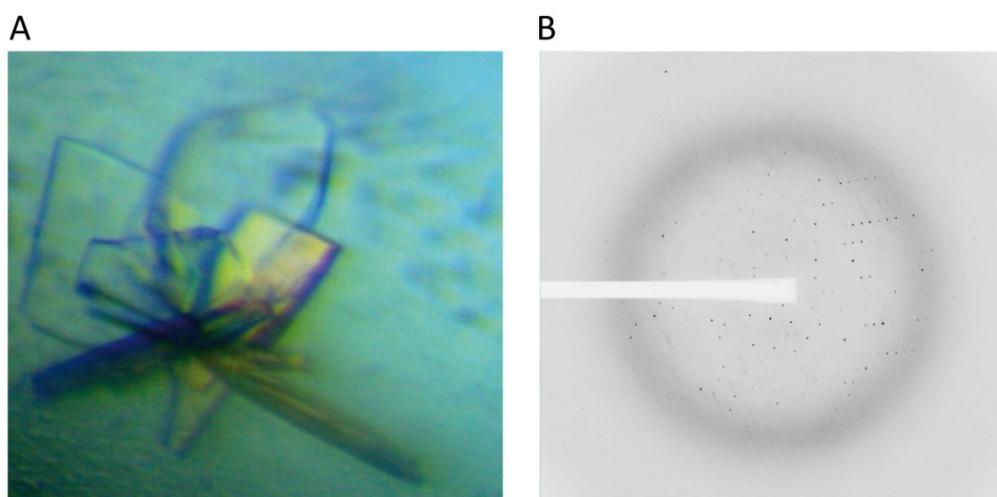


Abbildung 6.17: A) Co-Kristall von SeMet Rad14s im Komplex mit dG-AAF geschädigter DNA B) Diffraktionsmuster des Co-Kristalls.

Nach Schockfrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff, wurden diese an der PXI Mikrofocus Strahlenlinie der *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) vermessen und beugten Röntgenstrahlen bis 3.1 Å. Die Indizierung der gemessenen Daten ergab, dass die Rad14/AAF-dG Komplexkristalle zur monoklinen Raumgruppe $P2_1$ gehörten, mit einer Einheitszelle von $a = 66.4 \text{ \AA}$, $b = 51.7 \text{ \AA}$, $c = 68.8 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 112^\circ$.

Durch die niedrige Symmetrie der monoklinen Raumgruppe ($P2_1$) war die Multiplizität der Daten für die Lösung des Phasenproblems über SAD zu gering. Als Gegenmaßnahme wurden die Datensätze von vier verschiedenen Kristallen zusammen genommen, mit Hilfe von AUTOPROC^{119,121,151} prozessiert und die experimentellen Phasen mit Hilfe des anomalen Signals vom Selenomethionin mit PHENIX Autosol^{124,152} bestimmt. Das ermöglichte das Lösen der Proteinstruktur. Ein erstes Strukturmodell wurde mit Hilfe von PHENIX Autobuild^{124,125} gebaut. Die Elektronendichte reichte jedoch nicht aus, um die Orientierung der geschädigten DNA und somit die Position des AAF-dG Schadens eindeutig zu definieren. Weitere Kristallisationsexperimente mussten durchgeführt werden.

6.2.6.3.3 Kristallisation von SeMet Rad14s und bromierte AAF-dG DNA

Die Kristallisationsansätze wurden in Zusammenarbeit mit *Karola Gasteiger* gemacht. Hier wurde mit Selenomethionin-substituiertem Protein und AAF-dG geschädigter DNA (ODN1) gearbeitet. Um die Orientierung der DNA in der Kristallstruktur zu bestimmen, wurden die drei Thymidine des Gegenstrangs (Abbildung 6.15) durch 5-Bromo-desoxyuridin substituiert. Die Lokalisation der drei Bromatome sollte bei bekannter DNA-Sequenz die Bestimmung der DNA Orientierung ermöglichen und daraus die Position des Schadens definieren. Kristalle konnten unter denselben Bedingungen wie in Abschnitt 6.2.6.3.2 erhalten werden. Die Kristallisationsexperimente wurden bei 4 °C angesetzt und gelagert. Kristalle erschienen nach 5 Tagen als feine, zusammengewachsene Plättchen (Abbildung 6.18).

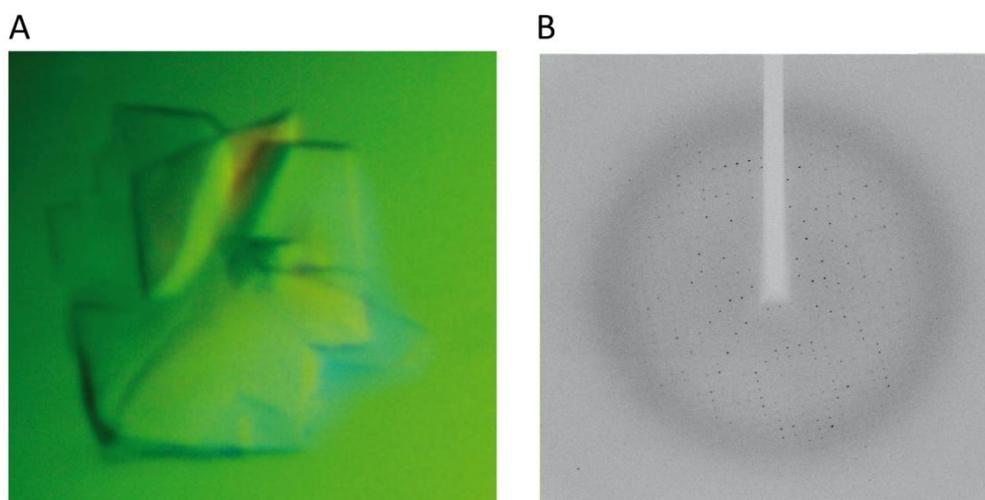


Abbildung 6.18: A) Co-Kristall von SeMet Rad14s in Komplex mit 5-Bromo-dU AAF-dG geschädigter DNA. B) Diffraktionsmuster des Co-Kristalls.

Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der PXI Pilatus Mikrodiffraktometer Strahlenlinie der *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) gemessen und beugten Röntgenstrahlen bis 3.2 \AA . Die Indizierung der gemessenen Daten ergab, dass der Co-Kristall zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ gehörte, mit einer Einheitszelle von $a = 50.1 \text{ \AA}$, $b = 66.2 \text{ \AA}$, $c = 118.1 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die erzeugten Daten mit Bromid-enthaltener DNA wurden daraufhin mit Hilfe der Daten der gelösten Proteinstruktur (Abschnitt 6.2.6.3.2) über molekularen Ersatz (MR) gelöst. Durch die Einwirkung der Röntgenstrahlung wurden jedoch teilweise die Bromide von der DNA abgespalten. Es war nur noch ein Bromatom sichtbar, so dass keine weitere Information zur DNA Orientierung erhalten werden konnte.

6.2.6.4 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Die bisher erhaltenen Kristallstrukturen ergaben nicht ausreichend Informationen über den Protein-DNA Komplex, deshalb wurden Maßnahmen getroffen, um die Kristallisation zu optimieren. Die Stabilität eines Proteins ist ein entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche Kristallisation. Sind flexible Bereiche im Protein vorhanden, so können diese die Kristallisation verhindern. Verschiedene Pufferbedingungen können die Stabilität beeinflussen und kürzere Proteinkonstrukte führen teilweise zu einer Verringerung der Flexibilität des Proteins.

6.2.6.4.1 Optimierung des Expressionskonstrukts

In der Kristallstruktur von Rad14s waren die vier letzten Aminosäuren (EKKY) am C-Terminus des Proteins in der Elektronendichte nicht lokalisiert, was anzeigt, dass diese ungeordnet sind. Diese Unordnung kann das Protein bei der Kristallisation stören und gegebenenfalls auch eine schlechtere Auflösung hervorrufen. Deshalb wurden diese vier Aminosäuren durch Klonierung entfernt und der C-terminale Strep-tagII durch einen N-terminalen His-tag substituiert. Das neue Proteinkonstrukt (Δ 4CRad14s) sollte optimal für die Kristallisation geeignet sein. Die Sequenzen der verschiedenen Rad14-Konstrukte sind im Anhang aufgelistet.

6.2.6.4.2 Limitierte Proteolyse von Rad14s und Δ 4CRad14s

Um zu untersuchen, ob das neu klonierte Proteinkonstrukt stabil war, wurden sowohl Rad14s als auch Δ 4CRad14s einer limitierten Proteolyse unterzogen. Die Proteine (20 μ M) wurden mit steigenden Konzentrationen an Chymotrypsin, Trypsin und Papain versetzt. Nach 40-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μ L SDS-Auftragspuffer gestoppt und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 6.19 und Abbildung 6.20).

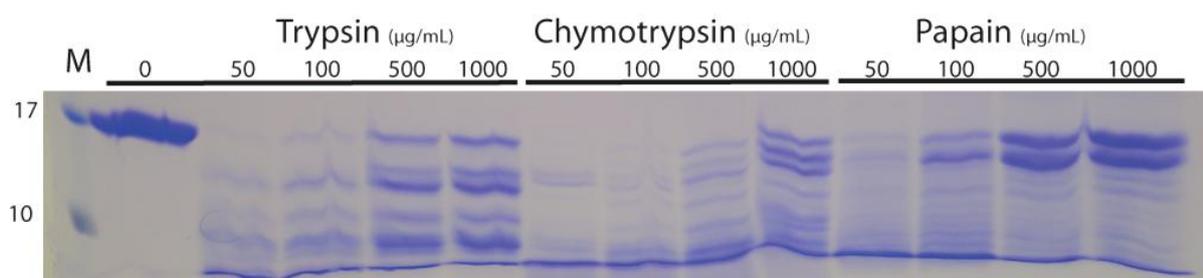


Abbildung 6.19: SDS-PAGE der limitierten Proteolyse von Rad14s. M: Proteinstandard, 1: unverdautes Protein, 3 – 14: verdautes Protein mit verschiedenen Proteasen.

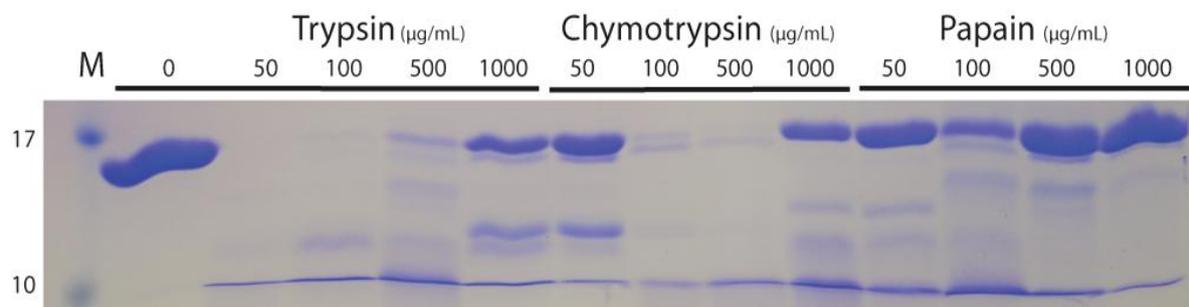


Abbildung 6.20: SDS-PAGE der limitierten Proteolyse von $\Delta 4\text{CRad14s}$. M: Proteinstandard, 1: unverdautes Protein, 3 – 14: verdautes Protein mit verschiedenen Proteasen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass Rad14s empfindlich gegenüber Proteolyse ist. Das Protein wird degradiert und weist in der SDS-PAGE mehrere Banden auf. $\Delta 4\text{CRad14s}$ hingegen ist deutlich stabiler, da der Großteil vom Protein vor Degradation geschützt zu sein scheint. Dies deutet auf eine sehr kompakte Faltung hin, bei der die genutzten Proteasen keine geeignete Region zum spalten finden. Das Entfernen der vier C-terminalen Aminosäuren durch Umklonierung hat also zu einem deutlich stabileren Proteinkonstrukt geführt, welches sich möglicherweise besser für die Proteinkristallisation eignet.

6.2.6.4.3 Thermofluor Experiment von Rad14

Um herauszufinden welcher Puffer für die Stabilität des Proteins optimal war, wurde ein Thermofluor Versuch durchgeführt. In 96 verschiedenen Bedingungen wurden unterschiedliche Puffer mit diversen pH-Werten, Salzen, Glycerinkonzentrationen sowie verschiedenen Reduktionsmitteln (DTT, β -Mercaptoethanol) getestet. Für das Ansetzen der vielen Bedingungen wurde ein *Liquid Handling* Roboter verwendet. Der Ansatz wurde, wie in Abschnitt 5.2.4.5 beschrieben, vorbereitet und die Proben in die *Real Time* PCR Maschine gegeben. In Abbildung 6.21 sind die sieben besten Entfaltungskurven von $\Delta 4\text{CRad14s}$ dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Protein mit einer Entfaltungstemperatur von 56 °C in Puffer B1 (Kristallisationspuffer) am stabilsten ist.

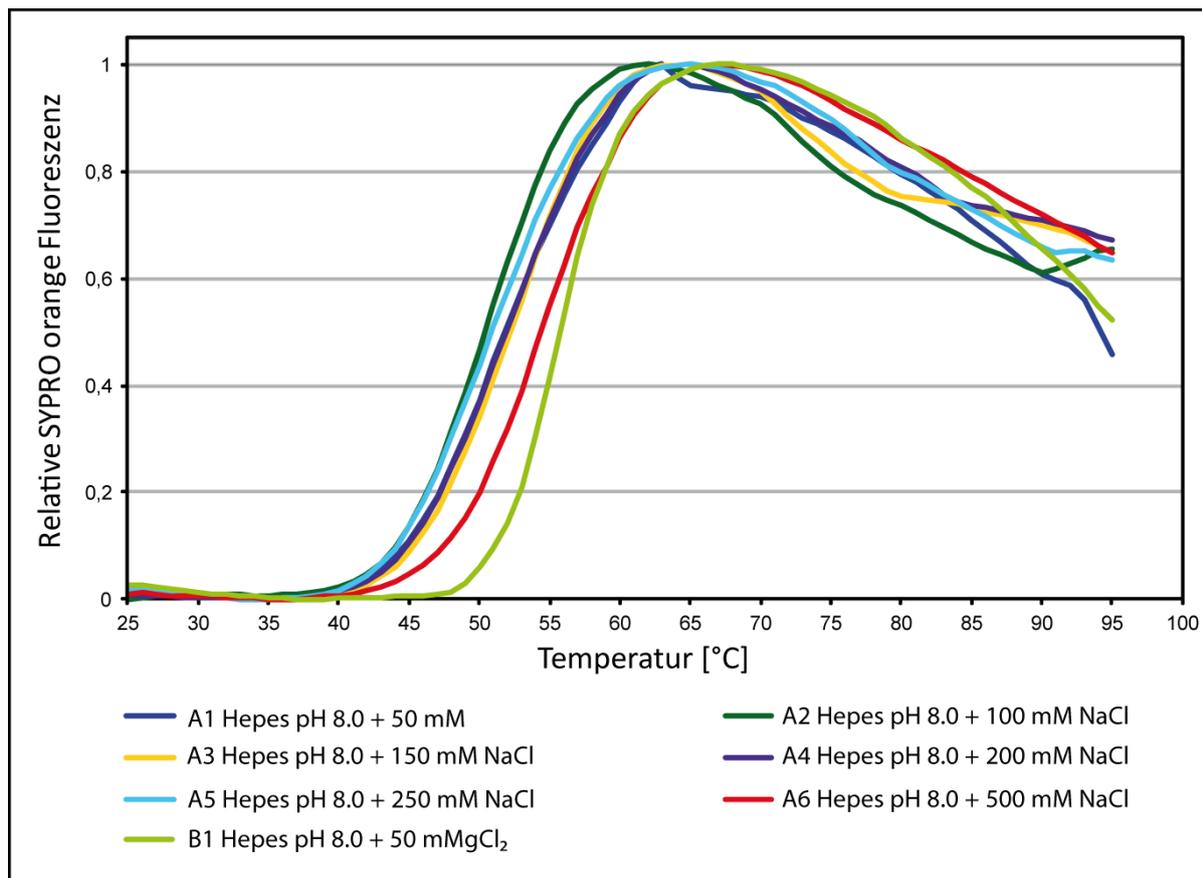


Abbildung 6.21: Entfaltungskurven von $\Delta 4\text{CRad14s}$ in sieben verschiedenen Puffern.

6.2.6.4.4 Iod-modifizierte DNA

Um die korrekte Orientierung der DNA und somit die Position des AAF-dG Schadens in der Struktur herauszufinden, wurden die drei Thymidine des DNA-Gegenstrangs durch 5-Iodo-dU statt 5-Bromo-dU ersetzt. Das größere Iodatombesitzt eine höhere Elektronendichte und ergibt somit bei der Messung durch Röntgenstrahlung ein stärkeres Signal.

6.2.6.5 Kristallisation der DNA-bindende Domäne: $\Delta 4\text{CRad14s}$

6.2.6.5.1 Kristallisation von $\Delta 4\text{CRad14s}$ und iodierter AAF-dG DNA

Wie in Abschnitt 6.2.6.4 besprochen wurden mehrere Maßnahmen getroffen, um die Proteinkristallisation zu optimieren. Zur Bestimmung der DNA-Orientierung in der Kristallstruktur wurden die Kristalle mit AAF-dG geschädigte dsDNA (ODN1), welche im Gegenstrang drei 5-Iodo-deoxyuridine enthielt (Abbildung 6.15, fett markiert), angesetzt. Die Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit *Karola Gasteiger* angesetzt. Ein erstes Hochdurchsatz-Kristallisationsexperiment mit dem MPD Kit ergab eine neue Kristallform, welche eine tetragonal bipyramidale Form aufwies (Abbildung 6.22). Diese konnten in einem manuellen Ansatz um die initiale Bedingung (0.2 M Ammoniumnitrat, 40% (v/v) MPD) reproduziert werden. Das Verhältnis von Protein:DNA war 2:1 und die Proteinkonzentration betrug 3.0 mg/mL. Die Kristalle erschienen nach 5 – 8 Tagen bei 4 °C. Sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der ID29 Strahlenlinie der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) gemessen. Die Kristalle beugten die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 1.8 Å. Der Komplexkristall gehört zur tetragonalen Raumgruppe $P4_1$, mit einer Einheitszelle von $a = 53.8 \text{ \AA}$, $b = 53.8 \text{ \AA}$, $c = 130.4 \text{ \AA}$.



Abbildung 6.22: Co-Kristalle von $\Delta 4\text{CRad14s}$ im Komplex mit 5-Iodo-dU AAF-dG.

6.2.6.5.2 Kristallisation von $\Delta 4\text{CRad14s}$ und 1,2-GG Cisplatin DNA

Weitere Kristallisationsansätze des Proteins mit einem 1,2-GG Cisplatin geschädigten 16mer Doppelstrang (ODN2) wurden in Zusammenarbeit mit *Simon Geiger* durchgeführt. Unter denselben Bedingungen wie in Abschnitt 6.2.6.5.1 konnten in folgendem Puffer tetragonal bipyramidale Kristalle erhalten werden: 0.2 M Magnesiumacetat, 0.1 M MES pH 6.5 und 30% (w/v) MPD. Die Kristalle erschienen nach 25 Tagen bei 4 °C (Abbildung 6.23). Sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der Strahlenlinie ID23-2 der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) gemessen. Sie beugten die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 2.8 Å. Der Komplexkristall gehört zur tetragonalen Raumgruppe $P4_1$, mit einer Einheitszelle von $a = 54.4 \text{ \AA}$, $b = 54.4 \text{ \AA}$ und $c = 103.8 \text{ \AA}$.



Abbildung 6.23: Co-Kristalle von $\Delta 4\text{CRad14s}$ im Komplex mit 1,2-GG Cisplatin geschädigter DNA.

Tabelle 6.6 gibt einen Überblick der in dieser Arbeit angesetzten Kristallisationsexperimente der Rad14s und $\Delta 4\text{CRad14s}$ Proteine mit unterschiedlich geschädigten DNA Oligonukleotiden. Die Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistiken sind im Anhang tabelliert.

Tabelle 6.6: Überblick der Kristallisations-Datensätze der Rad14s und Δ 4CRad14s Proteine mit geschädigter DNA.

Protein	Rad14s	SeMet Rad14s	SeMet Rad14s	Δ 4CRad14s	Δ 4CRad14s
DNA	Br-AAF-dG	AAF-dG	Br-AAF-dG	I-AAF-dG	1,2-GG
c(Protein)	5.5 mg/mL	5.8 mg/mL	5.8 mg/mL	3.0 mg/mL	3.0 mg/mL
Protein:DNA	1:1.13	1:1	1:1	2:1	2:1
Puffer	0.2 M Ca-acetat 18% PEG 8000 0.1 M Na-cacodylat pH 6.5	0.1 M Ca-acetat 0.1 M Tris pH 7.5 22% PEG 8000	0.1 M Ca-acetat 0.1 M Tris pH 7.5 22% PEG 8000	0.2 M (NH ₄)NO ₃ 40% (v/v) MPD	0.2 M Mg-acetat 0.1 M MES pH6.5 30% (w/v) MPD
Temperatur	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C
Kristallform	Feine Plättchen	Feine Plättchen	Feine Plättchen	tetragonal bipyramidal	tetragonal bipyramidal
Auflösung	2.9 Å	3.1 Å	3.2 Å	1.8 Å	2.8 Å
Raumgruppe	C222 ₁	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁	P4 ₁

6.2.7 Strukturanalyse

Die Strukturen der Δ 4CRad14s/AAF-dG und Δ 4CRad14s/1,2-GG Cisplatin Komplexe (P4₁) wurden durch molekularen Ersatz (PHASER^{126,153}), durch Verwendung der Koordinaten des zuvor experimentell ermittelten SeMet Rad14 Proteins, komplett gelöst. Die Strukturlösung wurde von *Dr. Sabine Schneider* und *Dr. Jochen Kuper* durchgeführt. Die Abbildungen der Kristallstrukturen wurden mit PyMol (*Delano Scientific*) angefertigt.

Die Kristallstrukturen zeigen, dass Rad14s, trotz niedriger Sequenzidentität von 27%, eine ähnliche α/β -räumliche Struktur wie sein humanes Homolog XPA (PDB Code 1XPA) annimmt. Die DNA-bindende Domäne von Rad14 weist eine Sekundärstruktur auf, bestehend aus sieben α -Helices und drei β -Faltblättern. In Abbildung 6.24 ist die strukturelle Überlagerung der Rad14s Kristallstruktur mit der NMR Struktur der DNA-bindenden Domäne von XPA sowie die schematische Darstellung der Rad14s Struktur abgebildet.

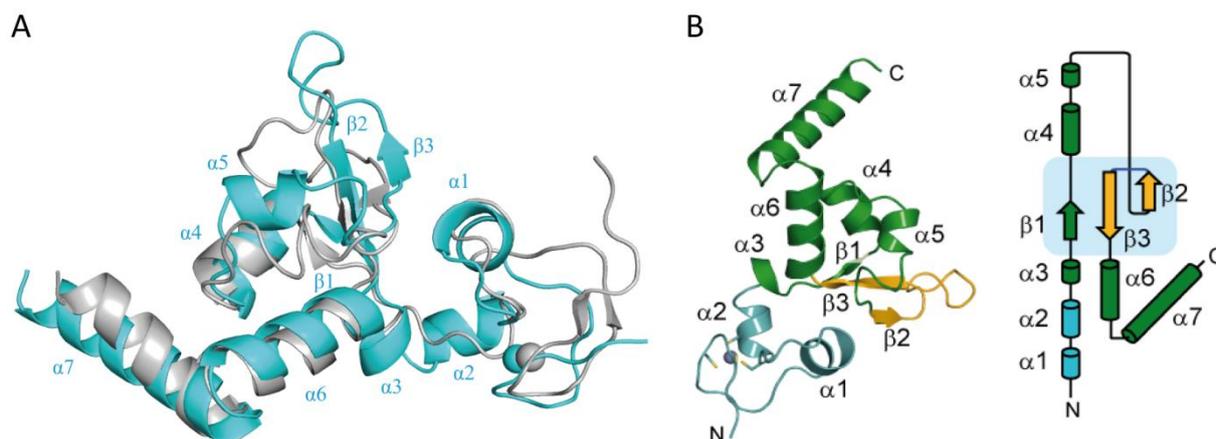


Abbildung 6.24: Vergleich der Strukturen von Rad14s mit seinem Homologen XPAs. A) Überlagerung der NMR-Struktur der DNA-bindenden Domäne von XPA (PDB Code 1XPA, grau)⁶⁷ mit der Kristallstruktur der DNA-bindenden Domäne von Rad14s (hellblau). B) Schematische Darstellung α/β -räumlichen Struktur von Rad14s mit den drei zentralen β -Faltblätter.

Die Kristallstrukturen zeigen, wie zuvor durch EMSA-Bindungsstudien bestätigt (Abschnitt 6.2.4.2), dass zwei Proteine an einen geschädigten DNA Doppelstrang binden (Abbildung 6.25 A). In der Struktur mit dem AAF-dG Schaden kann man beobachten, dass zwei Rad14 Proteine an die ungeschädigte Stelle vor und nach dem DNA-Schaden binden. Jedes Protein bindet den Doppelstrang mit seinem β -Hairpin (Aminosäuren 253 – 267), wobei die Reste Phe262 und His258 mit den letzten Basenpaaren des Duplex wechselwirken und somit eine aus 13 Basenpaaren bestehende Schadenserkennungsdomäne festklammern. Die DNA wird in zwei unterschiedlichen Orientierungen (Drehung um 180°) von den zwei Proteinen gebunden. Der Schaden befindet sich in der Mitte und somit wird eine pseudo C2-Symmetrie Achse etabliert. Die beiden Duplex Orientierungen, berechnet aus der Besetzung des anomalen Signals des Iods, sind mit einer 45% zu 55% Verteilung besetzt (Abbildung 6.25 B). Die Kristallstruktur mit dem Cisplatin Schaden weist das selbe Erkennungsmotiv auf (Abbildung 6.25 C). Auch hier nimmt die Struktur eine pseudo C2-Symmetrie an, so dass die DNA in zwei Orientierungen (Drehung um 180°) gebunden ist. Da jedoch der 1,2-GG Cisplatin Schaden aus zwei zusammen verknüpften Basen besteht, kann der Schaden für die zwei möglichen DNA Orientierungen in zwei verschiedenen Positionen beobachtet werden (d.h. vier Positionen). Das anomale Signal des Platinatoms wurde hier zur Abschätzung der Besetzung verwendet (DNA Orientierung 1: 21% und 27%; DNA Orientierung 2: 33% und 19%).

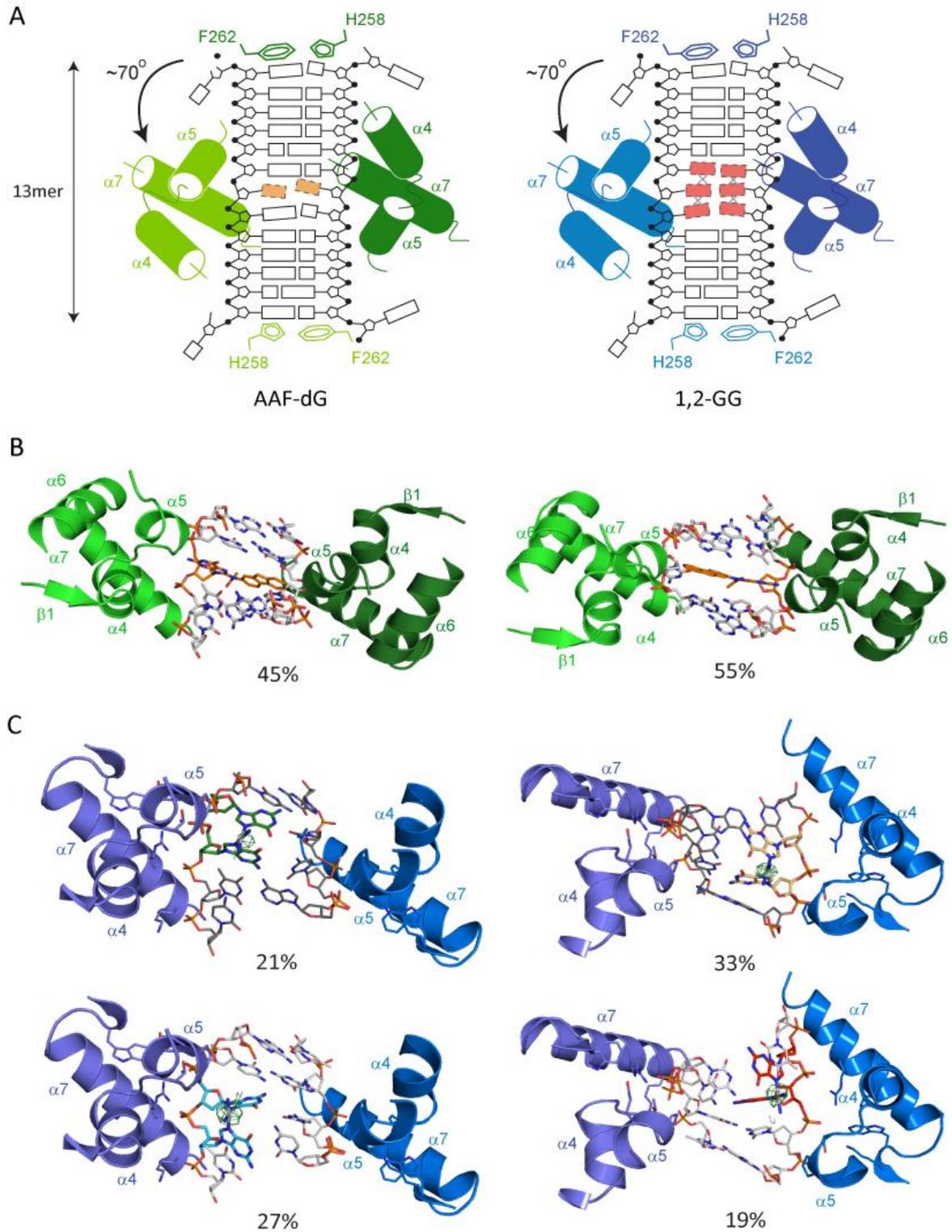


Abbildung 6.25: Unterschiedliche Orientierungen der von $\Delta 4\text{CRad14s}$ gebundenen DNA-Stränge. A) Schematisches Diagramm der $\Delta 4\text{CRad14s}/\text{AAF-dG}$ und $\Delta 4\text{CRad14s}/1,2\text{-GG}$ Komplexe. B) Der AAF-dG Schaden nimmt zwei entgegengesetzte Positionen in der Kristallstruktur an, wobei zwei Proteine mit ihrem β -Hairpin die DNA umklammern. C) Der aus zwei verknüpften Nukleotiden bestehende 1,2-GG Schaden besetzt vier verschiedene Positionen.

Beide Kristallstrukturen zeigen einen allgemeinen Bindungsmechanismus des Proteins an die DNA: Die Reste His258 und Phe262 wechselwirken an beiden Enden mit der DNA und die α -Helices ($\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$) sind für die Interaktion des Proteins mit der zentralen Domäne der DNA verantwortlich (Abbildung 6.26 und Abbildung 6.27). Alle Basen der 13mer DNA Schadenserkennungsdomäne gehen in beiden Strukturen Wasserstoffwechselwirkungen miteinander ein. Die Basenpaare an den Positionen 1 und 15 hingegen sind räumlich voneinander getrennt, bilden keine Wasserstoffbrückenbindungen und sind in der Struktur partiell delokalisiert. Beide Schäden werden nicht aus dem Duplex heraus geklappt, stattdessen weisen die Strukturen an der Schadensstelle einen scharfen Knick von 70° auf, was darauf hindeutet, dass Rad14 nicht den Schaden an sich erkennt, sondern die Flexibilität der DNA überprüft. Das Zinkfinger-Motiv wechselwirkt nicht mit dem DNA-Duplex. Es ist bekannt, dass das Motiv für die Interaktion mit der 70 kDa Untereinheit von RPA benötigt wird.^{67,92,93}

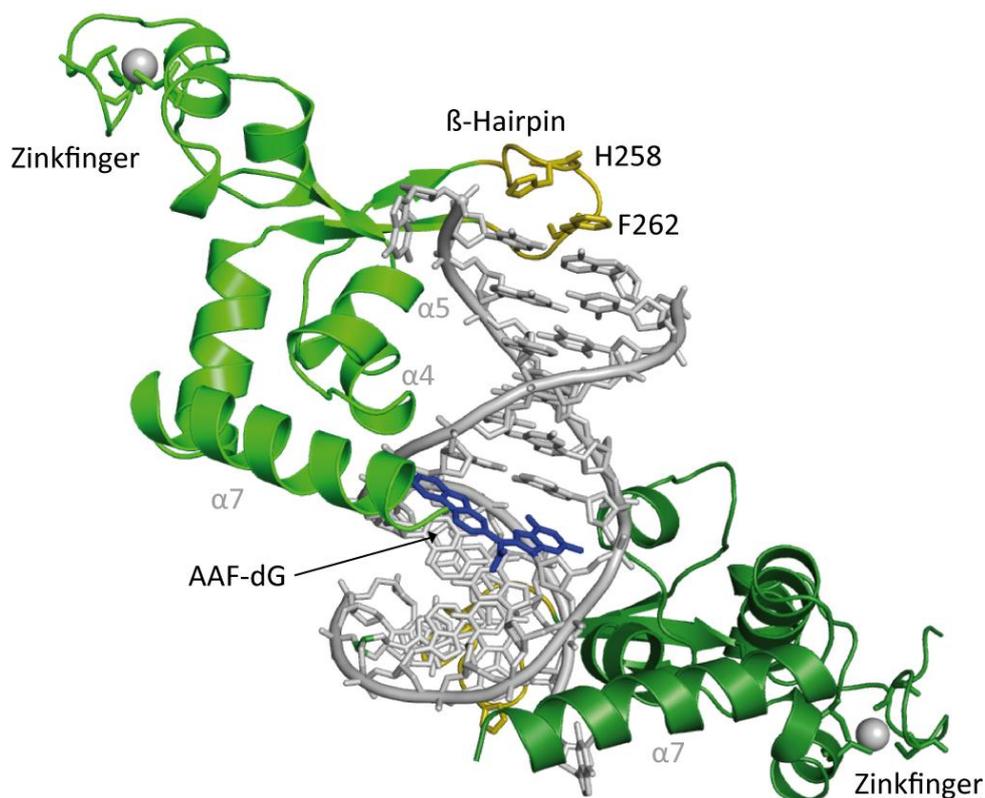


Abbildung 6.26: Kristallstruktur von $\Delta 4$ CRad14s mit AAF-dG geschädigter DNA. Der AAF-dG Schaden ist blau abgebildet, die Proteine grün und der β -Hairpin goldfarben. Die Reste His258 und Phe262 des β -Hairpins sind als Stäbchen abgebildet. In dem Zinkfinger-Motiv wird das Zinkatom (grau) von vier Cysteinen koordiniert.

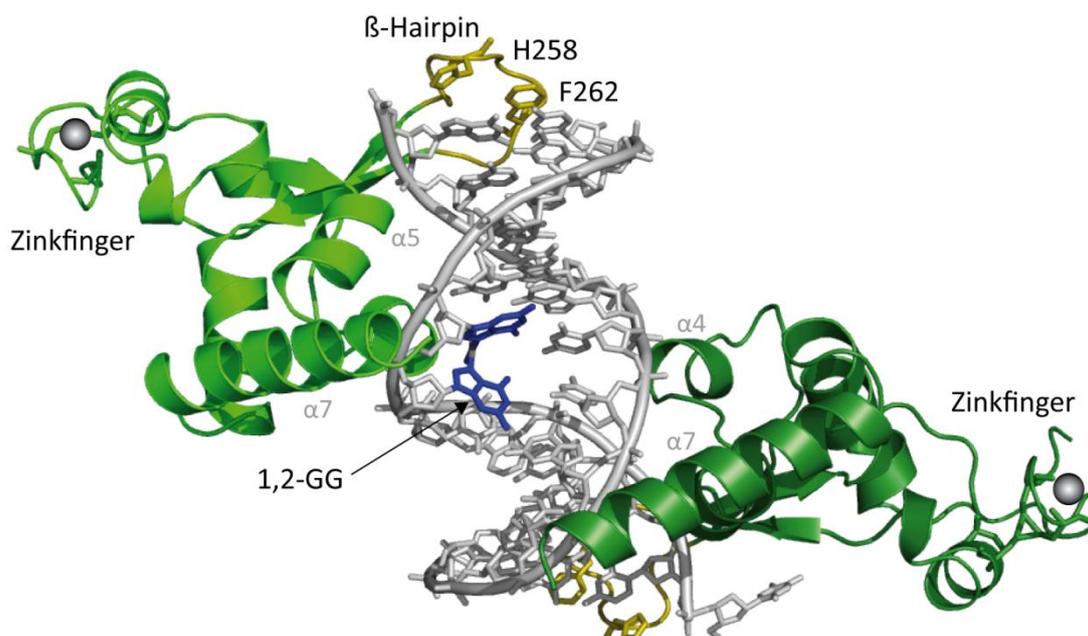


Abbildung 6.27: Kristallstruktur von $\Delta 4$ CRad14s mit 1,2-GG Cisplatin geschädigter DNA (Farbcode wie in Abbildung 6.26).

6.2.8 DNA Biegung und das Schadenserkenntungsmotiv

Die gesamte DNA-Protein Wechselwirkung besteht aus den Aminosäuren des β -Hairpins (Asn256, His258, Phe262 und Gln266), der Helix $\alpha 4$ (Lys229 und Thr230), dem Loop zwischen $\alpha 4$ und $\alpha 5$ (Thr239) und der Helix $\alpha 7$ (Arg293, Arg294) (Abbildung 6.28). Der β -Hairpin (Asn256, His258, Phe262 und Gln266) zusammen mit der Helix $\alpha 4$ (Lys229 und Thr230) wird hier als „Finger“ Domäne bezeichnet, weil diese den DNA-Doppelstrang 4 – 5 Basenpaare des Schadens entfernt fest bindet und untersucht. Eine weitere „Daumen“-ähnliche Wechselwirkung findet zwischen der Helix $\alpha 7$ und dem DNA-Rückgrat statt, wobei mit Hilfe von Arg294 das Rückgrat stabilisiert wird. His258 und Phe262 wechselwirken mit den beiden letzten geordneten Basenpaaren des Doppelstrangs. Zusätzlich bildet His258 eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatrückgrat der Base mit der es wechselwirkt. Der β -Hairpin, der die hauptsächliche DNA-Protein-Wechselwirkung verursacht, bildet die Basis des Biegungsmechanismus. Die bedeutsamste Wechselwirkung findet zwischen Arg293 und Arg294 der $\alpha 7$ -Helix, durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatrest der geschädigten Base, statt. Diese Aminosäuren definieren und stabilisieren wahrscheinlich die Biegungsachse, welche weiterhin durch eine Wasserstoffbrückenbindung von Thr239 mit

dem Phosphatrest der zu dem Schaden benachbarten Base charakterisiert ist. Diese Wechselwirkung stabilisiert die Biegung sicherlich am meisten.

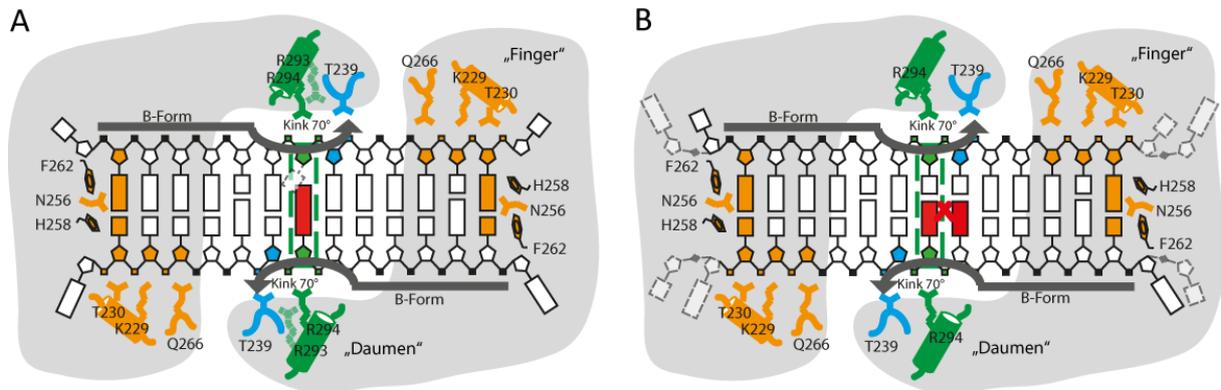


Abbildung 6.28: Rad14s bindet DNA-Schäden durch Biegung der DNA. A) Schematische Darstellung der Wechselwirkungen in dem Rad14s/AAF-dG Komplex (15mer Duplex) zeigt die „Finger“ Domäne, welche hauptsächlich durch den β -Hairpin sowie den Resten Gln266, Lys229 und Thr230 gebildet ist und der „Daumen“ gebildet durch die α 7-Helix (Arg294). Nur in der AAF-dG Struktur wechselwirkt Arg293 (grün) mit dem Rückgrat. Das gestrichelte Quadrat zeigt die dC Base gegenüber dem AAF-dG Schaden. Die Elektronendichte der Base fehlt, da diese flexibel ist. B) Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Rad14s und der 1,2-GG Cisplatin geschädigte DNA.

Zwei Rad14 Moleküle öffnen die DNA-Duplexstruktur endständig mit Hilfe ihrer β -Hairpin Struktur, wobei die endständigen Basen (1 und 15) in einem Abstand von 18,5 Å zueinander stehen. Die beiden Stränge des Duplex sind räumlich voneinander getrennt, um den Einzelstrangcharakter hinter den zwei Rad14 Bindungsstellen anzunehmen. Die DNA Biegung findet in der großen Furche statt, wobei sich der Abstand des Phosphodiester, verglichen mit 16,8 Å bei B-DNA, auf 11,7 Å reduziert (Abbildung 6.29 A). Eine schematische Darstellung (Abbildung 6.29 B) der Struktur zeigt wie das Protein die geschädigte DNA mit seinem „Daumen“ und seinen „Fingern“ umklammert. Der Abstand zwischen den interkalierenden Resten Phe262 und His 258 und den Argininen der „Daumen“-Domäne erzwingt die DNA Biegung in die große Furche.

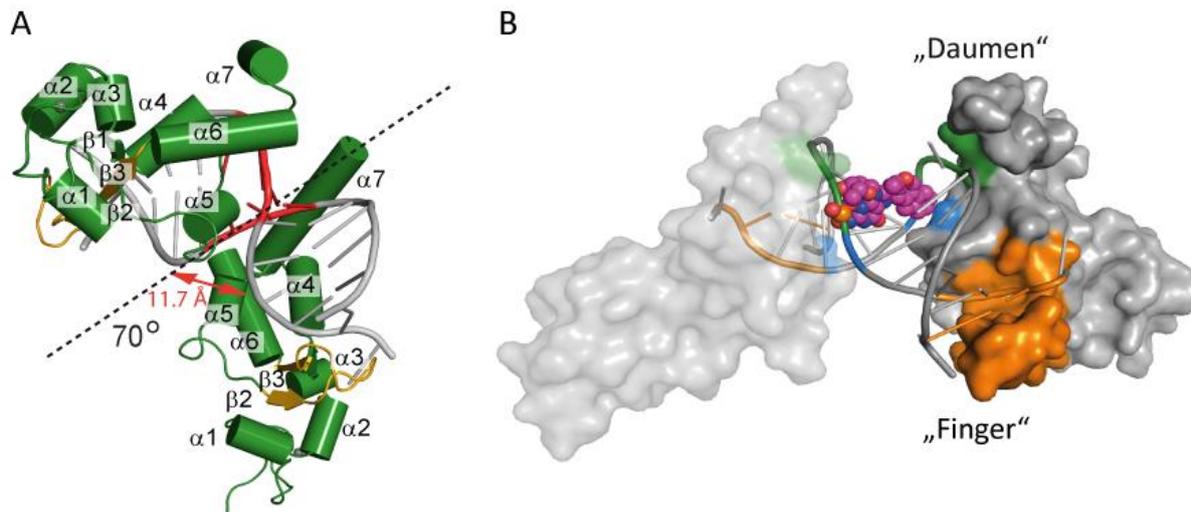


Abbildung 6.29: A) Die Biegung um 70° des DNA-Duplex an der Schadensstelle (rot) reduziert den Phosphodiester-Abstand in der großen Furche auf 11.7 \AA . Die gestrichelte Linie repräsentiert die pseudo C2-Symmetrie Achse. B) Schematische Darstellung des Biegungsprozesses mit dem β -Hairpin (orange), der Packung von $\alpha 7$ mit Arg294 gegen das Rückgrat (grün) und die Stabilisierung des Knicks durch Thr239 (blau).

Die gemeinsame Handlung der Interkalation des β -Hairpins und der „Sperrung“ durch Arg294 und Thr239 in der Nähe des Schadens, überprüft die DNA auf ihre Verformbarkeit und verursacht den Knick (Abbildung 6.30). Durch kooperatives Handeln beider Monomere kann der DNA Knick gebildet werden, ohne dass diese miteinander in Wechselwirkung treten. Die Rad14 Moleküle kontaktieren weder den Schaden noch die zu dem Schaden angrenzenden Basen, was zur Schlussfolgerung führt, dass Rad14 in der Lage ist eine Vielfalt an DNA-Schäden unabhängig von der DNA Sequenz zu erkennen.

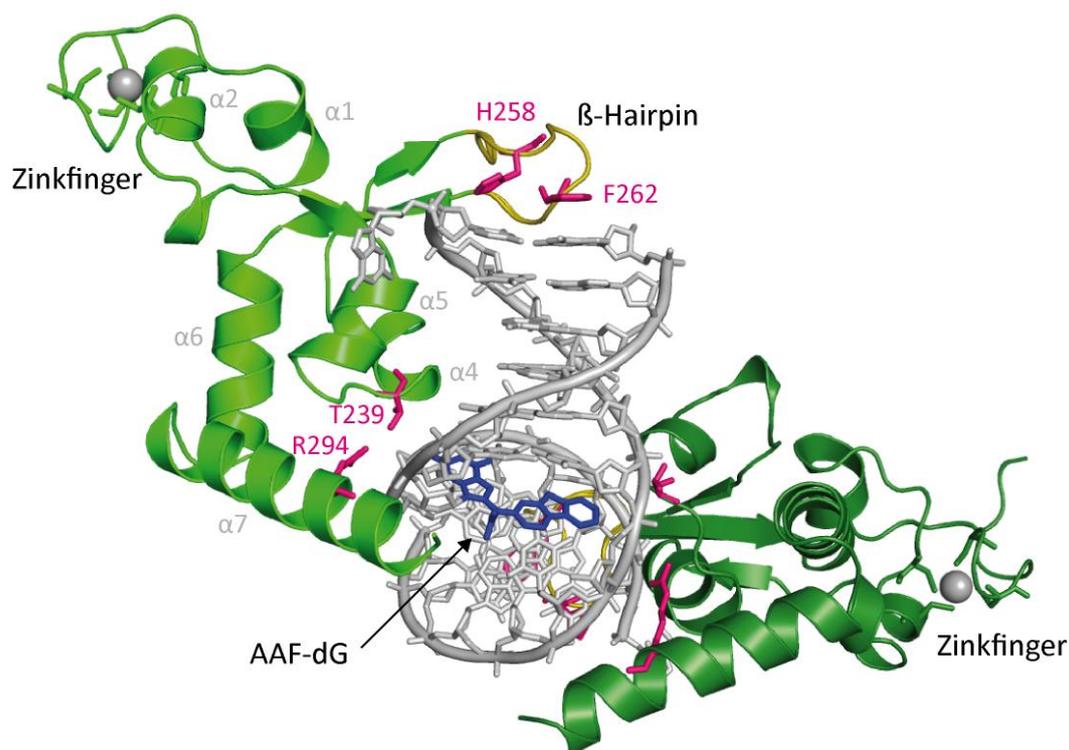


Abbildung 6.30: Kristallstruktur des $\Delta 4$ CRad14s/AAF-dG Komplexes. Rad14 ist grün und goldfarben (β -Hairpin) abgebildet; die DNA grau und der AAF-Schaden blau. Die für die DNA-Biegung verantwortliche Reste (Thr239, His258, Phe262 und Arg294) sind pink abgebildet.

Die Daten der $P4_1$ Kristallstrukturen konnten dann verwendet werden, um die zuvor erhaltenen Datensätze mit Selenomethionin-substituiertem Protein ($P2_1$) und SeMet Rad14s sowie Brom-substituierte DNA ($P2_12_12_1$) vollständig zu interpretieren. In Abbildung 6.31 und Abbildung 6.32 sind beide Strukturen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass auch hier ein DNA-Doppelstrang von zwei Proteinen gebunden wird, wobei sich der Schaden in der Mitte befindet. Beide Proteine halten die DNA erneut durch Interkalation ihres β -Hairpins oberhalb und unterhalb des DNA-Doppelstrangs fest. Eine Überlagerung der AAF-dG Schäden beider Kristallstrukturen (Abbildung 6.33) zeigt, dass der AAF-dG Rest in der $P2_12_12_1$ Struktur nicht vollständig in den Doppelstrang interkaliert ist. Dies weist auf eine Vorstufe der vollständigen Biegung hin, in der die Verformbarkeit der DNA getestet wird. Erst wenn die DNA vollständig geknickt wird (bis ca. 70°), kann der AAF-dG Rest zwischen den benachbarten Basen interkalieren und das gegenüberliegende dC aus den Doppelstrang herausdrängen.

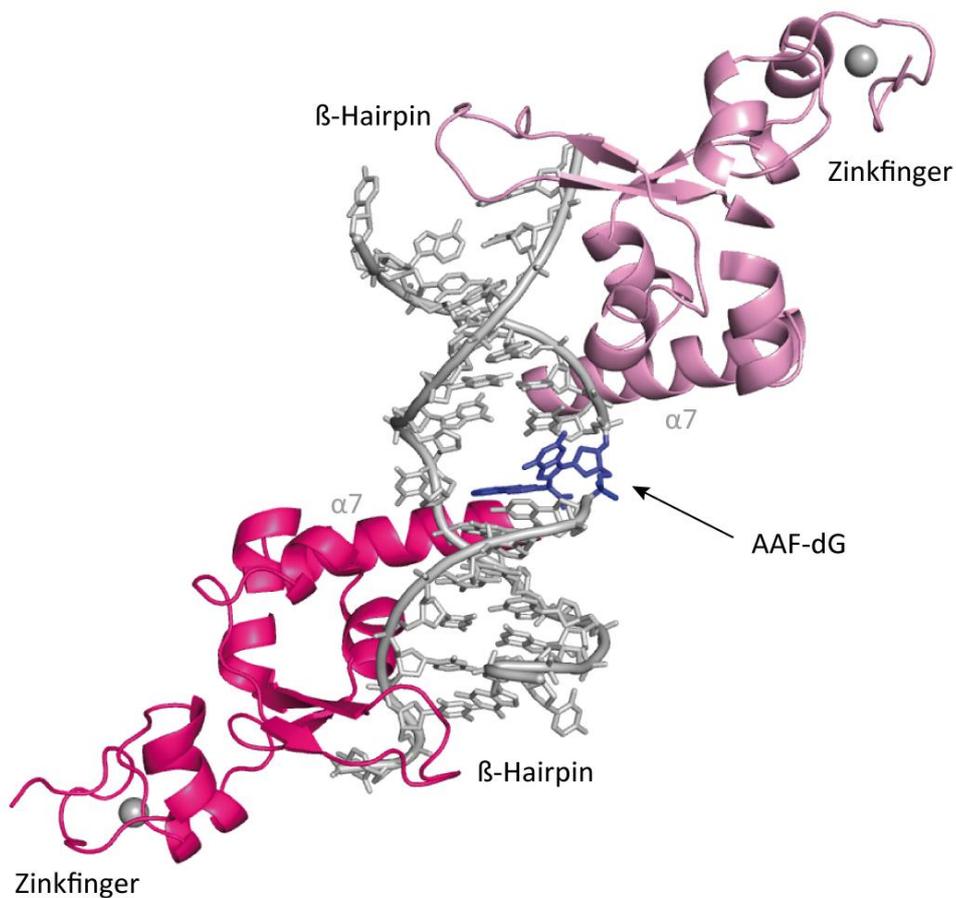


Abbildung 6.31: Kristallstruktur von SeMet Rad14 mit AAF-dG geschädigter DNA. Die Struktur gehört zur monoklinen Raumgruppe $P2_1$. Beide Proteine sind pink und rosa abgebildet, das Zinkatom und die DNA sind grau abgebildet und der AAF-dG Schaden ist blau abgebildet.

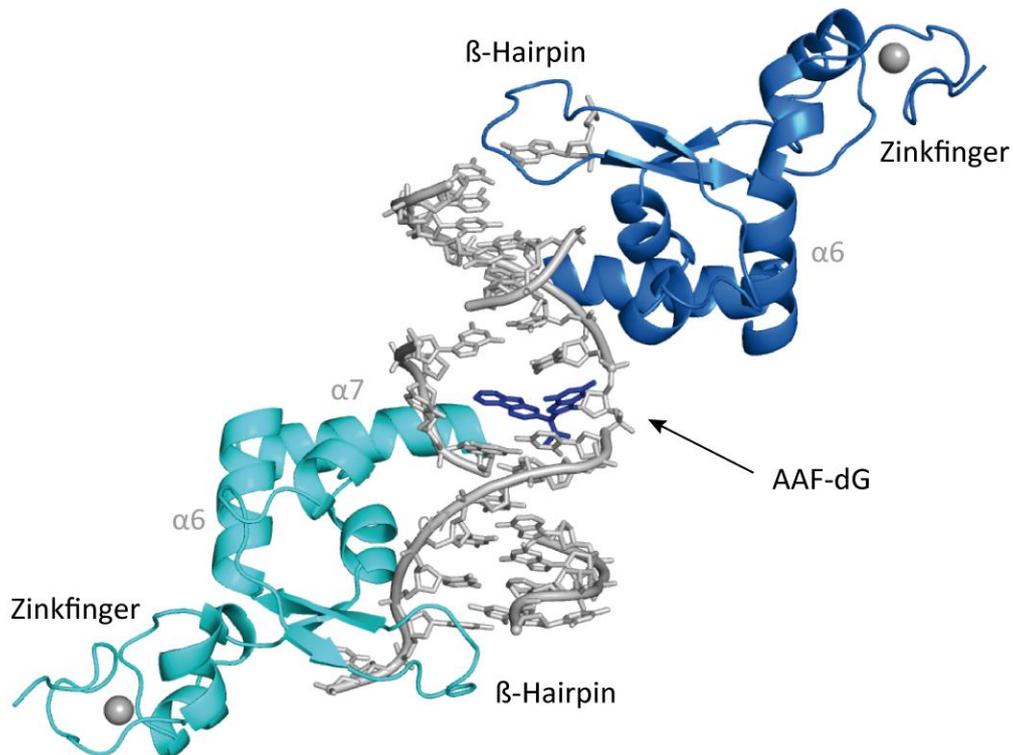


Abbildung 6.32: Kristallstruktur von SeMet Rad14 mit AAF-dG geschädigter 5-Bromo-dU DNA. Die Struktur gehört zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. Beide Proteine sind blau und hellblau, das Zinkatom und die DNA sind grau und der AAF-dG Schaden ist blau abgebildet.

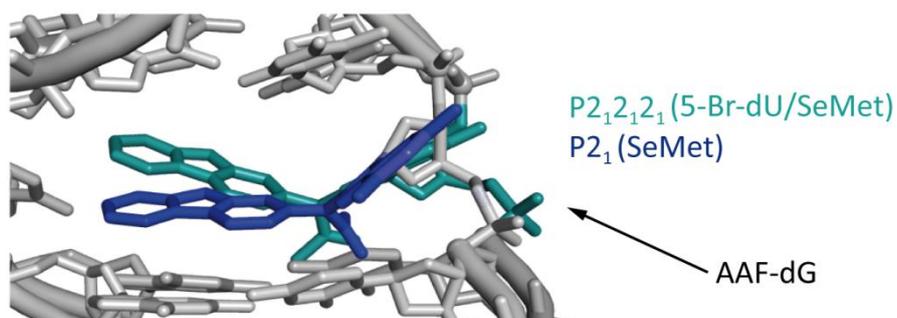


Abbildung 6.33: Überlagerung der AAF-dG Schäden der $P2_1$ (blau) und $P2_12_12_1$ (hellblau) Datensätze.

Abbildung 6.34 zeigt eine Überlagerung der geknickten DNA-Stränge von den drei verschiedenen Strukturen mit normaler B-DNA. Alle drei Strukturen weisen einen Knick an der DNA-Schadensstelle von 43° ($P2_1$ und $P2_12_12_1$) bzw. 70° ($P4_1$) auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Bindung der Proteine an die DNA oder durch den bereits vorhandenen Schaden die DNA geknickt wird, was womöglich für den Schadenserkenntnisprozess

relevant ist. Nachdem das erste Rad14 Protein an die geschädigte DNA bindet und diese sich in einer vorgeknickten Struktur befindet, kommt das zweite Rad14 Molekül, um den Knick zu stabilisieren. Man könnte hier von einer kooperativen Bindung sprechen. Die um 43° gekrümmte DNA ist nur ein sogenannter Zwischenzustand, bis es zur vollständigen Biegung von ca. 70° kommt.

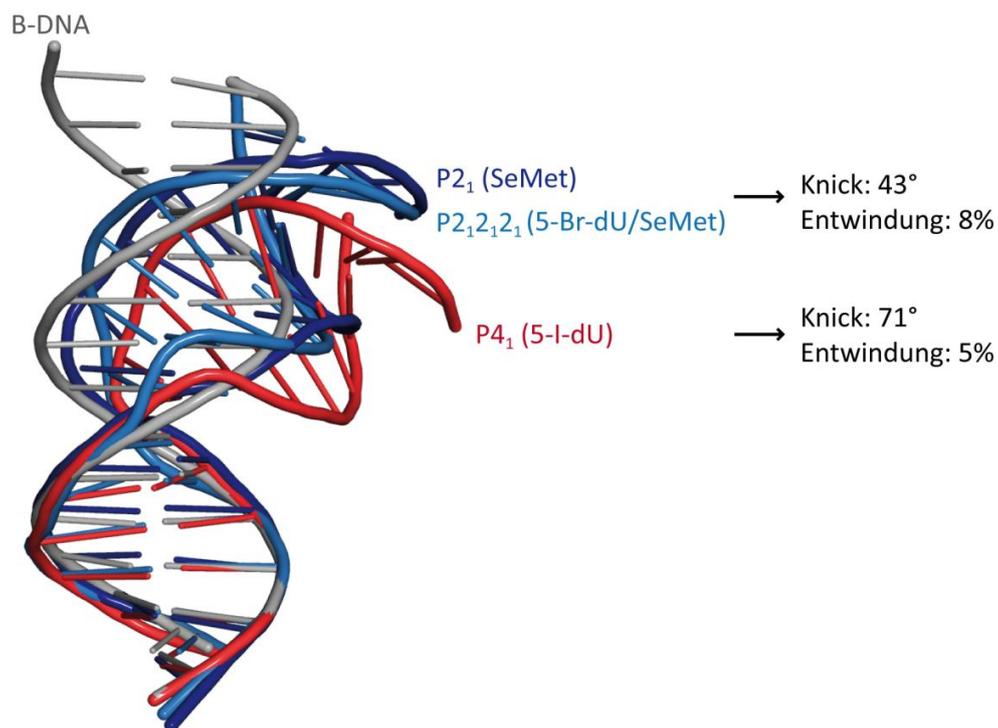


Abbildung 6.34: Überlagerung der drei geknickten DNA-Stränge der verschiedenen Kristallformen mit B-DNA. Blau: $P2_1$; hellblau: $P2_12_12_1$; rot: $P4_1$; grau: B-DNA.

6.2.9 In vitro Versuche zur Verifizierung der Strukturanalyse

Bei Kristallisationsexperimenten, liegen Protein und DNA in sehr hohen Konzentrationen vor, was jedoch nicht mit deren Konzentrationen in lebenden Zellen übereinstimmt. Die in der Kristallstruktur zu erkennenden Bindungscharakteristika könnten demnach ein Artefakt darstellen. Um so ein Artefakt auszuschließen, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, die den in der Kristallstruktur beobachteten Bindungsmechanismus bestätigen sollten.

6.2.9.1 Crosslinking Versuch: Bestätigung des (Rad14)₂-DNA-Komplexes

Wie in Abschnitt 5.2.4.2 beschrieben, dient der *Crosslinking* Versuch zur Identifizierung von Protein-Protein Wechselwirkungen. Die Kristallstruktur zeigt die Anwesenheit zweier Lysine (Lys233) in beiden Rad14 Proteinen, die einen Abstand von 21.5 Å zueinander aufweisen (Abbildung 6.35 A). Um zu untersuchen, ob das Rad14 Protein, wie in der Kristallstruktur, als Homodimer an geschädigte DNA auch in Lösung bindet, wurde hier der Bis(NHS)PEG₅ (Bis-*N*-Succinimidyl-(pentaethylglycol)-ester) *Crosslinker* verwendet (Abbildung 6.35 B). Der *Crosslinker* weist einen Abstand zwischen seinen zwei funktionellen Gruppen von 21.7 Å auf. Nach Inkubation des Proteins mit einem 19mer AAF-dG (ODN9) enthaltenden DNA-Doppelstrang (molares Verhältnis Protein:DNA von 2:1) für 30 min bei 4 °C wurde eine steigende Konzentration an *Crosslinker* dazugegeben (1:1 bis 1:200) und das Gemisch für 2 h bei 4 °C inkubiert. Eine SDS-PAGE Analyse bestätigte die Bildung eines definierten (Rad14)₂-DNA-Komplexes in Abhängigkeit der *Crosslinker* Konzentration (Abbildung 6.35 B). Die entsprechende Bande wurde mit Trypsin und Chymotrypsin entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 5.2.4.3 verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden anschließend mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert.

Zur Identifikation des Proteins wurde die *Thermo Proteome Discoverer 1.1* verwendet. Die *Sequest* Suchmaschine wurde in Kombination mit der UniProt Datenbank des Expressionssystems (*E. coli*, vollständiges Proteom, Download 12.2013) verwendet und die Sequenz des gesuchten Proteins (Rad14, *S. cerevisiae*, Download 12.2013) im *fasta* Format hinzugefügt. Als Nachweisgrenze diente das dreifache Verhältnis des Signals über den Hintergrund. Ein Maximum von drei fehlenden Spaltstellen wurde toleriert. Die

Massentoleranz betrug 30 ppm für die Vorläufermasse und 0.8 Da für die Fragmentionen. Dynamische Modifikationen waren Kationen: Na (Asp, Glu), Oxidation (Met), als auch mögliche Modifikationen durch den *Crosslinker*: Bis(NHS)PEG₅ (Lys).

In dem MS-Spektrum konnte ein Mutterion der molekularen Masse ($m = 2115.02$ Da) gefunden werden, welches der exakten Masse eines mit dem *Crosslinker* verknüpften Dipeptids entspricht. (Abbildung 6.35 C). Nach Fragmentierung wurden die verknüpften Peptide mit Hilfe der Datenbank identifiziert. Die entsprechenden Peptidsequenzen wurden als TECKEDY-Sequenzen bestimmt. (Abbildung 6.35 D, rot). Das typische Fragmentierungsmuster des Polyethylenglykol (PEG) basierenden *Crosslinkers* konnte mit einer Serie von fünf Fragmentionen (Massenunterschied von $m = 44.03$ Da, entsprechend der fünf PEG-Untereinheiten) in dem Spacer identifiziert werden (Abbildung 6.35 E).

Das Ergebnis des *Crosslinking*-Versuchs zeigen, dass das Protein als Homodimer an die geschädigte DNA bindet. Der kristallographisch beobachtete 2:1 Komplex besteht also auch in Lösung.

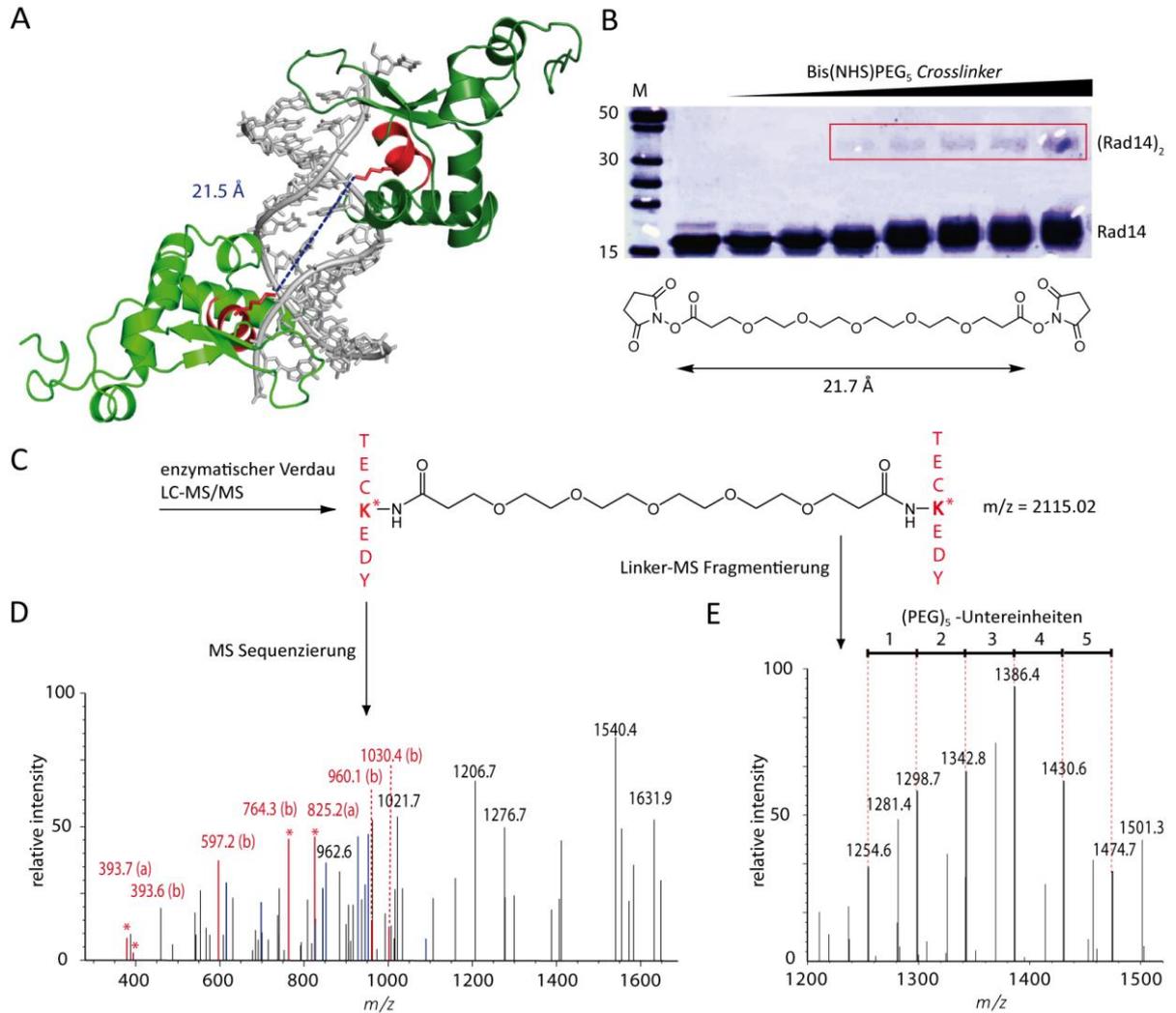


Abbildung 6.35: *Crosslinking* Versuch des Rad14s-DNA Komplexes und massenspektrometrische Analyse des enzymatisch verdauten Proteindimer. A) Zwei Rad14s Proteine (grün) binden an AAF-dG DNA (grau). Beide Lysine der Peptidsequenzen TECKEDY (rot) stehen im Abstand von 21.5 Å zueinander. B) SDS-PAGE des Protein-DNA Gemisches nach Inkubation mit steigender Menge an Bis(NHS)PEG₅ *Crosslinker*. Die (Rad14)₂ Banden sind rot eingerahmt. Nach enzymatischem Verdau der Banden wurden diese mittels LC-MS/MS analysiert. C) Verknüpfung der zwei Lysine der Peptidsequenzen (TECKEDY) mit dem *Crosslinker*. D) Die Massenspektren zeigen Fragmente des Proteindimers mit *Crosslinker*. Das MS/MS-Spektrum zeigt die Peptidsequenz, welche die Identifikation der Peptide ermöglicht (rot: die a- und b-Ionen Serien; blau: die x- und y-Ionen Serien). E) Die Fragmente des PEG Linkers sind rot markiert.

6.2.9.2 Fluoreszenzpolarisation zur Bestätigung der Interkalation

Wie in Abschnitt 5.2.4.7 erwähnt, kann die Fluoreszenzpolarisation verwendet werden, um DNA-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen. In der Kristallstruktur ist ersichtlich, dass die Aminosäure Phe262 in den DNA Doppelstrang interkaliert (Abbildung 6.36) und somit an einem wesentlichen Punkt der DNA-Bindung beteiligt ist.

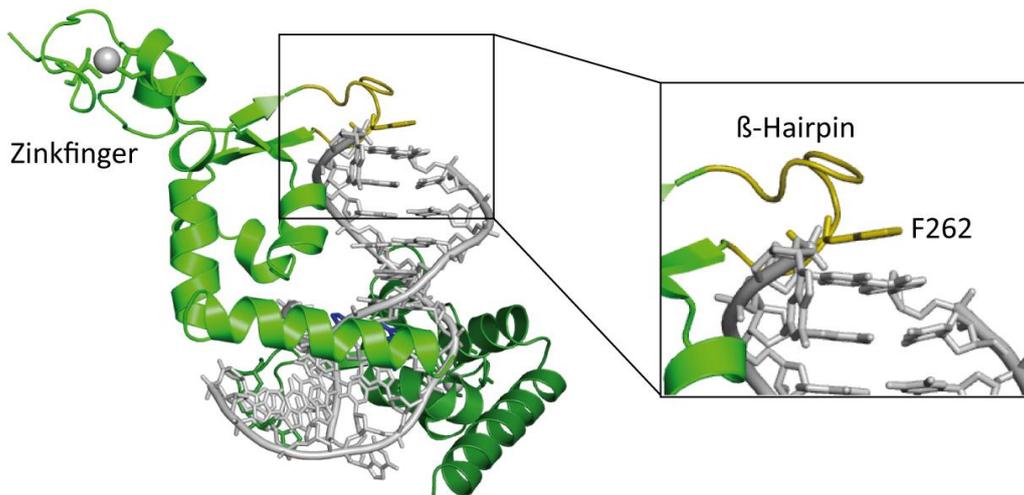


Abbildung 6.36: Kristallstruktur des Protein-DNA Komplexes. $\Delta 4\text{CRad14s}$ (grün) interkaliert den Phe262 Rest seines β -Hairpins (goldfarben) in die DNA-Doppelhelix (grau).

Um die Bedeutung dieser Interkalation zu untersuchen, wurde eine Mutante kloniert, in der das Phe262 durch ein Alanin substituiert wurde (F262A). Die 15mer und 30mer dsDNA Oligonukleotide (ODN10 und ODN11) enthielten in der Mitte des Stranges eine Fluo-dU Markierung. Diese Markierung wurde einerseits als „Schaden“ von dem Protein erkannt und diente andererseits als Marker für die Fluoreszenzmessung. In einem Reaktionsansatz (100 μL) wurde DNA (10 nM) mit steigender Menge an Protein in Bindungspuffer inkubiert. Es wurde mit $\Delta 4\text{CRad14s}$ und $\Delta 4\text{CRad14s}_{\text{F262A}}$ gearbeitet. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend sofort in schwarze 96well Microtiterplatten überführt und an einem Tecan Microtiterplattenreader gemessen. In Abbildung 6.37 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisation dargestellt. Auf der x-Achse ist die steigende Konzentration von Rad14 indiziert und auf der y-Achse der Polarisationswert. $\Delta 4\text{CRad14s}$ zeigt eine Bindung sowohl zu 15mer als auch zu 30mer Fluo-modifizierter DNA (Abbildung 6.37 A und B, blaue Kurve). Die Rad14 Mutante hingegen zeigt keine Bindung zu Fluorescein markierter dsDNA (Abbildung 6.37 A und B, türkisfarbene Kurve). Ohne den

Phe262 Rest kann es also nicht zur Wechselwirkung zwischen Protein und DNA kommen. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese der DNA-Bindung durch Rad14 durch Interkalation von Phe262 in den Doppelstrang.

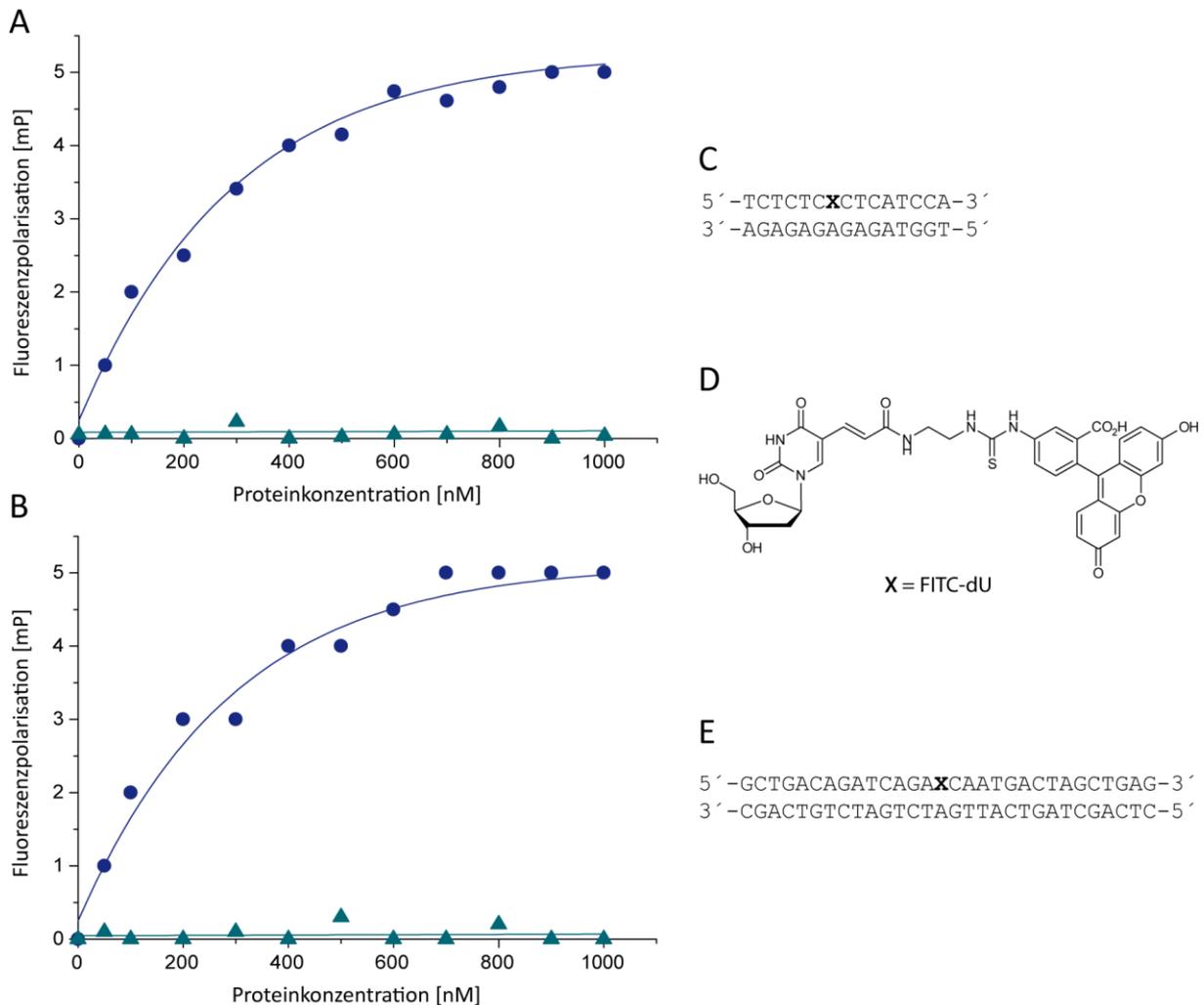


Abbildung 6.37: Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisation. A) Bindungskurve von $\Delta 4$ CRad14s und $\Delta 4$ CRad14s_{F262A} mit 15mer (ODN10) und B) mit 30mer (ODN11) Fluorescein-enthaltender dsDNA. Blau: $\Delta 4$ CRad14s; türkis: Mutante. C) 15mer Fluorescein-enthaltender DNA Doppelstrang. D) Strukturformel des Fluoresceins geknüpft an ein Uracil (Fluo-dU) und E) 30mer Fluorescein-modifizierter DNA Doppelstrang.

Durch Substitution von Phe262 mit Alanin kommt es zu keiner Bindung zwischen dem Protein und der geschädigten DNA, was darauf hindeutet, dass der Phenylalaninrest für die Interkalation in den Doppelstrang und somit für die Bindung an die DNA zuständig ist.

6.2.10 Mechanismus der Schadenserkenkung in der NER

Im Gegensatz zu anderen Reparaturmechanismen besitzt die NER eine breite Substratspezifität. Bislang wurden die Proteine Rad4/XPC^{73,75,76} und UV-DDB/XPE^{81,86} für die Schadenserkenkung verantwortlich gemacht, obwohl bekannt war, dass auch Rad14/XPA mit geschädigter DNA interagiert.^{35,83,98} Die Kristallstrukturen des XPA Hefehomologs, Rad14, im Komplex mit geschädigter DNA enthüllen einen allgemeinen Schadenserkenkungsprozess und zeigen inwiefern XPA in der Schadenerkenkung von NER involviert ist. So wie Rad4 kontaktiert auch Rad14 nicht den Schaden selbst.⁷⁹ Im Gegensatz zu Rad4 ist es jedoch in der Lage die Verformbarkeit von geschädigter DNA zu untersuchen. Um eine vollständige Biegung der DNA zu generieren, binden zwei Rad14 Proteine den Duplex und interkalieren ihren β -Hairpin in den Duplex, sechs Basenpaare von dem Schaden entfernt, um eine 13mer Schadenserkenkungssequenz zu erzeugen. Neben dieser β -Hairpin Interkalation finden weitere Wechselwirkungen mit dem 5'-Ende des DNA-Rückgrat statt. Diese Wechselwirkungen mit der DNA ähneln der Bindung durch die „Finger“ einer Hand. Eine weitere „Daumen“-ähnliche Wechselwirkung, erzeugt durch die Packung der Helix $\alpha 7$ gegen das Rückgrat und Wechselwirkungen von Arg294 und Thr239 (zwischen $\alpha 4$ und $\alpha 5$) mit dem DNA-Rückgrat, halten die DNA in Stellung, wobei die „Finger“ den DNA Duplex in die gebogene Struktur schieben. Die Biegung wird in der großen Furche erzeugt. In der Co-Kristallstruktur mit dem 1,2-GG Cisplatin Schaden erkennt man, dass das Platinatom in der Struktur verborgen wird (Abbildung 6.38 A). Demzufolge wird die kleine Furche an der konvexen Seite der Struktur erweitert. Der DNA Duplex ist dadurch an der Schadensstelle um 70° geknickt. Die Interkalation erzeugt das Aufschmelzen der DNA-Enden und führt zur Bildung einer Einzelstrangregion hinter der 13mer Rad14 Bindedomäne. An diese Region können weitere NER Proteine binden. Die relativ wenigen Wechselwirkungen, die zur Biegung der DNA führen, deuten darauf hin, dass Rad14 an bereits gebogene oder an leicht biegbare DNA Strukturen bindet. Das stimmt mit den biochemischen Daten überein, welche andeuten dass Rad14 die Verformbarkeit der DNA überprüft.⁸⁴ Dieses Modell, in dem Rad14 die Flexibilität der DNA überprüft, erklärt warum der 1,2-GG Cisplatin Schaden so effizient erkannt wird. Dieser Schaden, indem zwei Guanosine kovalent in einem 90° Winkel miteinander verknüpft sind (Abbildung 6.38 B), weist einen Knick in der DNA, abhängig der verwendeten Methode⁸⁵, zwischen 40° und 80° auf. Bedeutsamer jedoch ist, dass der 1,2-GG

Cisplatin Schaden alleine bereits die Breite der großen Furche erheblich reduziert, so dass die DNA schon in dem korrekten Biegungsmodus gegenüber der großen Furche positioniert ist.

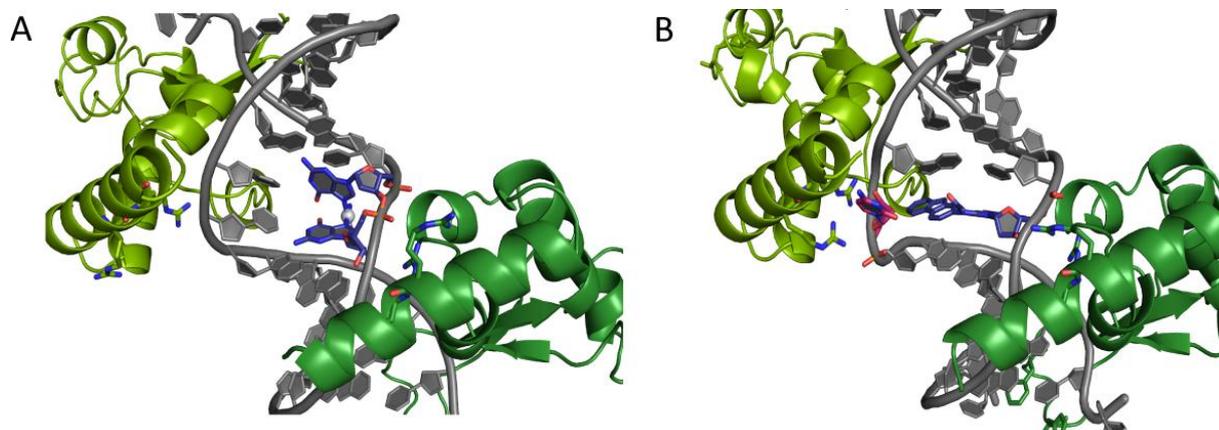


Abbildung 6.38: Rad14 erkennt Schäden, die DNA-Biegungen stabilisieren. A) 1,2-GG Schaden (blau) interkaliert zwischen zwei benachbarten Basenpaaren (grau), um die durch (Rad14)₂ (grün) geknickte Struktur zu stabilisieren. Arg294 ist als Stäbchen mit seinen Stickstoffatomen blau abgebildet. B) Abbildung des AAF-dG Schadens im Komplex mit Rad14 (Farbcode wie in A). Das herausgedrehte dC ist in der Elektronendichte nicht zu sehen, da es zu flexibel ist (rot/blau).

Das Modell, in dem Rad14 die Verformbarkeit der DNA überprüft, erklärt warum das Protein in der Lage ist an DNA Blasen und Y-Loops zu binden, da diese ebenfalls geknickte Strukturen erzeugen.^{98,154} CPD-Schäden hingegen werden nicht durch Rad14 erkannt, vor allem weil diese Schäden weniger effizient in stark geknickte Strukturen untergebracht werden. Tatsächlich ist allgemein bekannt, dass CPD-Schäden die DNA-Duplexstruktur und Stabilität nur wenig beeinflussen.⁸⁵ Weiterhin zeigen Strukturanalysen des (6-4)-Photoschadens, dass diese Verbindung, wegen der Natur der chemischen Verknüpfung, ebenfalls die Biegung in die große Furche verhindern würde.

Für DNA-Schäden einzelner Basen, wie das AAF-dG, ist stets unklar inwiefern sie den Duplex vorab knicken, aber man kann von einem kleinen Biegungswinkel ausgehen. Die AAF-dG und AF-dG Schäden kommen in zwei verschiedenen Orientierungen vor: Entweder mit der dG Base oder der AAF/AF-Einheit innerhalb des Duplex.⁸⁵ Zur Untersuchung der Stabilität von AAF-modifizierten Oligonukleotiden wurden die Schmelzpunktkurven sowie die konzentrationsabhängigen, thermodynamischen Parameter des DNA-Duplex (ODN1) bestimmt (Abbildung 6.39).

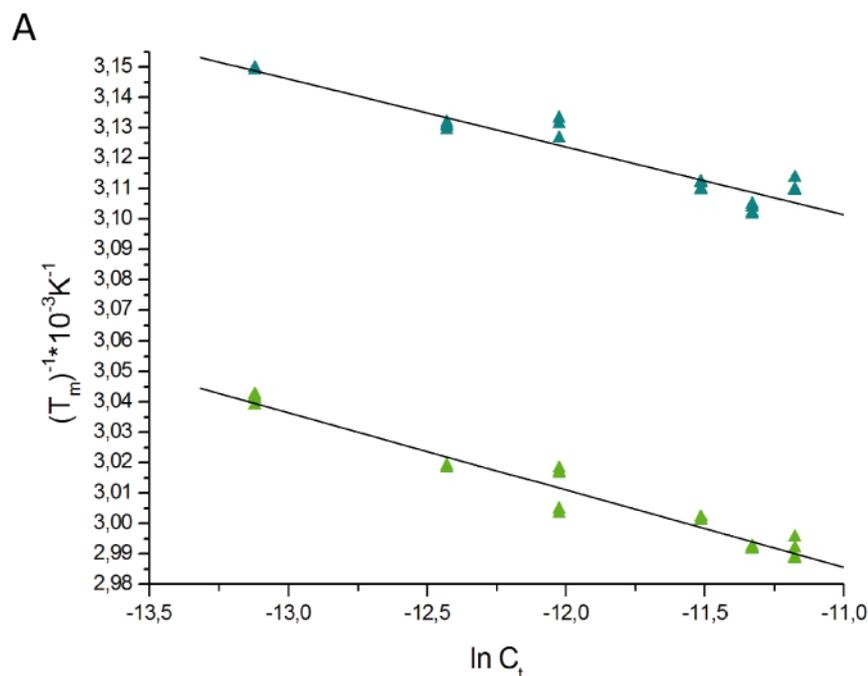


Abbildung 6.39: Schmelzpunktbestimmungen und Berechnung der thermodynamischen Parameter von ungeschädigter und AAF-dG geschädigter dsDNA. A) Van't Hoff Plot von T_m^{-1} vs. $\ln(C_t/4)$ abgeleitet von der Schmelzkurve der Kontroll-DNA (grün) und des AAF-dG 15mer Duplex (blau) bei Konzentrationen zwischen 2 – 7 μM . C_t : Gesamtkonzentration der Oligonukleotide. B) Schmelzpunkte und thermodynamische Parameter von AAF-dG dsDNA (ODN1).

Im Vergleich zu dem ungeschädigten Strang, ist der Schmelzpunkt um $\Delta T_m = 12$ °C ($\Delta\Delta H = 3$ kcal/mol) erheblich herabgesetzt. Ohne Effekt auf ΔS ($\Delta\Delta S = 0$ cal/molK) zeigen die Ergebnisse, dass der Schaden eine thermodynamisch destabilisierte Region in dem Duplex erzeugt. Dieses Phänomen lässt sich am besten durch die Positionierung des AAF-Rests in dem Duplex erklären (Abbildung 6.38 B). Das ist möglich, weil der AAF-dG Schaden eine syn-Konformation um die glykosidische Bindung annimmt, was der dG Base erlaubt aus der großen Furche herauszuragen. In der Rad14-AAF-dG Co-Kristallstruktur beobachten man, dass der Biegungsprozess durch volle Interkalation von AAF-dG in den Duplex resultiert. Die AAF-Einheit nimmt den Platz der dC Gegenbase ein, welche sich in einer herausgedrehten Position gegenüber der Helix $\alpha 7$ befindet (keine Elektronendichte für die Base).

Die Interkalation der AAF-dG Einheit, welche sich wie eine volle Base verhält, stabilisiert den Knick nach der Rad14 Bindestelle. Diese Stabilisierung durch die Bildung von günstigen π -Wechselwirkungen unterstützt. Weil solch eine Konformation des AAF-dG noch nie beobachtet wurde, deutet die Struktur darauf hin, dass Rad14 die DNA aktiv untersucht und dass der Schaden sich umordnen muss, um die geknickte Situation zu unterstützen.

Die Aminosäurereste, die als Schlüsselreste für die Erkennung des Schadens durch Rad14 identifiziert wurden, ausgenommen Thr239 welches in XPA einem Lysin entspricht, sind in XPA konserviert sind (Abbildung 6.40). Somit verschaffen die zwei Kristallstrukturen einen Einblick in einen einheitlichen Mechanismus der Schadenserkenkung durch XPA. Als allgemeines Kriterium muss an der Schadensstelle ein starker Knick von (70°) bestehen. In diesem Sinne beweist XPA für die Erkennung von spezifischen NER-aktivierenden Schäden von großer Bedeutung zu sein. Andere NER-aktivierende Schäden, die nicht durch diesen Verformbarkeitscheck erkannt werden, wie z. B. die UV-Schäden, benötigen andere XP Proteine wie XPC und XPE für deren Erkennung. Die Fähigkeit von XPA den Doppelstrang nach der geknickten 13mer Schadenserkenngungssequenz aufzuschmelzen, ist möglicherweise notwendig für die Aktivierung und Rekrutierung weiterer NER Faktoren. XPA alleine oder zusammen mit anderen Proteinen bindet wahrscheinlich auch an geknickte DNA Strukturen, die durch andere Schadenserkennde Faktoren gebildet werden. Das könnte die Handlung von XPA als generellen Schadensverifizierer in dem NER Prozess bestätigen und deutet auf seine zentrale Bedeutung in der GGR.⁷³

```

XPA_Mus musculus      1  MATAEEKQTSPEPV-AADEPAQ-----LPAAVRASVER----
XPA_Homo sapiens      1  --MAAADGALPFAA-ALEQPAE-----LPASVRASIER----
Rad14_Aspergillus     1  --MVTEEQSAPPPPERGMSSTPGDLKRNPLTPEQLRRIENNRQK---ATAIRE--QRE---
Rad14_S. cerevisiae   1  --MTPEQKAKLEFANRKLAIERLRKRGIILSSDQLNRIESRNEPLKTRPLAVTSGSNRDNA

XPA_Mus musculus      33  -----KRQRALM-----LR-QARLAARPYPA--AAVTGGVAS
XPA_Homo sapiens      31  -----KRQRALM-----LR-QARLAARPYSATAAAATGGYAN
Rad14_Aspergillus     50  --AEQARAHNADPSSTKGVKRTYSSM-TASDPPATLRDAASTDNRLDGIKPARNFTKFV
Rad14_S. cerevisiae   59  AAAVHVPNHNGQPSALANTNTNTTSLYSGGVVDGSKRDASVLDRPTDRIRPSIRKQDYI

XPA_Mus musculus      62  VKAAPKIMDTKGGFILEEKE-EKHE-----IGNIVHEP
XPA_Homo sapiens      62  VKAAPKIIDTGGGFILEEKEEQK-----IGKVVIHQF
Rad14_Aspergillus     107 EYDFSKITDTKGGFLTEEDDRYNKALHVRDEKA--EQKPAHMTQKWERQQLLKNLHRDR
Rad14_S. cerevisiae   119 EYDFATMQNLNGGYINPKDKLPNSDFTDDQEFEFSEFGSKKQKTLQDWKKEQLERKMLYEN

XPA_Mus musculus      94  GPVM-----EFDYVICEECG-KEFMDSYLMNHFDLPTCDSCRDA-DDKHKLITKTE
XPA_Homo sapiens      95  GPVM-----EFDYVICEECG-KEFMDSYLMNHFDLPTCDNCRDA-DDKHKLITKTE
Rad14_Aspergillus     165 AGPFEPGLSVLDERTRQTCRECG-SLEIDWKWEALRCCVCHACKDKFPEKYSLLTKTE
Rad14_S. cerevisiae   179 APPPE-----HISKAPKCIECHINIEMDPVLHDVFKLQVCKCCSKEHPEKYALLTKTE

XPA_Mus musculus      143 AKQEYLKDCDLEKREPALRFLVKNRHSQWGDMLYLKIQVVKRAL--EVWGSQFALE
XPA_Homo sapiens      144 AKQEYLKDCDLEKREPLKFLVKNRHSQWGDMLYLKIQIVKRSI--EVWGSQFALE
Rad14_Aspergillus     224 AREDYLIITPELQDE-ELLPHLERFKPHKSTNNMMLYLRYQVEEYAFSAKKWGSPEALD
Rad14_S. cerevisiae   232 CKEDYFITDPELNDE-DLFIRLEKFKPHISGTFARMQLFVRCEVEAF--KKWGGEEGLD

XPA_Mus musculus      201 DAKFVRDENREKMKQKKFDKVKVGLDDAVKILLDDKPLHRM-AP----WHNRALEKRS
XPA_Homo sapiens      202 EAKFVRDENREKMKQKKFDKVKELRRV-----RS-SV----WKRETIVHQH
Rad14_Aspergillus     283 AEFHRENEKRRREVKFKSKLEDLKKRTRVDAYRRSRQATGGNFGDDLGGCGRIIVHQW
Rad14_S. cerevisiae   289 EEWQRREGKAHREKKYKIKEMRLKTRAQYTNRLREK-----HGKAHIIHF

XPA_Mus musculus      255 SVLTRTTTKQISFIYSINTCDDCAK-----
XPA_Homo sapiens      245 EYGP---EENLEDDMYRKTCTMCGHELTYEKM
Rad14_Aspergillus     343 GRSV---EDPKTIGVAKCVDCGMEVELEF
Rad14_S. cerevisiae   340 SDPVDGGIDEDGYQIQRRCCTDCGLETEEIDI

```

Abbildung 6.40: Sequenzabgleich von XPA/Rad14 Homologen. Der Sequenzabgleich wurde mit Clustal Omega¹⁵⁵ gemacht. Rot eingerahmt: Sequenzen der Kristallstruktur. Gelb eingerahmt: Cysteine des Zinkfingers. Der Farbcode entspricht dem von Abbildung 6.28.

6.2.11 Ausblick

Die NER ist für die Beseitigung einer Vielfalt an unterschiedlichen DNA-Schäden verantwortlich. Wie es genau zur Schadenserkenkung kommt, war bisher unklar. Die in dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen von Rad14s in Komplex mit unterschiedlichen DNA Schäden liefern einen ersten Einblick in den Schadenserkenkungsmechanismus der NER. Zwei Proteine binden den geschädigten Strang unterhalb und oberhalb des Schadens, wobei es an der Schadensstelle zur DNA Biegung von ca. 70° kommt. Die Erkennung erfolgt durch Detektion einer energetisch destabilisierten DNA Helix. EMSA-Experimente zeigen eine Affinität des Proteins zu AAF-dG, Cisplatin sowie Fluorescein geschädigter DNA. Da jedoch das Fluorescein über einen langen Spacer an die Nukleobase verknüpft ist, ist eine Interkalation dieses aromatischen Restes in den Doppelstrang unwahrscheinlich. Es stellt sich also die Frage wie das Protein dieses Substrat erkennt. Kristallisationsstudien mit Fluorescein-modifizierter DNA sollten deshalb wieder aufgenommen werden, um einen detaillierten Einblick in diese Schadensbindung zu erhalten.

Weiterhin sollten die DNA-Substrate für die Kristallisation optimiert werden. Man könnte längere DNA-Stränge verwenden, um eine Bindung der Proteine 4 – 5 Basenpaare vom Schaden entfernt auch an längeren DNA-Sequenzen zu bestätigen.

Zum anderen wäre es für die Forschung von größter Bedeutung die genaue Funktion des humanen Proteins zu erforschen. Die erhaltenen Informationen mit dem Hefeprotein müssen mit humanem Protein bestätigt werden. Weist es ähnliche Bindungscharakteristika wie das Hefeprotein auf? Weitere Bindungsstudien sowie Strukturanalysen des XPA Proteins wären deshalb von großem Interesse.

Schließlich könnten *in vivo* Studien von XPA mit weiteren NER Proteinen durchgeführt werden, um Informationen über potenzielle Interaktionspartner herauszufinden. Solch ein Experiment sollte über das Zusammenspiel der verschiedenen NER Enzyme aufklären.

7 Anhang

7.1 Gensequenzen von XPA

Sequenz des *xpafl* Gens aus *H. sapiens* (819 bp)

ATGGCGGCGGCCGACGGGGCTTTGCCGGAGGCGGCGGCTTTAGAGCAACCCGCGGAGCTGCC
 TGCCTCGGTGCGGGCGAGTATCGAGCGGAAGCGGCAGCGGGCACTGATGCTGCGCCAGGCC
 GGCTGGCTGCCCGGCCCTACTCGGCGACGGCGGCTGCGGCTACTGGAGGCATGGCTAATGTA
 AAAGCAGCCCCAAAGATAATTGACACAGGAGGAGGCTTCATTTTAGAAGAGGAAGAAGA
 AGAACAGAAAATTGGAAAAGTTGTTTCATCAACCAGGACCTGTTATGGAATTTGATTATGTAA
 TATGCGAAGAATGTGGGAAAGAATTTATGGATTCTTATCTTATGAACCACTTTGATTTGCCA
 ACTTGTGATAACTGCAGAGATGCTGATGATAAACACAAGCTTATAACCAAAACAGAGGCCAAA
 ACAAGAATATCTTCTGAAAGACTGTGATTTAGAAAAAAGAGAGCCACCTCTTAAATTTATTG
 TGAAGAAGAATCCACATCATTCACAATGGGGTGATATGAAACTCTACTTAAAGTTACAGATT
 GTGAAGAGGTCTCTTGAAGTTTGGGGTAGTCAAGAAGCATTAGAAGAAGCAAAGGAAGTCCG
 ACAGGAAAACCGAGAAAAAATGAAACAGAAGAAATTTGATAAAAAAGTAAAAGAATTGCGGC
 GAGCAGTAAGAAGCAGCGTGTGGAAAAGGGAGACGATTGTTTCATCAACATGAGTATGGACCA
 GAAGAAAACCTAGAAGATGACATGTACCGTAAGACTTGTACTATGTGTGGCCATGAACTGAC
 ATATGAAAAAATGTAA

Sequenz des *xpas* Gens aus *H. sapiens* (DNA-bindendes Fragment, 366 bp)

ATGGAATTTGATTATGTAATATGCGAAGAATGTGGGAAAGAATTTATGGATTCTTATCTTAT
 GAACCACTTTGATTTGCCAACTTGTGATAACTGCAGAGATGCTGATGATAAACACAAGCTTA
 TAACCAAAACAGAGGCCAAAACAAGAATATCTTCTGAAAGACTGTGATTTAGAAAAAAGAGAG
 CCACCTCTTAAATTTATTGTGAAGAAGAATCCACATCATTCACAATGGGGTGATATGAAACT
 CTACTTAAAGTTACAGATTGTGAAGAGGTCTCTTGAAGTTTGGGGTAGTCAAGAAGCATTAG
 AAGAAGCAAAGGAAGTCCGACAGGAAAACCGAGAAAAAATGAAACAGAAGAAATTT

7.2 Gensequenzen von Rad14

Sequenz des *rad14s* Gens aus *S. cerevisiae* (DNA-bindendes Fragment, 363 bp)

ATGGCGCCGAAATGTATTGAATGTCATATTAATATTGAGATGGATCCTGTGCTACATGATGT
GTTCAAGTTACAAGTTTGTAAACAGTGTTCTAAGGAGCATCCAGAAAAGTATGCACTACTGA
CGAAAACAGAATGTAAGGAAGATTACTTTTTTAACAGACCCCGAATTGAATGATGAGGATCTC
TTTCATAGACTAGAAAAGCCGAACCCTCATTTCGGGGACATTTGCAAGAATGCAACTATTTGT
TAGATGTGAAGTGGAAGCCTTTGCGTTCAAGAAATGGGGTGGAGAAGAAGTTTAGATGAGG
AATGGCAACGTCGTGAAGAAGGAAAGGCTCACAGAAGGGAGAAAAATACTAA

Sequenz des $\Delta 4$ *Crad14s* Gens aus *S. cerevisiae* (DNA-bindendes Fragment, 351bp)

ATGGCGCCGAAATGTATTGAATGTCATATTAATATTGAGATGGATCCTGTGCTACATGATGT
GTTCAAGTTACAAGTTTGTAAACAGTGTTCTAAGGAGCATCCAGAAAAGTATGCACTACTGA
CGAAAACAGAATGTAAGGAAGATTACTTTTTTAACAGACCCCGAATTGAATGATGAGGATCTC
TTTCATAGACTAGAAAAGCCGAACCCTCATTTCGGGGACATTTGCAAGAATGCAACTATTTGT
TAGATGTGAAGTGGAAGCCTTTGCGTTCAAGAAATGGGGTGGAGAAGAAGTTTAGATGAGG
AATGGCAACGTCGTGAAGAAGGAAAGGCTCACAGAAGGTAA

7.3 Zusammensetzung des *LeMaster Mediums*¹⁰⁵

Chemikalie	1 L	2 L	4 L
Alanin	0.5 g	1.0 g	2.0 g
Arginin HCl	0.58 g	1.16 g	2.32 g
Asparaginsäure	0.41 g	0.80 g	1.6 g
Cystein	0.03 g	0.06 g	0.12 g
Glutaminsäure	0.67 g	1.34 g	2.68 g
Glutamin	0.33 g	0.66 g	1.32 g
Glycin	0.54 g	1.08 g	2.16 g
Histidin	0.06 g	0.12 g	0.24 g
Isoleucin	0.23 g	0.46 g	0.92 g
Leucin	0.23 g	0.46 g	0.92 g
Lysin HCl	0.42 g	0.84 g	1.68 g
Phenylalanin	0.13 g	0.26 g	0.52 g
Prolin	0.10 g	0.20 g	0.40 g
Serin	2.08 g	4.16 g	8.32 g
Threonin	0.23 g	0.46 g	0.92 g
Tyrosin	0.17 g	0.34 g	0.68 g
Valin	0.23 g	0.46 g	0.92 g
Adenin	0.50 g	1.0 g	2.0 g
Guanosin	0.67 g	1.34 g	2.68 g
Thymin	0.17 g	0.34 g	0.68 g
Uracil	0.50 g	1.0 g	2.0 g
Natriumacetat	1.50 g	3.0 g	6.0 g
Bernsteinäure	1.5 g	3.0 g	6.0 g
Ammoniumchlorid	0.75 g	1.50 g	3.0 g
Natriumhydroxid	1.08 g	2.16 g	4.32 g
K ₂ HPO ₄ wasserfrei	8.0 g	16.0 g	32.0 g

mit ddH₂O auffüllen, autoklavieren und auf pH 7.5 einstellen

nicht-autoklavierbare Portion für 100 mL ddH₂O (steril filtriert)

(900 mL autoklaviertes Medium + 100 mL nicht-autoklavierbare Portion)

Chemikalie	100 mL
Glucose	10 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.25 g
FeSO ₄	4.2 mg
konz. H ₂ SO ₄	8 µL
Thiamin HCl	5 mg
DL-selenomethionine	50 mg/L

7.4 Daten der Kristallstrukturen

Tabelle 7.1: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstrukturen.

	SeMet Rad14-AAF-dG	Rad14-AAF-dG	Rad14-1,2-GG
<i>Wavelength</i> (Å)	0.979	0.976	0.873
<i>Resolution range</i> (Å)	20 – 3.1 (3.2 – 3.1)	65.3–1.8(1.84–1.80)	54.4–2.8(2.9 – 2.8)
<i>Space group</i>	P2 ₁	P4 ₁	P4 ₁
<i>Unit cell</i>	a=66.4, b=51.7, c=68.8 β=111.98	a=53.8, b=53.8, c=130.4	a=54.4, b=54.4, c=130.8
<i>Total reflections</i>	59,565 (5,963)	253,904 (14,638)	39,291 (3,836)
<i>Unique reflections</i>	7,284 (709)	34232 (1948)	9,402 (933)
<i>Multiplicity</i>	8.2 (8.4)	7.4 (7.5)	4.2 (4.1)
<i>Completeness</i> (%)	99.7 (99.2)	99.8 (95.6)	99.7 (98.1)
<i>Mean I/sigma(I)</i>	21.3 (7.46)	10.7 (2.6)	9.1 (1.2)
<i>Wilson B-factor</i>	88.69	31.3	58.5
<i>R-merge</i>	0.07 (0.27)	0.08 (0.89)	0.1495 (1.33)
<i>Anomalous completeness</i>	0.995 (0.996)	98.8 (96).4	-
<i>Anomalous multiplicity</i>	4.1 (4.1)	3.4 (3.5)	-
<i>CC_{1/2}</i>	0.998 (0.994)	0.998 (0.593)	0.992 (0.485)
<i>CC*</i>	1 (0.999)	-	0.998 (0.808)
<i>Figure of merit</i>	0.33	-	-
<i>R-work</i>		0.21 (0.312)	0.213 (0.363)
<i>R-free</i>		0.241 (0.347)	0.256 (0.343)
<i>Number of non-hydrogen a atoms</i>		3,172	4,088
<i>macromolecules</i>		3,049	4,074
<i>ligands</i>		80	14
<i>water</i>		43	0
<i>Protein residues</i>		291	339
<i>RMS(bonds)</i>		0.018	0.012
<i>RMS(angles)</i>		2.15	1.50
<i>Ramachandran favored</i> (%)		96	97
<i>Ramachandran outliers</i> (%)		0	0
<i>Average B-factor</i>		48.6	55.7
<i>macromolecules</i>		48.5	55.8
<i>ligands</i>		60.4	48.3
<i>solvent</i>		37	

7.5 Abkürzungsverzeichnis

3'-Ende	3-Strich der Oligonukleotide
5'-Ende	5-Strich der Oligonukleotide
A	Adenin
AAF	Acetylaminofluoren
AAP	Acetylaminopyren
AF	Aminofluoren
ACN	Acetonitril
AP	Auftragspuffer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BER	<i>base excision repair</i> , Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
c	<i>concentration</i> , Konzentration
C	Cytosin
Car	Carbenicillin
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
Cm	Chloramphenicol
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
Da	Dalton
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dG	Desoxyguanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	<i>double stranded</i> , doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>

ERCC1	<i>excision repair cross complementing 1 protein</i>
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
<i>for</i>	<i>forward</i>
G	Guanin
GGR	<i>global genome repair</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
His	Histidin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatographie</i>
ddH ₂ O	filtriertes und entionisiertes Wasser
I	Intensität
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>i</i> PrOH	<i>iso</i> -Propanol
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
konz.	Konzentriert
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
M	Molar (mol/L)
m	Meter
MAD	<i>multiple wavelength anomalous dispersion</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation
min	Minuten
MIR	multipler isomorpher Ersatz
MR	molekulare Ersatz
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
NER	<i>nucleotide excision repair</i> , Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PEG	Polyethylenglycol
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pol	Polymerase
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RFC	Replikationsfaktor C
RP	<i>reversed phase</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
SAD	<i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR	einzelner isomorpher Ersatz
ssDNA	<i>single stranded</i> , einzelsträngige DNA
T	Thymin
T	Temperatur
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEMED	<i>N,N',N'',N'''</i> - Tetramethylethylenendiamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
T _M	Schmelztemperatur
TLS	<i>translesion synthesis</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	<i>time of flight</i>
u	Units
U	Uracil
UV	Ultraviolett
UV-DDB	<i>UV-damaged DNA binding protein</i>
V	Volt

v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenanteil
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> , Massenanteil
XP	<i>Xeroderma Pigmentosum</i>
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum Group A Complementation Protein</i>
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum Group C Complementation Protein</i>
XPE	<i>Xeroderma Pigmentosum Group E Complementation Protein</i>

8 Literaturverzeichnis

- 1 S. R. Rajski, B. A. Jackson & J. K. Barton, *Mutat. Res.* **2000**, *447*, 49-72. DNA repair: models for damage and mismatch recognition.
- 2 D. P. Batty & R. D. Wood, *Gene.* **2000**, *241*, 193-204. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA.
- 3 H. Lodisch, *Spektrum akademischer Verlag.* **2001**. Molekulare Zellbiologie.
- 4 W. Yang & R. Woodgate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, *104*, 15591-15598. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis.
- 5 H. Ohmori *et al.*, *Mol. Cell.* **2001**, *8*, 7-8. The Y-family of DNA polymerases.
- 6 D. M. Noll, T. M. Mason & P. S. Miller, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 277-301. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA.
- 7 M. Christmann *et al.*, *Toxicology.* **2003**, *193*, 3-34. Mechanisms of human DNA repair: an update.
- 8 A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32153-32157. Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary.
- 9 A. C. Kneuttinger *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **2013**. Formation and Direct Repair of UV-induced Dimeric DNA Pyrimidine Lesions.
- 10 A. W. MacFarlane & R. J. Stanley, *Biochemistry.* **2003**, *42*, 8558-8568. Cis-syn thymidine dimer repair by DNA photolyase in real time.
- 11 T. Lindahl *et al.*, *Basic Life Sci.* **1982**, *20*, 89-102. Cellular defense mechanisms against alkylation of DNA.
- 12 B. Sedgwick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 148-157. Repairing DNA-methylation damage.
- 13 Y. Mishina, E. M. Duguid & C. He, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 215-232. Direct reversal of DNA alkylation damage.
- 14 D. O. Zharkov, *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1544-1565. Base excision DNA repair.

- 15 J. Jiricny, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, 5, a012633. Postreplicative mismatch repair.
- 16 P. Modrich & R. Lahue, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 101-133. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology.
- 17 O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 2946-2974. Chemistry and biology of DNA repair.
- 18 D. A. Erie & K. R. Weninger, *DNA Repair (Amst)*. **2014**. Single molecule studies of DNA mismatch repair.
- 19 K. G. Au, K. Welsh & P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12142–12148. Initiation of methyl-directed mismatch repair.
- 20 A. B. Buermeier *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* **1999**, 33, 533-564. Mammalian DNA mismatch repair.
- 21 G. M. Li, *Cell Res.* **2008**, 18, 85-98. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair.
- 22 J. E. Cleaver, *J. Dermatol. Sci.* **2000**, 23, 1-11. Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum.
- 23 M. Berneburg & A. R. Lehmann, *Adv. Genet.* **2001**, 43, 71-102. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription.
- 24 F. Hebra & M. Kaposi, *New Sydenham. Soc.* **1874**, 61, 252-258. On diseases of the skin including the exanthemata.
- 25 D. Bootsma *et al.*, *McGraw-Hill Book Co.: New York*. **1997**. In the metabolic basis of inherited disease.
- 26 A. Sancar, *Science*. **1994**, 266, 1954-1956. Mechanisms of DNA excision repair.
- 27 C. Masutani *et al.*, *Nature*. **1999**, 399, 700-704. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta.
- 28 G. W. Jones, S. H. Reed & R. Waters, *Yeast*. **1997**, 13, 31-36. Characterization of the rad14-2 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the recognition of UV photoproducts by the Rad14 protein.
- 29 E. A. Cockayne, *Arch. Dis. Child.* **1936**, 11, 1-8. Dwarfism with retinal atrophy and deafness.

- 30 J. Q. Svejstrup, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 21-29. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair.
- 31 V. H. Price *et al.*, *Arch. Dermatol.* **1980**, 116, 1375-1384. Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex.
- 32 E. Bergmann & J. M. Egly, *Trends Genet.* **2001**, 17, 279-286. Trichothiodystrophy, a transcription syndrome.
- 33 W. L. de Laat, N. G. Jaspers & J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1999**, 13, 768-785. Molecular mechanism of nucleotide excision repair.
- 34 K. Sugasawa, *Carcinogenesis*. **2008**, 29, 455-465. Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair.
- 35 C. J. Jones & R. D. Wood, *Biochemistry*. **1993**, 32, 12096-12104. Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA.
- 36 D. B. Zamble *et al.*, *Biochemistry*. **1996**, 35, 10004-10013. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease.
- 37 N. E. Geacintov *et al.*, *Biopolymers*. **2002**, 65, 202-210. Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the nucleotide excision repair machinery.
- 38 A. Sarasin, *DNA Repair (Amst)*. **2003**, 2, 437-439. Choice between death by senescence or by cancer?
- 39 Y. H. You *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 44688-44694. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells.
- 40 A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2203-2237. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
- 41 X. Zhao *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32580-32590. Reaction mechanism of (6-4) photolyase.
- 42 J. K. Kim & B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 228, 849-854. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'→5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.
- 43 P. H. Clingen *et al.*, *Cancer Res.* **1995**, 55, 2245-2248. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells.

- 44 D. Perdiz *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 26732-26742. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis.
- 45 K. Bekki *et al.*, *J. UOEH.* **2013**, 35, 17-24. Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives.
- 46 S. Schneider, S. Schorr & T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 87-95. Crystal structure analysis of DNA lesion repair and tolerance mechanisms.
- 47 A. Alt *et al.*, *Science.* **2007**, 318, 967-970. Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase η .
- 48 S. Schorr *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, 107, 20720-20725. Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase η by bulky acetylaminofluorene DNA adducts.
- 49 R. H. Heflich & R. E. Neft, *Mutat. Res.* **1994**, 318, 73-114. Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites.
- 50 L. C. Gillet & O. D. Scharer, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 253-276. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair.
- 51 L. C. Gillet, J. Alzeer & O. D. Scharer, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 1961-1969. Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis.
- 52 S. Dutta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, 101, 16186-16191. Crystal structures of 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene in complex with T7 DNA polymerase reveal mechanisms of mutagenesis.
- 53 D. Wang & S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 307-320. Cellular processing of platinum anticancer drugs.
- 54 T. Reissner *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 3077-3080. Crystal structure of a cisplatin-(1,3-GTG) cross-link within DNA polymerase η .
- 55 E. R. Jamieson & S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467-2498. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts.
- 56 Y. S. Krasikova *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 10936-10947. Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair.

- 57 M. J. DellaVecchia *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 45245-45256. Analyzing the handoff of DNA from UvrA to UvrB utilizing DNA-protein photoaffinity labeling.
- 58 A. Sancar & M. S. Tang, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 905-921. Nucleotide excision repair.
- 59 H. Naegeli & K. Sugasawa, *DNA Repair (Amst)*. **2011**, 10, 673-683. The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality.
- 60 J. H. Hoeijmakers, *Nature*. **2001**, 411, 366-374. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.
- 61 P. C. Hanawalt & G. Spivak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 958-970. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises.
- 62 I. Mellon, G. Spivak & P. C. Hanawalt, *Cell*. **1987**, 51, 241-249. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene.
- 63 K. S. Sweder & P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1992**, 89, 10696-10700. Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription.
- 64 A. Aboussekhra *et al.*, *Cell*. **1995**, 80, 859-868. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components.
- 65 U. Camenisch & H. Nägeli, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, 637, 28-38. XPA Gene, its product and biological roles.
- 66 D. Hoogstraten *et al.*, *Mol. Cell*. **2002**, 10, 1163-1174. Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo.
- 67 T. Ikegami *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 701-706. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA.
- 68 E. C. Friedberg, *Nat. Rev. Cancer*. **2001**, 1, 22-33. How nucleotide excision repair protects against cancer.
- 69 S. C. Shuck, E. A. Short & J. J. Turchi, *Cell Res.* **2008**, 18, 64-72. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology.
- 70 M. T. Hess *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1997**, 94, 6664-6669. Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair.

- 71 D. L. Mitchell & R. S. Nairn, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 805-819. The biology of the (6-4) photoproduct.
- 72 H. Asahina *et al.*, *Mutat. Res.* **1994**, *315*, 229-237. The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage.
- 73 K. Sugasawa *et al.*, *Mol. Cell.* **1998**, *2*, 223-232. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair.
- 74 T. Kobayashi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4662-4668. Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair.
- 75 K. Sugasawa *et al.*, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 507-521. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair.
- 76 T. Hey *et al.*, *Biochemistry.* **2002**, *41*, 6583-6587. The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay.
- 77 K. Sugasawa *et al.*, *DNA Repair (Amst.)* **2002**, *1*, 95-107. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex.
- 78 M. Volker *et al.*, *Mol. Cell.* **2001**, *8*, 213-224. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo.
- 79 J. H. Min & N. P. Pavletich, *Nature.* **2007**, *449*, 570-575. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein.
- 80 B. J. Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 424-428. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair.
- 81 A. Scrima *et al.*, *Cell.* **2008**, *135*, 1213-1223. Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex.
- 82 M. Missura *et al.*, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3554-3564. Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair.
- 83 L. Li *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 1993-1998. Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair.
- 84 U. Camenisch *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 278-284. Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair.

- 85 M. Lukin & C. de Los Santos, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 607-686. NMR structures of damaged DNA.
- 86 Y. Fujiwara *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20027-20033. Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein.
- 87 R. Strasser, *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München)*. **2010**. Studien zur Erkennung geschädigter DNA in der Nukleotid- und Basenexzisionsreparatur.
- 88 Z. G. Yang *et al.*, *Biochemistry*. **2002**, *41*, 13012-13020. Dimerization of human XPA and formation of XPA2-RPA protein complex.
- 89 Y. Liu *et al.*, *Biochemistry*. **2005**, *44*, 7361-7368. Cooperative interaction of human XPA stabilizes and enhances specific binding of XPA to DNA damage.
- 90 M. Bankmann, L. Prakash & S. Prakash, *Nature*. **1992**, *355*, 555-558. Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins.
- 91 N. J. Hess *et al.*, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1970-1975. Human nucleotide excision repair protein XPA: extended X-ray absorption fine-structure evidence for a metal-binding domain.
- 92 I. Kuraoka *et al.*, *Mutat. Res.* **1996**, *362*, 87-95. Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein.
- 93 K. Morikawa & M. Shirakawa, *Mutat Res.* **2000**, *460*, 257-275. Three-dimensional structural views of damaged-DNA recognition: T4 endonuclease V, E. coli Vsr protein, and human nucleotide excision repair factor XPA.
- 94 I. Miyamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12182-12187. Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein. Identification of essential domains for nuclear localization and DNA excision repair.
- 95 G. W. Buchko *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2635-2643. DNA-XPA interactions: a ³¹P NMR and molecular modeling study of dCCAATAACC association with the minimal DNA-binding domain (M98-F219) of the nucleotide excision repair protein XPA.
- 96 G. W. Buchko *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2779-2788. Structural features of the minimal DNA binding domain (M98-F219) of human nucleotide excision repair protein XPA.

- 97 G. W. Buchko *et al.*, *Biochemistry*. **1999**, *38*, 15116-15128. Interactions of human nucleotide excision repair protein XPA with DNA and RPA70 Delta C327: chemical shift mapping and ¹⁵N NMR relaxation studies.
- 98 N. Buschta-Hedayat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1999**, *96*, 6090-6095. Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA.
- 99 Z. Yang *et al.*, *Biochemistry*. **2006**, *45*, 15921-15930. Specific and efficient binding of xeroderma pigmentosum complementation group A to double-strand/single-strand DNA junctions with 3'- and/or 5'-ssDNA branches.
- 100 M. Wang, A. Mahrenholz & S. H. Lee, *Biochemistry*. **2000**, *39*, 6433-6439. RPA stabilizes the XPA-damaged DNA complex through protein-protein interaction.
- 101 U. Camenisch *et al.*, *DNA Repair (Amst)*. **2007**, *6*, 1819-1828. Xeroderma pigmentosum complementation group A protein is driven to nucleotide excision repair sites by the electrostatic potential of distorted DNA.
- 102 H. M. Weir *et al.*, *EMBO J*. **1993**, *12*, 1311-1319. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1.
- 103 C. M. Read *et al.*, *Nucleic Acids Res*. **1993**, *21*, 3427-3436. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1.
- 104 H. Yan *et al.*, *Science*. **2002**, *297*, 1143. Allelic variation in human gene expression.
- 105 D. M. LeMaster & F. M. Richards, *Biochemistry*. **1985**, *24*, 7263-7268. ¹H-¹⁵N heteronuclear NMR studies of Escherichia coli thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type.
- 106 F. Lottspeich, Zorbas, H., *Spektrum akademischer Verlag*. **1998**, Bioanalytik.
- 107 H. Lodisch, *Spektrum akademischer Verlag*. **2001**, Molekulare Zellbiologie.
- 108 www.iba-lifesciences.com.
- 109 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- 110 H. T. Allawi & J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry*. **1997**, *36*, 10581-10594. Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA.
- 111 T. Zaliznyak *et al.*, *Chem. Res. Toxicol*. **2006**, *19*, 745-752. Structure and stability of duplex DNA containing the 3-(deoxyguanosin-N2-yl)-2-acetylaminofluorene (dG(N2)-AAF) lesion: a bulky adduct that persists in cellular DNA.

- 112 A. Biosciences, **2003**, *Edition AB*, 1118-1132. Partial Purification of DNA binding proteins using HiTrap Heparin HP.
- 113 B. J. Smith, *Methods Mol. Biol.* **1984**, *1*, 41-55. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins.
- 114 I. K. Webb *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 733-743. Gas-phase intramolecular protein crosslinking via ion/ion reactions: ubiquitin and a homobifunctional sulfo-NHS ester.
- 115 W. M. Shevchenko A., Vorm O. and Mann M., *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850–858. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels.
- 116 K. Phillips & A. H. de la Pena, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2011**, *Chapter 10*, Unit10 28. The combined use of the ThermoFluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization.
- 117 U. B. Ericsson *et al.*, *Anal. Biochem.* **2006**, *357*, 289-298. ThermoFluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies.
- 118 www.hamptonresearch.com.
- 119 CCP4, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760-763. The CCP4 suite: programs for protein crystallography.
- 120 W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 133-144. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement.
- 121 C. Vonrhein *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 293-302. Data processing and analysis with the autoPROC toolbox.
- 122 T. C. Terwilliger *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 582-601. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard.
- 123 P. H. Zwart *et al.*, *Methods Mol Biol.* **2008**, *426*, 419-435. Automated structure solution with the PHENIX suite.
- 124 T. C. Terwilliger *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2008**, *64*, 61-69. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard.

- 125 P. D. Adams *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213-221. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.
- 126 A. J. McCoy *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 458-464. Likelihood-enhanced fast translation functions.
- 127 A. J. McCoy *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674. Phaser crystallographic software.
- 128 P. Emsley *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501. Features and development of Coot.
- 129 G. N. Murshudov *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355-367. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures.
- 130 M. D. Winn, G. N. Murshudov & M. Z. Papiz, *Methods Enzymol.* **2003**, *374*, 300-321. Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions.
- 131 J. Painter & E. A. Merritt, *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 109-111. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models.
- 132 L. M. Iakoucheva *et al.*, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 560-571. Identification of intrinsic order and disorder in the DNA repair protein XPA.
- 133 E. A. Maltseva *et al.*, *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 77-84. Crosslinking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages.
- 134 T. Bergfors, *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 66-76. Seeds to crystals.
- 135 J. R. Luft & G. T. DeTitta, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 988-993. A method to produce microseed stock for use in the crystallization of biological macromolecules.
- 136 S. N. Guzder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, *90*, 5433-5437. Yeast DNA-repair gene RAD14 encodes a zinc metalloprotein with affinity for ultraviolet-damaged DNA.
- 137 K. Rodriguez *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34180-34189. Affinity purification and partial characterization of a yeast multiprotein complex for nucleotide excision repair using histidine-tagged Rad14 protein.
- 138 Y. Zhou & L. J. Romano, *Biochemistry.* **1993**, *32*, 14043-14052. Solid-phase synthesis of oligonucleotides containing site-specific N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-

- (acetylamino)fluorene adducts using 9-fluorenylmethoxycarbonyl as the base-protecting group.
- 139 Z. Wang & C. J. Rizzo, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 565-568. Synthesis of the C8-deoxyguanosine adduct of the food mutagen IQ.
- 140 L. C. Gillet & O. D. Scharer, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4205-4208. Preparation of C8-amine and acetylamine adducts of 2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis.
- 141 J. Butenandt, A. P. M. Eker & T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 642-654. Synthesis, crystal structure, and enzymatic evaluation of a DNA photolesion isostere.
- 142 L. T. Burgdorf & T. Carell, *Chemistry*. **2002**, *8*, 293-301. Synthesis, stability, and conformation of the formamidopyrimidine G DNA lesion.
- 143 J. Butenandt, L. T. Burgdorf & T. Carell, *Synthesis-Stuttgart*. **1999**, 1085-1105. Synthesis of DNA lesions and DNA-lesion-containing oligonucleotides for DNA-repair studies.
- 144 M. Wei *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38774-38780. Effects of spectator ligands on the specific recognition of intrastrand platinum-DNA cross-links by high mobility group box and TATA-binding proteins.
- 145 M. J. Maul *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 10076-10080. Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase.
- 146 M. F. van Oosterwijk *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13599-13604. Lack of transcription-coupled repair of acetylaminofluorene DNA adducts in human fibroblasts contrasts their efficient inhibition of transcription.
- 147 M. Kartalou & J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 23-43. Mechanisms of resistance to cisplatin.
- 148 J. C. Huang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1994**, *91*, 12213-12217. Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts.
- 149 D. Gunz, M. T. Hess & H. Naegeli, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25089-25098. Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism.
- 150 S. Schorr, *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München)*. **2010**. Replikation von sterisch anspruchsvollen DNA Addukten.

- 151 W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 133-144. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement.
- 152 P. H. Zwart *et al.*, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *426*, 419-435. Automated structure solution with the PHENIX suite.
- 153 A. J. McCoy *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674. Phaser crystallographic software.
- 154 T. Buterin *et al.*, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 913-922. DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix.
- 155 F. Sievers *et al.*, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.

Lebenslauf

Sandra Céline Heidi Guislain Koch

Geburtsdatum: 2. April 1984

Geburtsort: Starnberg

Staatsangehörigkeit: Deutschland, Frankreich

Ausbildung

- 03/2010 – 08/2014 Promotion in der Gruppe von *Prof. Dr. T. Carell* an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München.
- 04/2009 – 10/2009 Masterarbeit bei *Prof. Dr. T. Carell*, LMU München. „Isolierung und DNA-Bindungsstudien des Schadenserkenngungsproteins XPA/Rad14 in der Nukleotidexzisionsreparatur“.
- 08/2008 – 12/2008 Biochemisches Forschungspraktikum an der University of Florida (UF), Gainesville, USA. „*HIV-1 Protease Purification and Crystallization*“.
- 10/2007 – 10/2009 Master (M. Sc.) in Biochemie an der LMU München.
- 10/2004 – 9/2007 Bachelor (B. Sc.) in Chemie und Biochemie an der LMU München. Bachelorarbeit bei *Prof. Dr. T. Carell*, LMU München. „Isolierung und Bindungsstudien der DNA-Glycosylase Fpg in der DNA Basenexzisionsreparatur“.
- 09/2002 – 07/2004 Ausbildung zur Chemisch-Technischen Assistentin (CTA) an der Chemieschule Dr. Erwin Elhardt, München.
- 07/2002 Abitur, Centre International de Valbonne (CIV), Frankreich.

Auszeichnung

Klaus Römer-Preis für exzellente wissenschaftliche Leistungen an der LMU München.

Sprachen

Deutsch (Muttersprache), Französisch (Muttersprache), Italienisch (Muttersprache), English (fließend in Wort und Schrift).