

Bakterielle Einzelstrang-DNA bindende Proteine und ihre Wechselwirkungen

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Gregor Witte

geboren am 05.07.1974 in Langenhagen

Hannover 2004

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Claus Urbanke im Zeitraum vom Juni 2001 bis Juni 2004 am Institut für Biophysikalische Chemie im Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Referent: Prof. Dr. C. Urbanke

Korreferent: Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 27.08.2004

Zusammenfassung

Witte, Gregor

Bakterielle Einzelstrang-DNA bindende Proteine und ihre Wechselwirkungen

Einzelstrang-DNA bindende Proteine (SSB) spielen bei der DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination bei Organismen in allen bekannten Reichen eine essentielle Rolle für das Überleben der Zelle. Eine der strukturellen Hauptgruppen, die homotetrameren SSB-Proteine, kommen sowohl in Prokaryoten als auch in eukaryotischen Mitochondrien vor. Als Prototyp dieser Gruppe gilt das SSB aus *Escherichia coli* (*EcoSSB*). Obwohl *EcoSSB* das am besten charakterisierte homotetramere SSB ist, sind seine Protein-Protein-Interaktionen nur wenig untersucht. Dazu zählt zum Beispiel die in dieser Arbeit untersuchte Wechselwirkung des *EcoSSB* mit der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III bei der Replikation des Folgestrangs.

Die Wechselwirkung der beiden Proteine wurde sowohl durch analytische Ultrazentrifugation als auch durch Oberflächenplasmonresonanz-Experimente untersucht. Bei niedrigen Ionenstärken erhöht sich durch Bindung von *EcoSSB* an Einzelstrang-DNA (ssDNA) die Affinität von *EcoSSB* zu χ um etwa das 20-fache. Diese Erhöhung der Affinität stellt sicher, dass die χ -Untereinheit der Polymerase in ständigem Kontakt mit den SSBs auf dem Folgestrang bleibt. Als thermodynamische Konsequenz erhöht sich auch die Affinität von SSB zu ssDNA, wenn das SSB an χ gebunden ist. Dies konnte in DNA-Schmelzexperimenten gezeigt werden. Diese Affinitätserhöhung kann ein vorzeitiges Dissoziieren des SSBs und damit das Ausbilden von *Hairpin*-Strukturen verhindern, die die DNA-Replikation behindern würden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Klonierung, Expression in *E.coli* und biophysikalische Charakterisierung der SSBs aus *Deinococcus radiodurans* (*DraSSB*) und *Thermus aquaticus* (*TaqSSB*). Diese Proteine zeigen in der Sequenzanalyse Homologien zu den homotetrameren SSBs. Während die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz des *TaqSSB* mit der in den Datenbanken übereinstimmte, ergab die Sequenzierung des *DraSSB*-Gens eine von dem Eintrag in der Datenbank abweichende Sequenz, die an die EMBL-Datenbank übermittelt wurde (EMBL DRA564860). Beide SSBs haben eine durch Genduplikation verdoppelte ssDNA-Bindungsdomäne und es konnte durch analytische Ultrazentrifugation gezeigt werden, dass sie als Dimere in Lösung vorliegen. Sie stehen damit in formaler Analogie zu den homotetrameren SSBs. Die Bindung von ssDNA wurde in *Stopped-Flow*-Kinetiken und Fluoreszenztitrationen untersucht und zeigte bis auf die Abwesenheit eines *EcoSSB*-ähnlichen Niedrigsalzmodus große Ähnlichkeiten zu *EcoSSB*. In Komplementationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass *DraSSB* *EcoSSB* *in vivo* ersetzen kann, was auf eine große funktionelle Ähnlichkeit der beiden Proteine aus den unterschiedlichen Spezies hinweist.

Schlüsselwörter: SSB, Analytische Ultrazentrifugation, Protein-Protein-Interaktionen

Abstract

Witte, Gregor

Prokaryotic single-stranded DNA binding proteins and their interactions

Single-stranded DNA binding proteins (SSB) are involved in DNA replication, repair and recombination in all known species and play an essential role for the survival of the cells. One of the major subgroups, the group of homotetrameric SSBs, comprises both the prokaryotic SSBs and SSBs from eukaryotic mitochondria. SSB from *Escherichia coli* (*EcoSSB*) is commonly treated as a prototype for this group and though it is well-characterized there are still some functions and protein-protein-interactions which have not been characterized yet. In this thesis the role of *EcoSSB* at the lagging-strand of DNA replication and its interaction with the χ -subunit of DNA-polymerase III was investigated.

Interaction of χ and *EcoSSB* was investigated both by analytical ultracentrifugation and surface plasmon resonance experiments. Binding of *EcoSSB* to single-stranded DNA (ssDNA) in low ionic strength buffer results in a 20-fold increase in the affinity of *EcoSSB* to χ . This ensures the χ -subunit to stay in contact with SSB at the lagging-strand. As a logical thermodynamic consequence binding of *EcoSSB* to χ increases the affinity to ssDNA, which could be shown by DNA melting experiments. This increase in affinity prevents premature dissociation of SSB from the ssDNA and thus prevents hairpin formation and early termination of lagging-strand synthesis.

In a second part of this thesis, two new SSB proteins which show homologies to homotetrameric SSBs, SSB from *Deinococcus radiodurans* (*DraSSB*) and *Thermus aquaticus* (*TaqSSB*), have been cloned and expressed in *E.coli* and were characterized in comparison to *EcoSSB*. While the sequence of *TaqSSB* could be confirmed, sequencing of the *DraSSB*-gene revealed an error in the existing database entry, which was corrected due to this work (EMBL DRA564860). Both proteins could be shown to be dimers by analytical ultracentrifugation. Due to gene duplication both SSBs possess two ssDNA binding domains per monomer and thus the dimer is in formal analogy to the other homotetrameric SSBs. Binding of ssDNA was characterized by stopped-flow-kinetics and fluorescence titrations and produced properties similar to *EcoSSB*. Contrary to *EcoSSB*, *TaqSSB* and *DraSSB* showed no distinct salt-dependent binding-modes. Using a complementation assay it could be shown that *DraSSB* can replace *EcoSSB in vivo*, indicating a high level of functional similarity of these two SSBs originating from different species.

Keywords: SSB, Analytical ultracentrifugation, protein-protein interactions

Ich möchte folgenden Personen danken:

Dr. Ute Curth

Für die exzellente Betreuung im täglichen Chaos eines Doktoranden, die ständige (geduldige) Hilfsbereitschaft und die guten Ideen.

Prof. Dr. Claus Urbanke

Für die vorbildliche Betreuung dieser Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, meine Einblicke in die biophysikalischen Methoden, insbesondere der analytischen Ultrazentrifugation, weiter zu vertiefen.

Prof. Dr. Walter Müller

Für die freundliche Übernahme des Korreferates

Frau Lidia Litz

Für die vielen Hilfen, die nützlichen Tipps bei der praktischen Arbeit und die Präparation einiger Proteine.

Dipl.-Biol. Kathrin Hagemann

Für die zahlreichen Hilfen und natürlich für die vielen Diskussionen.

Dr. Joachim Greipel

Für die Hilfe bei den PC Problemen.

Dr. Roman Fedorov

Für die Einblicke in die Kunst der Proteinkristallographie

Den anderen Arbeitsgruppen am Institut für das angenehme Arbeitsklima

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und die mich immer unterstützt haben.

Und natürlich Anne!

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

G. Witte, C. Urbanke und U. Curth (2003)

"DNA polymerase III χ -subunit ties single-stranded DNA binding protein to the bacterial replication machinery."

Nucleic Acids Research 31(15):4434-4440

DNA-Sequenz des SSB aus *Deinococcus radiodurans*: EMBL DRA564860

Posterbeiträge

G. Witte, C. Urbanke und U. Curth (2003).

"Probing weak protein-protein interactions by analytical ultracentrifugation."

AUC Symposium 6.-7. März 2003 in Osnabrück (D)

G. Witte, C. Urbanke und U. Curth (2004)

"Interactions of E.coli single-stranded DNA binding protein with other proteins involved in DNA replication"

AUC Konferenz, 1.-2. April 2004 in Oxford (GB)

1	Einleitung	4
1.1	Einzelstrang-DNA bindende Proteine	4
1.2	Homotetramere SSB-Proteine	5
1.2.1	Bakterielle SSB-Proteine	5
1.2.2	Eukaryotische homotetramere SSB-Proteine	6
1.2.3	Vergleich homotetramerer SSB-Proteine	6
1.3	<i>Eco</i> SSB: Prototyp bakterieller Einzelstrang-DNA bindender Proteine	7
1.3.1	Domänenstruktur und funktionelle Aminosäuren	8
1.3.2	Biologische Funktion von <i>Eco</i> SSB	11
1.3.3	Biophysikalische Eigenschaften von <i>Eco</i> SSB	13
1.4	SSB-Proteine aus extremophilen Organismen	15
1.5	Interaktion von <i>Eco</i> SSB mit der DNA-Polymerase III	17
1.5.1	Aufbau des DNA-Polymerase III Holoenzymkomplexes	17
1.5.2	Wechselwirkung zwischen der χ -Untereinheit und <i>Eco</i> SSB	19
1.6	Ziel der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Reagenzien	21
2.1.2	Puffer	21
2.1.3	Proteine	22
2.1.4	Oligonukleotide	23
2.1.5	Standards	23
2.1.6	Bakterienstämme	24
2.1.7	Plasmide	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Anzucht von Bakterien, Nährmedien	25
2.2.2	Transformation und Kompetente Zellen	26
2.2.3	Glycerinkulturen	26
2.2.4	Plasmidpräparation	26
2.2.5	Modifikation, Analyse und Amplifikation von DNA	27
2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE)	31
2.2.7	Expression von SSB-Proteinen in <i>E. coli</i>	33
2.2.8	Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen	36
2.2.9	Quervernetzungsexperimente	39
2.2.10	Immunologischer Proteinnachweis (Western-Blot)	40
2.2.11	Konzentrationsmessungen und UV/Vis-Spektren	42
2.2.12	Dialyse	43
2.2.13	Komplementationsexperimente	43
2.3	Biophysikalische Methoden	44
2.3.1	DNA-Schmelzexperimente	44

2.3.2	Fluoreszenztitrationen	45
2.3.3	<i>Stopped-Flow</i> -Kinetiken	48
2.3.4	Oberflächenplasmonresonanz-Messungen	49
2.3.5	Analytische Ultrazentrifugation	54
2.3.6	Proteinkristallisation	62
3	Ergebnisse	64
3.1	Untersuchungen zur Wechselwirkung der χ -Untereinheit der DNA- Polymerase III mit <i>EcoSSB</i>	64
3.1.1	Analytische Ultrazentrifugation	64
3.1.2	Oberflächenplasmonresonanz-Messungen	71
3.1.3	DNA-Schmelzexperimente	77
3.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung der SSBs aus <i>T.aquaticus</i> und <i>D.radiodurans</i>	80
3.2.1	SSB aus <i>Thermus aquaticus</i>	80
3.2.2	SSB aus <i>Deinococcus radiodurans</i>	81
3.2.3	Immunologischer Nachweis von <i>DraSSB</i> im <i>D.radiodurans</i> Gesamtzellextrakt	85
3.3	Charakterisierung von <i>DraSSB</i> und <i>TaqSSB</i>	86
3.3.1	Proteinquervernetzungsexperimente	86
3.3.2	Analytische Ultrazentrifugation	87
3.3.3	Fluoreszenztitrationen	93
3.3.4	Bindungskinetik an poly(dT)	96
3.3.5	DNA-Schmelzexperimente	97
3.3.6	Komplementationsexperiment mit <i>DraSSB</i>	98
3.3.7	Wechselwirkung des C-Terminus von <i>DraSSB</i> mit χ	100
3.3.8	Proteinkristallisation	102
4	Diskussion	104
4.1	Wechselwirkung zwischen <i>EcoSSB</i> und der χ -Untereinheit der DNA- Polymerase III	104
4.2	Die SSB-Proteine aus <i>T.aquaticus</i> und <i>D.radiodurans</i>	108
5	Zusammenfassung und Ausblick	113
6	Anhang	115
6.1	Vergleich der DNA-Sequenzen DR099 und DRA564860	115
6.2	Aminosäuresequenzen der Proteine	115
6.3	Plasmidkarte von pET-15b (Fa. Novagen)	116
6.4	Plasmidkarte von pSF1	117
7	Literatur	118

Abkürzungsverzeichnis

ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
ω	Kooperativität
A	Absorption
aa	Aminosäure oder Aminosäurerest
ad	Auffüllen auf
Amp	Ampicillin
AUC	<i>Analytical Ultracentrifuge</i>
Bidest.	Bidestilliert
Bp	Basenpaar
D	Diffusionskoeffizient
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i> (Betreiber der Datenbank für DNA Sequenzen)
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
f	Reibungskoeffizient
FC	Flusszelle eines SPR-Chips
kDa	Kilodalton
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani
MCS	<i>multiple cloning site</i>
n	Anzahl der Bindungsplätze
nt	Nukleotid(e)
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppm	<i>parts per million</i>
QBD	Zweifach in einer Quarzglasapparatur destilliertes Wasser
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	<i>Resonance Unit</i> , entspricht der Masse von ca. 1pg/mm ² auf einem SPR-Chip
S	Svedberg [10 ⁻¹³ s]
s _{20,w}	Sedimentationskoeffizient in Wasser bei 20°C
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
SSB	Einzelstrang-DNA bindendes Protein
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i> (USA)
TrEMBL	<i>Translated EMBL</i> (Datenbank für Proteinsequenzen)
UZ	Ultrazentrifuge
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Einzelstrang-DNA bindende Proteine

Als Einzelstrang-DNA bindende Proteine (*single-stranded DNA binding proteins*, SSBs) wird eine Gruppe von Proteinen bezeichnet, die sequenzunspezifisch an einzelsträngige DNA (*single-stranded DNA*, ssDNA) bindet. Diese Proteine besitzen zwar keine katalytische Aktivität, sind aber bei allen Vorgängen in der Zelle beteiligt bei denen einzelsträngige DNA auftritt. Sie verhindern durch ihre Bindung das Ausbilden von Sekundärstrukturen und schützen die ssDNA vor dem Abbau durch Nukleasen (Meyer und Laine, 1990).

Aufgrund der durch SSB-Proteine hervorgerufenen Effekte in DNA-Schmelzexperimenten (Sigal *et al.*, 1972) werden sie in der Literatur oft auch als Helix-destabilisierende Proteine beschrieben. Helix-destabilisierende und Einzelstrang-stabilisierende Funktion sind dabei äquivalent, da durch die Bindung von SSB-Proteinen an einzelsträngige DNA das Gleichgewicht zwischen doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA auf die Seite des Einzelstrangs verschoben wird.

Das zuerst gefundene bakterielle und zugleich am besten charakterisierte SSB-Protein ist das homotetramere EcoSSB aus *Escherichia coli* (Sigal *et al.*, 1972) über das bereits zahlreiche Übersichtsartikel veröffentlicht wurden (Greipel *et al.*, 1989; Meyer und Laine, 1990; Lohman und Ferrari, 1994).

Einzelstrang-DNA bindende Proteine sind bei der Replikation, Rekombination und Reparatur von DNA beteiligt. Mittlerweile wurden SSB-Proteine aus allen Reichen von Archea wie *Sulfolobus solfataricus* (Wadsworth und White, 2001) über Bakterien (Sigal *et al.*, 1972) bis hin zu Eukaryoten sowohl im Kern (Iftode *et al.*, 1999), als auch in Organellen (Tiranti *et al.*, 1993) identifiziert und untersucht. Auch in Phagen sind SSB-Proteine beschrieben worden (Kneale, 1992). Für *Escherichia coli* wurde nachgewiesen, dass das SSB-Protein essentiell für das Überleben der Zellen ist (Porter *et al.*, 1990). Auch für das Überleben der Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine essentielle Funktion des entsprechenden SSB-Proteins gezeigt (Van Dyck *et al.*, 1992).

Das kernständige SSB-Protein, das an der Replikation der chromosomalen DNA von Eukaryoten beteiligt ist, bezeichnet man als Replikationsprotein-A (RP-A) oder Replikationsfaktor-A (RF-A). Es ist heterotrimer und besteht aus je einer 70 kDa,

32 kDa und 14 kDa Untereinheit, die entsprechend RP-A70, RP-A32 und RP-A14 genannt werden. Einen Überblick über die Struktur des RP-A-Komplexes und die Anordnung der *OB-folds* (vgl. 1.3.1) gibt Bochkareva *et al.* (2002). RP-A32 wird Zellzyklus-abhängig phosphoryliert (Dutta und Stillman, 1992).

Abgesehen von eukaryotischen und bakteriellen Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen sind auch SSBs aus Bakteriophagen bekannt, z.B. das 1970 zuerst identifizierte „DNA-unwinding protein“, das monomere *gen32*-Produkt aus T4-Phagen (Alberts und Frey, 1970; Kneale, 1992), das dimere *gen2.5*-Protein aus T7 Phagen (Kim *et al.*, 1992) und das monomere SSB aus Adenoviren (Tucker *et al.*, 1994). Für das *gen2.5*-Protein wurde eine zur Stimulation der DNA-Synthese führende Interaktion mit der T7-DNA-Polymerase (Kim *et al.*, 1992) und eine Erhöhung der Effizienz der Primersynthese durch Interaktion mit der T7-Helikase/Primase gezeigt (Nakai und Richardson, 1988a;b). Die dimeren *gen5*-Proteine filamentöser Phagen haben eine Funktion in der Verpackung der Phagen-DNA und sind Bestandteil des Nukleoprotein-Komplexes (Kneale *et al.*, 1982). Sie haben eine zusätzliche Funktion als Transkriptionsrepressor, da sie sequenzspezifisch and die *GenII*-mRNA binden (Michel und Zinder, 1989).

Eine weitere sehr weit verbreitete Klasse von SSB-Proteinen sind die homotetrameren SSBs, die sowohl in Bakterien als auch in eukaryotischen Mitochondrien nachgewiesen wurden. Deren bakterielle Vertreter werden Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.2 Homotetramere SSB-Proteine

1.2.1 Bakterielle SSB-Proteine

Die homotetrameren bakteriellen Proteine repräsentieren die Gruppe der am besten untersuchten und charakterisierten SSB-Proteine. Als Prototyp dieser Gruppe wird im Allgemeinen das bereits erwähnte SSB aus *Escherichia coli* betrachtet, dessen Struktur röntgenkristallographisch gelöst wurde (Raghunathan *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1997) und das biophysikalisch gut charakterisiert ist (s.a. Lohman und Overman (1985), Bujalowski und Lohman (1989a,b), Greipel *et al.* (1989) und Curth *et al.* (1993)).

In vielen weiteren Bakterien wurden bereits SSB-Proteine identifiziert und untersucht, dazu gehören unter anderem die SSBs aus:

- *Aquifex aeolicus* (Deckert *et al.*, 1998)
- *Brucella abortus* (Genschel, 1995)
- *Haemophilus influenzae* (Jarosik und Hansen, 1994)
- *Mycobacterium tuberculosis* (Saikrishnan *et al.*, 2003)
- *Proteus mirabilis* (de Vries und Wackernagel, 1994)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Genschel *et al.*, 1996)
- *Serratia marcescens* (De Vries *et al.*, 1994)

Zusätzlich zu dieser Gruppe chromosomal codierter SSBs gibt es homotetramere SSB-Proteine, die auf konjugativen Plasmiden kodiert sind und deren DNA-Bindungsdomänen eine hohe Sequenzhomologie zu den chromosomal codierten SSB-Proteinen zeigt (Ruvolo *et al.*, 1991).

1.2.2 Eukaryotische homotetramere SSB-Proteine

Die bisher beschriebenen eukaryotischen homotetrameren SSBs wurden ausschließlich in Mitochondrien gefunden. Das humane mitochondrielle SSB (*HsmtSSB*) zeigt trotz geringer Sequenzidentität (ca. 33%) eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum bakteriellen Prototyp *EcoSSB* (Webster *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Für *HsmtSSB* konnte neben der strukturellen auch eine funktionelle Homologie zu *EcoSSB* gezeigt werden (Curth *et al.*, 1994). Zu den bisher charakterisierten mitochondriellen SSB-Proteinen gehören unter anderem die Proteine aus *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* (Tiranti *et al.*, 1993), aus *Saccharomyces cerevisiae* (Van Dyck *et al.*, 1992), aus *Drosophila melanogaster* (Thommes *et al.*, 1995) und aus *Xenopus laevis* (Barat und Mignotte, 1981). Neben Hinweisen auf plastidäre SSBs in Tabak (Garcia-Maya und Buck, 1997) wurde auch das aufgrund von Homologien gefundene mitochondrielle SSB aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Hagemann, 2004).

1.2.3 Vergleich homotetramerer SSB-Proteine

Bei einem Vergleich der Einzelstrang-DNA bindenden Proteine verschiedener bakterieller Spezies erkennt man eine hohe Homologie in zwei Bereichen, zum einen in der DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-115) und zum anderen im Bereich der letzten zehn Aminosäuren des Carboxyterminus (vgl. Abbildung 1, Nummerierung bezieht sich im Folgenden auf *EcoSSB*). Bei genauerer Betrachtung der Homologien lassen sich definierte Abschnitte mit stark konservierten Aminosäuren feststellen. Dazu gehören beispielsweise der an der ssDNA-Bindung beteiligte Bereich um

Tryptophan 54 mit dem Consensus-Motiv WHR und die hochkonservierte carboxyterminale Region mit dem Consensus-Motiv DDDIPF, das ausschließlich in prokaryotischen SSB-Proteinen vorkommt. Der Glycin- und Prolin-haltige Bereich ab Aminosäure 116 zeigt außer der außergewöhnlichen Anhäufung dieser Aminosäuren keine Homologie und ist vermutlich ungefaltet (vgl. 1.3.1). Für den stark konservierten C-terminalen Bereich wurden in *E.coli* wichtige Protein-Protein-Interaktionen mit an der Replikation, Rekombination und Reparatur der DNA beteiligten Proteinen gezeigt (vgl. 1.3.2).

In dem Alignment in Abbildung 1 ist neben verschiedenen bakteriellen SSB-Proteinen auch das humane mitochondrielle SSB als Prototyp für die mitochondriellen SSBs aufgenommen. Während die Sequenzidentität in der DNA-Bindungsdomäne etwa 33% beträgt, besitzen die mitochondriellen SSBs keine zum carboxyterminalen Drittel der bakteriellen Proteine homologe Region.

EcoSSB	asr-----	GVNKKVILVGNLGQDPEVRYMPNGGAVANITLA	35
BabSSB	mag-----	SVNKKVILVGNLGADPEIRRLNSGDMVANLRIA	35
PmiSSB	asr-----	GVNKKVILIGNLGQDPEIRYMPSGGAVANITLA	35
NmeSSB	m-----	SLNKKVILIGRLGRDPEVRYMPNGEAVCNFSVA	33
HsmtSSB	mfrpvlqlvrqfvrhesetttslvler	SLNRVHLLGRVGQDFVLQVEGKNPVTIFSLA	60
EcoSSB	TSESWRDK----ATGEMKEQTEWHRVVLFGK-LAEVASEYLRKGSQVYIEGQLRTRKWT	89	
BabSSB	TSESWRDR----QTGERKDRTEWHSVVIFENENLAKVAEQYLKKGAKVYIEGALQTRKWQ	90	
PmiSSB	TSESWRDK----QTGEMKEKTEWHRVVIFGK-LAEIAGEYLRKGSQVYIEGQLQTRKWQ	89	
NmeSSB	TSETWND-----RNGQQRVERTEWHNITMYRK-LAEIAGQYLKKGGLVYLEGRIQSRKYQ	86	
HsmtSSB	TNEMWRSGdsevyQLGDVSQKTTWHRISVFRPGLRDVAYQYVKKGSRITYLEGKIDYGEYM	120	
EcoSSB	DQSGQDRYTTTEVVVNVGGtmqml-GGRQGGGAPAGGNI GGGQPQggwgqppqpqqg---N	145	
BabSSB	DQNGNDRYSKEIVLQKFRgelqmlDS RSEGGEGRSFGG GGNRNQm-----S	136	
PmiSSB	DQSGQDRYSTEVVVNIGGtmqmlgGR GGQDNAPSQGGQ GWGQPQqpqasqq-----F	141	
NmeSSB	GKDG IERTAYDIVANEMKml----GGRNENSGGAPYEE GYGQSQeayqrpaqsrqpasD	142	
HsmtSSB	DKNNVRRQATTIIADNIIflsdqtke ke-----	148	
EcoSSB	QFSGGAQSRPQQSAPAA PSNEPPMDEDDDI PF	177	
BabSSB	DYSGGGGDFGSSGPSSG SSGGFSRDLDDDI PF	168	
PmiSSB	SGGAPSRPAQQPAAAPA PSNEPPMDEDDDI PF	173	
NmeSSB	APSHPQEAPAAPRRQPV PAAAPVEDIDDDI PF	174	
HsmtSSB	-----	148	

Abbildung 1: Alignment verschiedener bakterieller SSBs im Vergleich mit HsmtSSB. Dunklere Farben stehen für stärker konservierte Aminosäuren, deren Austausch evolutionär gesehen unwahrscheinlicher ist (Programm: MACAW 2.0.5 (Schuler et al., 1991), Eco = *Escherichia coli*, Bab = *Brucella abortus*, Pmi = *Proteus mirabilis*, Nme = *Neisseria meningitidis*, Hsmt = *homo sapiens* mitochondriell).

1.3 EcoSSB: Prototyp bakterieller Einzelstrang-DNA bindender Proteine

Das Einzelstrang-DNA bindende Protein aus *Escherichia coli* wurde nach Identifizierung durch Sigal et al. (1972) zunächst als „DNA unwinding protein“ beschrieben, weil es doppelsträngige T4-DNA nach einigen Minuten bei 37°C

denaturieren konnte. Diese Denaturierung wurde anhand der Hyperchromizität bei 260nm beim Übergang der doppelsträngigen DNA zu ssDNA gemessen. Die Sequenzierung des *EcoSSB* Gens erfolgte durch Sancar *et al.* (1981), die erhaltene Sequenz wurde 1984 durch Chase *et al.* (1984) noch leicht korrigiert. Das chromosomale *ssb*-Gen in *E.coli* codiert für ein 178 Aminosäuren umfassendes Protein, dessen aminoterminales Methionin posttranslational abgespalten wird (Sancar *et al.*, 1981). Das homotetramere *EcoSSB* hat eine Molmasse von 75,4 kg/mol.

1.3.1 Domänenstruktur und funktionelle Aminosäuren

Die räumliche Struktur des *EcoSSBs* wurde erst nach der Strukturaufklärung des strukturell sehr ähnlichen humanen mitochondriellen SSBs (Yang *et al.*, 1997) mit Hilfe von *molecular replacement* (Webster *et al.*, 1997) und fast zeitgleich aus Multi-Wellenlängen Experimenten mit einem Selenomethionin substituierten *EcoSSB* (Raghunathan *et al.*, 1997) bestimmt.

Die Kristallstruktur des *EcoSSB*-Tetramers zeigt eine D_2 -Symmetrie, die sich durch Bildung eines Tetramers aus zwei SSB-Dimeren erklären lässt. Der Bereich der Aminosäuren 1–115 eines jeden Monomers zeigt eine fassartige Struktur aus zwei β -Faltblättern, die durch eine α -Helix auf einer Seite verschlossen wird (vgl. Abbildung 2). Dieses Strukturelement wird nach Murzin (1993) als *OB-fold* (*oligonucleotide/oligosaccharide binding fold*) bezeichnet. Der diesem gefalteten Bereich nachfolgende Glycin- und Prolin-reiche Abschnitt ist ungefaltet. Sowohl Webster *et al.* (1997) als auch Raghunathan *et al.* (1997) konnten aus diesem Grund keine vollständigen *EcoSSB*-Tetramere kristallisieren. In der von Matsumoto *et al.* (2000) veröffentlichten Kristallstruktur eines nur leicht carboxyterminal verkürzten *EcoSSBs* zeigt der Bereich der Aminosäuren 116-145 für jede der Untereinheiten des Tetramers eine andere Form (vgl. Abbildung 2). Außerdem ist in diesem Bereich die Unsicherheit der Zuordnung der Elektronendichte sehr groß (hohe B-Faktoren).

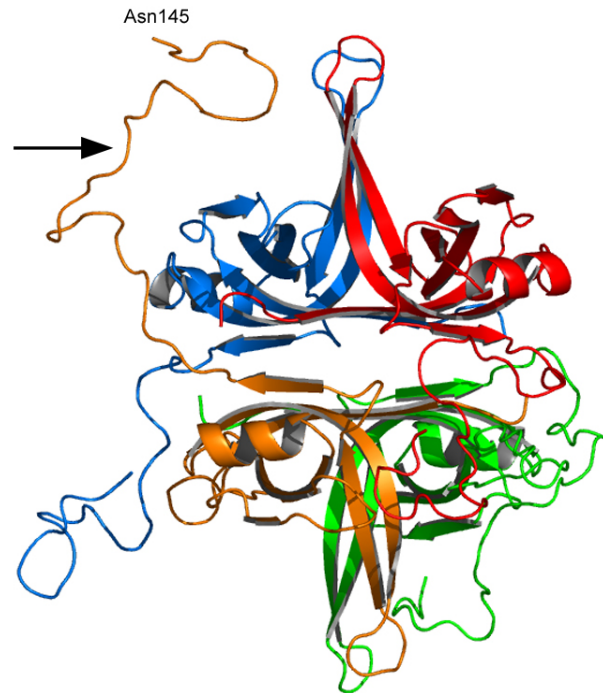


Abbildung 2: Struktur von SSB aus *E.coli*, Datensatz: PDB 1QVC (Matsumoto *et al.*, 2000). Die einzelnen Monomere sind unterschiedlich gefärbt. Deutlich zu sehen sind die vier ungefalteten Bereiche der Aminosäuren 116-145 eines jeden Monomers, von denen einer durch einen Pfeil markiert ist.

Durch Experimente mit kontrolliert proteolytisch abgebautem *EcoSSB* (Williams *et al.*, 1983) und *EcoSSB*-Deletionsmutanten (Curth *et al.*, 1996) konnte der Bereich der DNA-Bindung auf die ersten 115 Aminosäuren eingegrenzt werden. Eine SSB-Mutante, der das carboxyterminale Drittel ab Aminosäure 117 fehlt (*EcoSSB* G117*), zeigt in DNA-Schmelzexperimenten eine stärkere Destabilisierung des DNA-Doppelstrangs als Wildtyp-*EcoSSB*. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Abwesenheit der elektrostatischen Abstoßung zwischen dem negativ geladenen carboxyterminalen Bereich und dem Phosphatrückgrat der DNA (Curth *et al.*, 1996).

Obwohl der Bereich der Aminosäuren 116-177 nicht an der DNA-Bindung beteiligt ist, muss er für andere Funktionen des SSB-Proteins wichtig sein. Ein Vergleich bakterieller SSB Proteine (vgl. auch 1.2.3) zeigt eine hohe Homologie im Bereich der letzten zehn Aminosäuren mit einer Anhäufung saurer Reste (Consensus-Motiv: DDDIPF). Dem vorausgehend liegt bei allen bakteriellen SSBs ein ungefalteter Bereich (Matsumoto *et al.*, 2000). Dieser dient vermutlich als Abstandhalter (*spacer*) zwischen dem C-Terminus und der DNA-bindenden Domäne und vermindert elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Resten und der DNA (Curth *et al.*, 1996). Der so geschaffene Abstand zwischen SSB-Core und

C-terminalem Bereich könnte die sterische Möglichkeit für die Interaktion mit größeren Proteinen schaffen. Für den hochkonservierten Bereich der letzten zehn Aminosäuren konnten in *E.coli* Wechselwirkungen mit anderen an der Replikation, Rekombination und Reparatur beteiligten Proteinen gezeigt werden. Diese Wechselwirkungen müssen essentiell für das Überleben der Zelle sein, da die bereits erwähnte Mutante *EcoSSB* G117* *in vivo* nicht funktionell ist (Curth *et al.*, 1996). Zu den identifizierten Wechselwirkungen zählen die Interaktion mit der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III (Kelman *et al.*, 1998) und der Exonuklease I (Genschel *et al.*, 2000). Der *E.coli* Stamm *ssb113*, der für *EcoSSB* P176S codiert, zeigt einen Temperatur- und UV-sensitiven Phänotyp (Vales *et al.*, 1980). Der Austausch des Prolins an Position 176 gegen Serin führt zu einem nicht funktionellen Carboxyterminus wodurch die Protein-Protein-Interaktionen gestört werden.

Eine schematische Darstellung der strukturellen und funktionellen Bereiche eines *EcoSSB*-Monomers zeigt Abbildung 3.

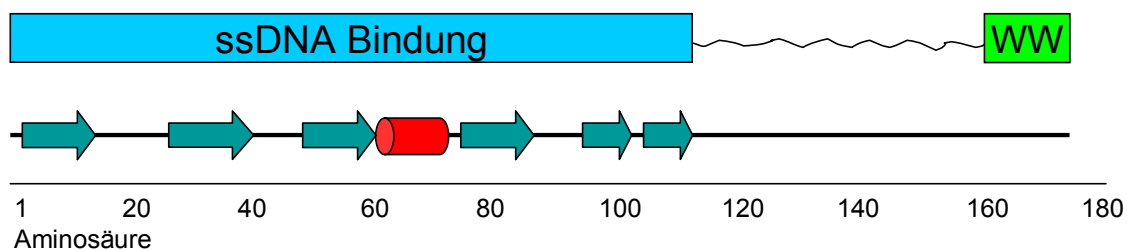


Abbildung 3: Schematische Darstellung der funktionellen und strukturellen Bereiche im *EcoSSB*-Monomer. (➡=β-Faltblatt, (Zylinder)=α-Helix, WW= Bereich für Protein-Protein-Wechselwirkungen). Die Strukturdaten stammen aus der Röntgenstrukturanalyse (Matsumoto *et al.*, 2000).

Durch Quervernetzungs- und Aminosäureaustausch-Experimente konnte gezeigt werden, dass Phenylalanin 60 (Bayer *et al.*, 1989), die Tryptophanreste an Position 40, 54 und 88 (Khamis *et al.*, 1987; Curth *et al.*, 1993) sowie einige Lysin-Reste (Bandyopadhyay und Wu, 1978; Chen *et al.*, 1998) an der DNA-Bindung beteiligt sind. Die Röntgenstrukturanalyse eines Kokristalls von *EcoSSB* und einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden ergab, dass die identifizierten aromatischen Aminosäuren *stacking*-Wechselwirkungen mit den Basen der DNA eingehen und die positiv geladenen Lysinreste elektrostatisch mit dem Phosphatrückgrat interagieren (Raghunathan *et al.*, 2000). Außerdem wurde eine Reihe weiterer Wechselwirkungen der Proteinoberfläche mit der ssDNA gefunden. Abbildung 4 zeigt die Struktur von *EcoSSB* mit gebundenen einzelsträngigen Oligonukleotiden nach Raghunathan *et al.* (2000).



Abbildung 4: *EcoSSB-Tetramer (grün) mit zwei gebundenen einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden (dC₃₅, magenta) nach Raghunathan et al. (2000), Datensatz PDB 1EYG. Dargestellt sind nur die Aminosäuren 1-114 eines chymotryptischen Fragments von EcoSSB. Den restlichen Aminosäuren konnte keine Elektronendichte zugeordnet werden. Einer der DNA-Stränge ist unterbrochen, da für den mittleren Bereich dieses DNA-Stranges ebenfalls keine Elektronendichte ermittelt werden konnte.*

1.3.2 Biologische Funktion von EcoSSB

SSB-Proteine sind in der Zelle bei allen Prozessen wichtig, in denen einzelsträngige DNA auftritt (Replikation, Rekombination und Reparatur). Bei all diesen Prozessen verhindert die Bindung von *EcoSSB* an die einzelsträngige DNA das Ausbilden von Sekundärstrukturen wie z.B. *Hairpins*. Solche Sekundärstrukturen würden beispielsweise bei der Replikation das Voranschreiten der DNA-Polymerase III am Folgestrang (*lagging-strand*) stören und somit die Replikation gefährden (Fay et al., 1981). Die Bindung der SSBs an den Einzelstrang bringt die DNA in eine für die DNA-Polymerase III gut zugängliche Konformation und erhöht somit die Prozessivität des Enzyms (Meyer und Laine, 1990). Das typische Lehrbuchbild zeigte SSB-Proteine noch bis vor einigen Jahren sowohl am Leitstrang (*leading-strand*) als auch am *lagging-strand* der DNA-Replikation. Mok und Marians (1987) stellten jedoch fest, dass die Replikation des *leading-strands* von der SSB-Anwesenheit unabhängig ist. Zudem besteht ein direkter Kontakt zwischen Helikase und DNA-Polymerase III (Yuzhakov et al., 1996). Dagegen wurde eine direkte funktionelle Wechselwirkung von *EcoSSB* mit der ausschließlich am *lagging-strand* lokalisierten χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III gefunden (Kelman et al., 1998). Neben der Wechselwirkung mit

der χ -Untereinheit, deren Untersuchung auch Teil dieser Arbeit ist (Witte *et al.*, 2003), wurden noch weitere für die Replikation, Rekombination und Reparatur wichtige Interaktionen des EcoSSBs nachgewiesen, z.B.:

- Stimulation der Exonuklease I (Sandigursky *et al.*, 1996) durch die Wechselwirkung mit dem Carboxyterminus von SSB (Genschel, 1995).
- Wechselwirkung des EcoSSB mit Primase (DnaG) verhindert eine Dissoziation der Primer am *lagging-strand* (Yuzhakov *et al.*, 1999).
- Aktivierung der Helikase und Verhinderung der Rückfaltung der DNA als Voraussetzung für die Replikation (LeBowitz und McMacken, 1986).
- Wechselwirkung mit dem τ -Protein des Primosomenkomplexes, die diesen nach Initiation der Replikation stabilisiert (Arai *et al.*, 1981).

Eine schematische Darstellung der Replikationsgabel von *E.coli* unter Betonung der Wechselwirkung des SSBs mit der Primase und der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III zeigt Abbildung 5.

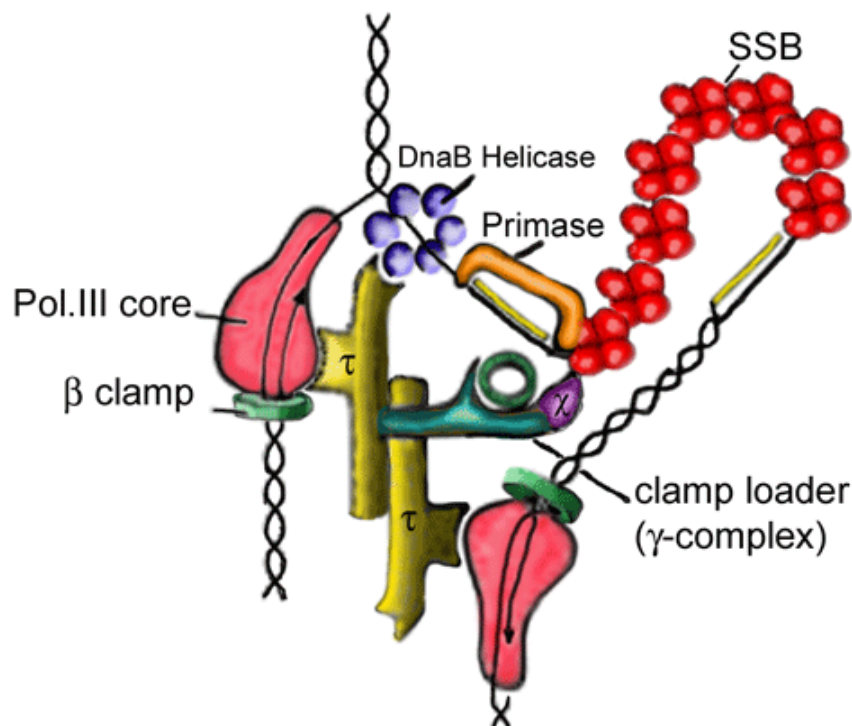


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Replikationsgabel von *E.coli* unter Betonung der Wechselwirkungen von SSB. Die einzelnen Untereinheiten des Holoenzym-Komplexes sind nicht im Detail dargestellt (modifiziert nach Yuzhakov *et al.* (1999)).

In *Escherichia coli* beträgt die Gesamtzahl der in der Zelle vorkommenden SSB Proteine ca. 1000-2000 (Bobst *et al.*, 1985). Diese Menge überschreitet die für die Replikation nötige Anzahl deutlich und deutet auf andere wichtige Funktionen des

SSBs hin. Neben den Aufgaben in der Replikation spielt *EcoSSB* auch in der SOS-Antwort (Little und Mount, 1982), Reparatur und der Rekombination eine wichtige Rolle (Meyer und Laine, 1990).

Für *EcoSSB* konnte gezeigt werden, dass es für das Überleben der Zelle essentiell ist, da das chromosomale *ssb*-Gen nur deletiert werden kann, wenn ein funktionsfähiges *ssb*-Gen auf einem Helferplasmid vorliegt (Porter *et al.*, 1990). Ein entsprechender Deletions-Stamm ermöglicht Komplementationsexperimente in denen überprüft werden kann, ob ein anderes auf einem zweiten Plasmid codiertes heterologes SSB das *EcoSSB in vivo* ersetzen kann. Solche Experimente zeigten beispielsweise, dass die SSB-Proteine aus *S.marcescens* und *P.mirabilis* (De Vries *et al.*, 1994) aber auch SSBs aus *H.influenzae* oder *P.aeruginosa* (Genschel, 1995) das *EcoSSB* ersetzen können.

Anhand der Untersuchung von Temperatur- und UV-sensitiven *E.coli*-Stämmen, welche die *EcoSSB*-Mutationen H55Y (SSB-1) und H55K tragen (Williams *et al.*, 1984; Carlini *et al.*, 1998), wurde die tetramere Struktur des *EcoSSB* als funktionell wichtig erkannt. Die SSB-Proteine dieser Stämme zeigen eine Störung in der Tetramerisierung und den Zerfall in Monomere (Carlini *et al.*, 1998). Für eine vollständig dimere Mutante (*EcoSSB* Y78R), die eine Mutation an der Dimer-Dimer-Interaktionsfläche trägt, wurde gezeigt, dass diese Mutante das Wildtyp-*EcoSSB in vivo* nicht ersetzen kann (Landwehr *et al.*, 2002).

1.3.3 Biophysikalische Eigenschaften von *EcoSSB*

Für das homotetramere *EcoSSB*-Protein errechnet sich aus der Aminosäurezusammensetzung eine Molmasse von 75,375 kg/mol. In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentiert es mit einem Sedimentationskoeffizienten von $s_{20,w}=4.3$ S. Der daraus ermittelte Perrin-Faktor (f/f_{Kugel}) von ca. 1.4 weist auf eine deutlich von der Kugelgestalt abweichende Form hin (Williams *et al.*, 1983).

EcoSSB bindet sequenzunspezifisch einzelsträngige Nukleinsäuren. Diese Bindung kann in Fluoreszenztitrationen quantifiziert werden, da die Fluoreszenz der an der Bindung beteiligten Tryptophanreste bei ssDNA-Bindung stark gelöscht wird (Molineux *et al.*, 1975). Die Bindungsaffinität ist dabei zum einen abhängig von der Zusammensetzung der Nukleinsäure und zum anderen von den Bedingungen wie Temperatur und Ionenstärke. Die höchste Affinität hat *EcoSSB* zu poly(dT) mit einer Assoziationsgleichgewichtskonstante von $K_{\text{ass}} \geq 10^8 \text{ M}^{-1}$ (in 0.3M NaCl) (Lohman und Overman, 1985), gefolgt von poly(dC), M13-ssDNA, poly(rU), poly(dA) und poly(rA)

(Overman *et al.*, 1988). *EcoSSB* bindet also auch RNA, jedoch mit geringerer Affinität als DNA. Da die Affinität von *EcoSSB* zu poly(dT) besonders groß ist, eignet es sich gut als Modells substanz für Bindungsstudien.

Die Wechselwirkung zwischen *EcoSSB* und Nukleinsäuren ist stark von der Ionenstärke abhängig. Da hohe Ionenstärken die Affinität zu einzelsträngiger DNA verringern, kann man davon ausgehen, dass an der DNA-Bindung nicht nur hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren, sondern auch ionische Wechselwirkungen beteiligt sind. Der Einfluss verschiedener Ionen und Ionenstärken auf die Wechselwirkung von *EcoSSB* und DNA wurde bereits ausführlich thermodynamisch charakterisiert (Overman *et al.*, 1988; Bujalowski und Lohman, 1989b).

Für *EcoSSB* wurden zwei Haupt-Bindungsmodi beschrieben, zum einen der Niedrigsalzmodus (<10 mM NaCl) mit einer Bedeckungslänge von 35 Nukleotiden pro SSB-Tetramer und der Hochsalzmodus (≥ 0.2 M NaCl) mit 65 Nukleotiden pro SSB-Tetramer (Lohman und Overman, 1985). Daneben scheinen bei intermediären Salzkonzentrationen noch zwei weitere Modi zu existieren (Bujalowski und Lohman, 1989a). Die Bindung selbst erfolgt kooperativ, d.h. ein bereits an die einzelsträngige DNA gebundenes SSB begünstigt die Bindung eines weiteren SSBs in seiner Nachbarschaft. Die Werte für die Kooperativität sind abhängig vom Bindungsmodus des SSB-Proteins. Für den Niedrigsalzmodus bestimmten Lohman *et al.* (1986) in Gelretardationsexperimenten eine sehr hohe Kooperativität von $\omega_{35}=10^5$, während Greipel *et al.* (1987) aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von poly(dT)-*EcoSSB*-Komplexen im Hochsalzmodus eine moderate Kooperativität von $50 < \omega_{65} < 250$ ermittelten. Bindungsisothermen von *EcoSSB* und poly(dT) lassen sich durch ein Modell beschreiben in dem ein mehrzähniger Ligand an ein lineares Polymer bindet (Schwarz und Watanabe, 1983).

Die Kinetik der Bindung von *EcoSSB* an poly(dT) ist mit einer in *Stopped-Flow*-Experimenten bestimmten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten von $k_{12}=2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nahezu diffusionskontrolliert (Urbanke und Schaper, 1990). Bei der Bindung eines mehrzähligen Liganden an ein lineares Gitter können insbesondere bei hohen Liganden-Bindungsdichten Lücken entstehen, die kleiner als die Bedeckungslänge des Liganden sind (Bujalowski und Lohman, 1987). Dadurch kann bei sehr hohen Bindungsdichten eine apparente Antikooperativität und eine Verringerung der apparenten bimolekularen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten

hervorgerufen werden. Urbanke und Schaper (1990) beobachteten diesen durch das Lückenproblem hervorgerufenen verlangsamenden Effekt bei der Bindung von *EcoSSB* an poly(dT) im Hochsalz nicht in einem für ein solches Modell zu erwarteten Ausmaß. Eine Erklärung dafür könnte die hohe Mobilität der SSB-Moleküle auf dem DNA-Strang sein (Greipel *et al.*, 1987). Demnach könnte ein SSB zunächst nur wenige Nukleotide binden und eine folgende Umordnung der anderen gebundenen SSBs könnte dazu führen, dass dem neu gebundenen Protein mehr Nukleotide zur Verfügung stehen. Die von Urbanke und Schaper (1990) beschriebene initiale Bindungsplatzgröße von ca. 15 Nukleotiden impliziert, dass ein *EcoSSB*-Tetramer auch mit einer einzelnen Untereinheit an DNA binden kann.

1.4 SSB-Proteine aus extremophilen Organismen

Obwohl SSB-Proteine aus einer Reihe von Prokaryoten bereits ausführlich untersucht wurden (vgl. 1.2.1), wurden bis zu Beginn dieser Arbeit noch keine Einzelstrang-DNA bindenden Proteine aus extremophilen Eubakterien wie *Aquifex aeolicus* (*Aae*), *Thermus aquaticus* (*Taq*) oder *Deinococcus radiodurans* (*Dra*) charakterisiert, obwohl deren chromosomale DNA sequenziert und auch SSB-Sequenzen annotiert wurden (EMBL: AAC06439.1, AF276705.1, AAF09692.1). Während bei thermophilen Organismen, wie dem bei 75°C lebenden *T.aquaticus*, die essentielle Funktion von SSB zur Stabilisierung der ssDNA in Frage gestellt werden könnte, da bei 75°C keine stabilen ssDNA-Sekundärstrukturen zu erwarten sind, ist bei den optimalen Wachstumsbedingungen von *D.radiodurans* (<35°C) die Funktion vermutlich homolog zu der anderer bakterieller SSBs. Dennoch ist *D.radiodurans* hinsichtlich seiner DNA-Replikation und DNA-Reparatur von besonderem Interesse: Es ist resistent gegen ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, Austrocknung, oxidierende Reagenzien und elektrophile Mutagene (Minton, 1994). *D. radiodurans* wurde 1956 in einer Dose mit verdorbenem Fleisch entdeckt, die zur Sterilisation mit sehr hohen Dosen radioaktiver Strahlung behandelt worden war (Anderson *et al.*, 1956). Es ist der am stärksten strahlungsresistente Organismus, der bisher entdeckt wurde, da er Strahlungsdosen von 15000 Gray überlebt, was etwa dem 3000-fachen der letalen Dosis humaner Zellen entspricht (Rew, 2003). *D.radiodurans* ist offenbar in der Lage die zahlreichen durch ionisierende Strahlung entstehenden Doppelstrangbrüche der DNA wieder richtig zu verknüpfen (Minton, 1996).

Die Mechanismen, die die Grundlage der hohen Radiotoleranz bilden könnten, sind bisher nicht vollständig geklärt. Bei den bekannten Reparaturproteinen zeigt

D.radiodurans eine relativ hohe Homologie zu den entsprechenden bereits charakterisierten *E.coli*-Proteinen (Battista, 1997). Auch nach der Sequenzierung des Genoms von *D.radiodurans* (White *et al.*, 1999) sind keine grundlegenden Unterschiede zu den Reparaturproteinen anderer Organismen erkannt worden.

Hua *et al.* (2003) identifizierten kürzlich ein Protein (PprI), dass die RecA-Expression in *D.radiodurans* induziert. Außerdem zeigten sie, dass natürlich auftretende PprI-negative *D.radiodurans*-Stämme sensitiv gegenüber radioaktiver Strahlung sind. *E.coli* Zellen, die das Regulatorprotein PprI aus *D.radiodurans* exprimieren, weisen nach radioaktiver Bestrahlung eine erhebliche RecA-Expression auf, die mit einer erhöhten Strahlungstoleranz verbunden ist (Gao *et al.*, 2003). Für die effiziente DNA-Reparatur ist neben der besonderen Regulation der RecA-Proteinmenge auch die hohe Kopienzahl des Genoms von Bedeutung, da diese sicherstellt, dass redundante Kopien zur Verfügung stehen.

Weiterhin werden verschiedene strukturelle Anordnungen der chromosomalen DNA widersprüchlich diskutiert (Battista *et al.*, 2003; Levin-Zaidman *et al.*, 2003). Generell kann man sagen, dass *D.radiodurans* durch besondere Regulation und Organisation aus einem bereits bekannten Satz an Reparaturenzymen ein besonders effektives Reparatursystem entwickelt hat (Narumi, 2003).

Teil dieser Arbeit ist es, zwei Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe (*TaqSSB* und *DraSSB*) zu charakterisieren und sie mit bereits bekannten SSB-Proteinen, die ebenfalls eine wichtige Funktion bei der DNA-Reparatur und Rekombination besitzen (vgl. 1.3.2), zu vergleichen.

Ähnlichkeiten zwischen *TaqSSB* und *EcoSSB*

Im Vergleich zu *EcoSSB* besitzen die wesentlich größeren SSB-Proteine aus der *Thermus*-Gruppe zwei Bereiche, die jeweils homolog zu Teilen der DNA-Bindungsregion von *EcoSSB* sind. Zur besseren Darstellung wird die Aminosäuresequenz des *TaqSSBs* daher in ein N-terminales und ein C-Terminales Fragment unterteilt. Diese Fragmente werden mit der Sequenz von *EcoSSB* verglichen (Abbildung 6).

Das Alignment zeigt eine deutliche Homologie zwischen der DNA-bindenden Domäne von *EcoSSB* und den beiden Fragmenten von *TaqSSB*. Aus der Sequenzanalyse kann man schließen, dass pro *TaqSSB*-Molekül zwei DNA-Bindungsmotive (*OB-folds*) vorhanden sind.

TaqSSB-N	ma-RGLNQVFLICTLTARFDMDRYTPGGLAILDLNLAGQDAFTDESGQE-REVPWYHRVRL	58
EcoSSB	masRGVNKVLIVGNLGQDPEVRYMPNGGAVANITLATSESWRDKATGEmKEQTEWHRVVL	60
TaqSSB-C	r--RALNQVILMCNLTTRDPLDLYTPQGTAVVRLGLAVNERRRgqeeerthflevqawrel	58
TaqSSB-N	LGRQAEMWGDLLEKQQLIFVEGRLEYSRQWekdgekksevgvraefi dplegrgretleda	118
EcoSSB	FGKLAEVASEYLRKGSQVYIEGQLRTRKWTDSGQDRYTTEVvvnv ggtmqmlggrqg gg	120
TaqSSB-C	aewase-----LRKGDGLLVIGRLVNDSWTSSSGERRFQTRVealr lerpt r gpaqag gs	113
TaqSSB-N	rgqprl-----	124
EcoSSB	apaggni gggqpqggwgqpqqpqqgnqfsggaqsrpqsapaapsneppmdf DDIDIPF	178
TaqSSB-C	rpptvqt ggvdidegledfpp----- EEDLIPF	140

Abbildung 6: Sequenzvergleich zwischen EcoSSB und TaqSSB. Um die beiden Homologien zu EcoSSB zu zeigen, wurde die Kette des TaqSSB zweigeteilt. (Programm: MACAW (Schuler et al., 1991), dunklere Farben stehen für stärker konservierte Aminosäuren, deren Austausch evolutionär gesehen unwahrscheinlicher ist.)

1.5 Interaktion von EcoSSB mit der DNA-Polymerase III

1.5.1 Aufbau des DNA-Polymerase III Holoenzymkomplexes

Die Replikation des Genoms von *Escherichia coli* erfolgt durch den DNA-Polymerase III Holoenzymkomplex. Dieser Gesamtkomplex ist funktionell in drei Komponenten einteilbar: die beiden Polymerase-Kerne (Cores), die beiden β -sliding clamps als Prozessivitätsfaktoren und den so genannten γ -Komplex (vgl. Abbildung 7). Aufgrund der 5'→3' Polymerisationsrichtung der DNA-Polymerasen ergibt sich für den *lagging-strand* eine diskontinuierliche Polymerisation mit dem Auftreten von Okazaki-Fragmenten, während der *leading-strand* kontinuierlich synthetisiert wird. Allein aus dieser Tatsache ergibt sich wegen der simultanen Replikation des *leading*- und des *lagging-strands* ein asymmetrischer Aufbau des DNA-Polymerase III Enzymkomplexes (Glover und McHenry, 2001).

Insgesamt besteht der DNA-Polymerase III Holoenzymkomplex aus 19 Untereinheiten mit 10 verschiedenen Polypeptidketten (Onrust et al., 1995b; Pritchard et al., 2000). Die DNA-Polymerase III zeichnet sich gegenüber den anderen in der Zelle vorkommenden DNA-Polymerasen I und II durch ihre hohe Prozessivität (>50 kb) und die hohe Syntheserate (~750 Nukleotide/s) aus (Kelman und O'Donnell, 1995; Gulbis et al., 2004). Eine schematische Darstellung der Zusammensetzung des Holoenzymkomplexes aus den drei Subkomplexen zeigt Abbildung 7.

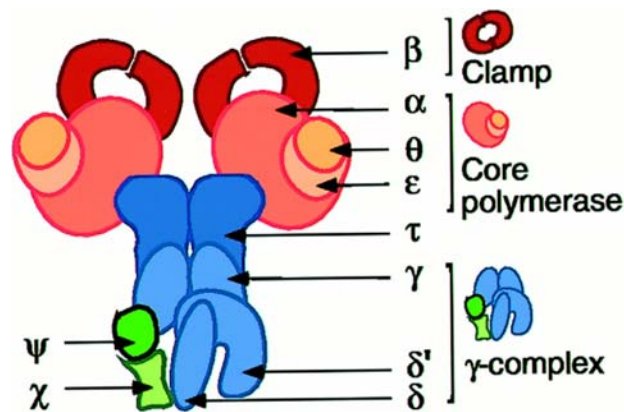


Abbildung 7: Schematische Darstellung der DNA-Polymerase III und Einteilung in Sub-Komplexe nach Kelman *et al.* (1998). Die Untereinheiten δ, δ' und γ bilden den so genannten clamp-loader-complex (siehe Text) als Subgruppe des γ -Komplexes. Gezeigt sind nur zwei der drei γ -Untereinheiten.

Der DNA-Polymerase III-Holoenzymkomplex ist Gegenstand vieler Untersuchungen, die vor allem dadurch profitieren, dass sich der gesamte Komplex *in vitro* aus den isolierten Untereinheiten rekonstituieren lässt (O'Donnell und Studwell, 1990; Kelman und O'Donnell, 1995; Onrust *et al.*, 1995a; Davey und O'Donnell, 2000).

DNA-Polymerase III-Core-Komplex

Der Core-Komplex setzt sich aus drei Proteinen zusammen (McHenry und Crow, 1979): der α -Untereinheit, die die 5'-3'-Polymerase-Reaktion katalysiert, der ε -Untereinheit, die die 3'-5' *proofreading*-Exonukleaseaktivität besitzt, und der θ -Untereinheit, die als Verbindung zwischen den beiden ersteren fungiert und deren weitere Funktion noch nicht genau geklärt wurde.

γ -Komplex (Clamp-loader-Komplex+ $\chi\psi$)

Der γ -Komplex des DNA-Polymerase III Holoenzym besteht aus einem Ring, der aus den Untereinheiten δ, δ' und γ gebildet wird und dem $\chi\psi$ -Komplex. Der auch *clamp-loader*-Einheit oder DnaX-Komplex (nach dem Gen für die γ -Untereinheit) genannte Sub-Komplex aus δ, δ' und γ besitzt eine ATPase-Aktivität und verwendet die durch ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie zum Öffnen und Schließen der β -*sliding-clamp* (s.u.). Die Stöchiometrie des Komplexes wurde zu $\gamma_3\delta\delta'$ bestimmt (Pritchard *et al.*, 2000), was durch die kürzlich veröffentlichte Röntgenstruktur bestätigt wurde (Jeruzalmi *et al.*, 2001). Der *clamp-loader*-Komplex steht über ein τ -Dimer in Kontakt mit den α -Untereinheiten der Core-Polymerasen (Onrust *et al.*, 1995b) und der Helikase (DnaB). Die τ -Untereinheit ist mit der γ -Einheit bis auf ein zusätzliches C-terminales Segment identisch, da beide Untereinheiten durch das

gleiche Gen codiert werden (Tsuchihashi und Kornberg, 1990). Über dieses Segment findet die Interaktion mit DnaB und den Polymerase-Cores statt. Der *clamp-loader*-Komplex ($\gamma_3\delta\delta'$) ist mit dem $\chi\psi$ -Komplex assoziiert, der seinerseits mit den am *lagging-strand* gebundenen SSB-Proteinen interagiert (Kelman *et al.*, 1998).

Der vollständige γ -Komplex hat also eine Stöchiometrie von $\gamma_3\delta\delta'\chi\psi$ und steht über die τ -Untereinheiten mit den Polymerase-Cores in Kontakt.

β -Komplex (β -sliding-clamp)

Der β -Komplex stellt ein ringförmiges Dimer mit einem Durchmesser von ca. 2.5 nm dar (Kong *et al.*, 1992). Während der DNA-Synthese umschließt der Komplex die neu entstehende doppelsträngige DNA und sorgt durch seine Interaktion mit der Core-Polymerase dafür, dass diese nicht von der DNA dissoziieren kann (Kuriyan und O'Donnell, 1993). Die zur DNA-Bindung notwendige Öffnung des β -Ringes wird ATP-abhängig vom *clamp-loader*-Komplex katalysiert. Im gesamten DNA-Polymerase III Holoenzym gibt es zwei β -Komplexe, die Kontakt mit der *leading*- bzw. *lagging-strand* Core-Polymerase haben. Kong *et al.* (1992) haben gezeigt, dass die β -sliding-clamp für die hohe Prozessivität verantwortlich ist.

1.5.2 Wechselwirkung zwischen der χ -Untereinheit und EcoSSB

Wechselwirkungen zwischen EcoSSB und der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III bzw. dem $\chi\psi$ -Komplex wurden von Kelman *et al.* (1998) bzw. Glover und McHenry (1998) beschrieben. Bindungsstudien von χ mit EcoSSB Wildtyp bzw. der carboxyterminalen EcoSSB-Mutante P176S (*ssb113*) zeigten, dass die Wechselwirkung zwischen EcoSSB und χ über den C-Terminus von EcoSSB vermittelt wird (Kelman *et al.*, 1998). Aus der Tatsache, dass die Synthese des *leading-strands* von der Anwesenheit von SSB unabhängig ist und dass durch den direkten Kontakt der Polymerase mit der Helikase am *leading-strand* keine ssDNA auftritt, ergibt sich, dass die Wechselwirkung zwischen dem $\chi\psi$ -Komplex und SSB auf den *lagging-strand* beschränkt ist (Mok und Marians, 1987). Weiterhin fanden Glover und McHenry (1998), dass die Affinität von EcoSSB und χ in Anwesenheit von ssDNA und den anderen Untereinheiten des γ -Komplexes um Größenordnungen erhöht wird. Kelman *et al.* (1998) postulieren, dass die χ -Untereinheit eine Rolle als molekularer „cowcatcher“ spielt: Durch die Wechselwirkung mit χ soll die Interaktion von EcoSSB und ssDNA geschwächt werden und damit die ssDNA für die Aktion der DNA-Polymerase freigesetzt werden.

Die Untersuchung der Wechselwirkung des *EcoSSB*-Proteins mit der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III ist Teil dieser Arbeit.

1.6 Ziel der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Wechselwirkung zwischen der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III und dem Einzelstrang-DNA bindenden Protein aus *E.coli* näher zu charakterisieren. Insbesondere soll der Einfluss einzelsträngiger DNA auf die Wechselwirkung zwischen *EcoSSB* und der χ -Untereinheit und der Einfluss der χ -Untereinheit auf die Interaktion von *EcoSSB* mit ssDNA untersucht werden. Dabei stellt sich vor allem die Frage, ob die von Kelman *et al.* (1998) postulierte Bedeutung der χ -Untereinheit für die Dissoziation der SSB-Proteine von der ssDNA am *lagging-strand* nicht kontraproduktiv für die DNA-Replikation ist, da ssDNA schon im Millisekundenbereich *Hairpin*-Strukturen ausbilden kann, die die Polymerase inhibieren würden (Riesner und Römer, 1973; Reckmann *et al.*, 1985)

Für diese Untersuchungen soll vorrangig analytische Ultrazentrifugation und im Vergleich dazu das Oberflächenplasmonresonanz-Verfahren (SPR) zum Einsatz kommen. Die *EcoSSB*-DNA-Wechselwirkungen sollen mit Hilfe von DNA-Schmelzexperimenten charakterisiert werden.

In Hinblick auf die in thermophilen bzw. extremophilen Bakterien bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht charakterisierten SSB-Proteine sollen die Einzelstrang-DNA bindenden Proteine aus *Deinococcus radiodurans* (TIGR-Datenbank DR099) und aus *Thermus aquaticus* (EMBL AF276705) in *Escherichia coli* exprimiert, aufgereinigt und ihre biophysikalischen Eigenschaften vergleichend zu *EcoSSB* untersucht werden. Dabei ist der Vergleich zwischen *EcoSSB* und *DraSSB* im Hinblick auf die sehr effiziente DNA-Reparatur in *D.radiodurans* von besonderem Interesse. In Komplementationsexperimenten soll weiterhin überprüft werden, ob *DraSSB* *EcoSSB in vivo* ersetzen kann.

Für die biophysikalische Charakterisierung der neuen SSBs aus *T.aquaticus* und *D.radiodurans* sollen neben analytischer Ultrazentrifugation für die Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften auch statische und zeitaufgelöste Fluoreszenz-Messungen verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien stammen von den Firmen Fluka, Sigma-Aldrich, Merck oder Riedel-de-Haen und entsprechen mindestens dem Reinheitsgrad *pro analysi* oder „für biochemische Zwecke“ (falls nicht zusätzlich angegeben). Tabelle 1 zeigt eine Auflistung der verwendeten Chemikalien für die im weiteren Text eine Abkürzung benutzt wird. Alle anderen Chemikalien werden im Text mit dem IUPAC-Namen oder der entsprechenden IUPAC-Abkürzung verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Abkürzungen

Chemikalie	Abkürzung
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,2-propandiol	Tris
Ammoniumperoxodisulfat	APS
Coomassie Brilliant Blue G250 und R250 f. die Elektrophorese	CBB
Dimethylsuberimidat	DMS
Dithiotreitol	DTT
Essigsäure (reinst)	HAc
Ethanol	EtOH
Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz	EDTA
1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)-carbodiimid	EDC
Ethidiumbromid	EtBr
Guanidiniumchlorid	GuaHCl
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure	HEPES
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid	IPTG
Kaliumphosphatpuffer	KP _i
β -Mercaptoethanol	MeSH
Methanol	MeOH
Natriumchlorid	NaCl
N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin	Tricin
Natriumdodecylsulfat	SDS
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃
Natronlauge	NaOH
N-hydroxysuccinimid	NHS
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin	TEMED
Phenylmethansulfonylfluorid	PMSF
Salzsäure	HCl
Trichloressigsäure	TCA
Triethanolamin-HCl	TRA
Polyethylenglykol	PEG

2.1.2 Puffer

Standardpuffer: 0.3 M NaCl (sofern nicht anders angegeben)
 20 mM KP_i pH 7.4
 sterilfiltriert und entgast

2.1.3 Proteine

Proteine, die nicht selbst aufgereinigt wurden, standen als fertige Glycerin-Stammlösungen bekannter Konzentration und Reinheit im Labor der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Für alle Proteine gilt die folgende Bezeichnungskonvention:

*Organismus*Protein Aminosäure(Wildtyp)/Position/Aminosäure(Mutation)

Dabei bedeutet ein Asterisk (*) in der Aminosäure(Mutation)-Position, dass das für die Aminosäure(Wildtyp) codierende Basen-Triplett durch ein Stop-Codon ersetzt wurde. So bedeutet beispielsweise:

- *EcoSSB* P176S: SSB aus *E.coli*, dessen Prolin an Position 176 durch ein Serin ersetzt wurde
- *EcoSSB* Q152*: SSB aus *E.coli*, das nach der Aminosäure 151 deletiert ist.

Einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Proteine und ihre Eigenschaften gibt Tabelle 2. Die Molmasse errechnet sich dabei aus der Aminosäurezusammensetzung, der Extinktionskoeffizient errechnet sich nach Pace *et al.* (1995) aus den Anteilen der aromatischen Aminosäuren. Beide Werte wurden, wie auch der isoelektrische Punkt (pI), entweder mit dem Lasergene-Programmpaket (DNASar) errechnet oder der SwissProt-Expasy-Datenbank entnommen. Das partielle spezifische Volumen ergibt sich aus der Summe der partiellen spezifischen Volumina der einzelnen Aminosäuren (Laue *et al.*, 1992) und wurde mit dem Programm Sednterp (J. Philo, USA) errechnet.

Tabelle 2: In dieser Arbeit benutzte Proteine und Ihre Eigenschaften

Protein	AA	Mw [kg/mol] (Monomer)	Mw [kg/mol] (Oligomer)	Extinktions- koeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	partiell spezifisches Volumen [m ³ /kg*1000]	Isoelektr. Punkt pI
<i>DraSSB</i>	301	32.722	65.444	79940	0.7227	5.28
<i>EcoSSB</i> wt	177	18.843	75.375	113000	0.7191	5.45
<i>EcoSSB</i> Q152*	151	16.003	64.015	113000	0.7223	9.06
<i>EcoSSB</i> P176S	177	18.833	75.335	113000	0.7187	5.69
<i>TaqSSB</i>	264	30.028	60.056	78520	0.7301	5.21
χ -Untereinheit Polymerase III <i>E.coli</i>	147	16.632	-	29280	0.7334	5.91

Die Angabe der Proteinkonzentration erfolgt dabei für *EcoSSB* bezogen auf Tetramere und für *TaqSSB* bzw. *DraSSB* bezogen auf Dimere.

2.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide für ssDNA-Bindungsexperimente

Das verwendete poly(dT), poly(rU) und poly(dA·dT) stammt von der Firma Amersham Biosciences. Die molaren Extinktionskoeffizienten pro Base betragen:

Poly(dT)	$\epsilon_{\max}$	=8600 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Urbanke und Schaper, 1990)
Poly(rU)	$\epsilon_{260\text{nm}}$	=9200 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Williams <i>et al.</i> , 1983)
Poly(dA·dT)	$\epsilon_{260\text{nm}}$	=6700 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Williams <i>et al.</i> , 1983)

Die Angabe der Oligonukleotid-Konzentrationen erfolgt immer in Monomeren.

PCR-Primer

Alle PCR- und Sequenzier-Oligonukleotide stammen von der Firma MWG-Biotech.

Tabelle 3: Verwendete Primer und deren Basensequenz

Name	Sequenz 5'→3'	Länge
<i>DraSSB1</i>	gga gac cat ggc ccg agg cat gaa cca c	28
<i>DraSSB2</i>	gaa gag gat cct cat gtt ggg tgt cct tgg tg	32
<i>DraSSB3</i> (Mitte)	gag att cgc tac acc (Sequenzierprimer)	15
<i>DraSSB4</i> (Mitte)	acg gtc ctg gta gtt (Sequenzierprimer)	15
<i>DraSSBEcoRI-1</i>	gga gag aat tct agc gat ggc ccg agg cat gaa cca c	37
<i>DraSSBEcoRI-2</i>	gaa gag aat tct taa aag ggc agg tcg tct tc	32
<i>TaqSSB1</i>	gga gac cat ggc tcg agg cct gaa cca	27
<i>TaqSSB2</i>	gaa gag gat cct caa aac ggc aaa tcc tcc tc	32
Chi_FW	cgg aag ccc atg gca aac gcg acg ttc tac ctt ctg gac aat	42
Chi_RW	gga agc tcg agt cat ttc cag gtt gcc gta ttc agg ttg aaa	42

2.1.5 Standards

Proteingrößenstandards

Molecular Weight Marker (MWM, Fermentas)

Größen in kDa: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4

Protein Ladder 10-200 kDa (Fermentas)

Größen in kDa: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10

Prestained Protein Ladder 10-200kDa (Fermentas)

Größen in kDa: 180, 130, 100, 73, 54, 50, 35, 24, 16, 10

Fullrange-Rainbow-Standard (RPN800, Amersham Biosciences)

Größen in kDa: 250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15, 10

DNA-Standards

100bp-Standard (Fermentas)

Größen in Bp: 100-1000 in 100er-Schritten, +517, 1000, 1200, 1517

DNA-Ladder-Mix (Fermentas)

Größen in Bp: 100-1000 in 100er Schritten, 1200, 1500-4000 in 500er-Schritten, 4000-10000 in 1000er-Schritten

2.1.6 Bakterienstämme

LK111(λ) Genotyp: *thi-1 leuB6 tonA21 thr-1 supE44 lacI^q Z Δ M15*

E. coli K12-Derivat, Eingruppierung in Sicherheitsstufe S1, LK111(λ) ist ein λ -lysogener Stamm, der besonders für die Vermehrung von Plasmiden mit einem P_L-Promotor geeignet ist, da der λ -Repressor in diesem Stamm exprimiert wird und somit die klonierten Gene unter Kontrolle des λ -Repressors noch nicht exprimiert werden (Zabeau und Stanley, 1982).

BL21(DE3)pLysS Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)

Sicherheitsstufe S1 *E. coli* B-Stamm der Firma Novagen, der für die Expression von in pET-Vektoren klonierter Gene verwendet wird. (DE3) bezeichnet dabei, dass der Stamm ein Lysogen von IDE3 ist und daher eine chromosomale Kopie des T7-RNA Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors trägt. pLysS ist ein pET kompatibles Plasmid, dass für T7 Lysozym codiert, welches in kleinen Mengen exprimiert wird und ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA Polymerase ist. Daher wird bei nicht induziertem Status eine geringe Basalexpression des im pET-Vektor klonierten Gens unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors erreicht. Der Stamm trägt ein Chloramphenicolresistenzgen (Studier und Moffatt, 1986).

Thermus aquaticus (DSM 625^T, ATCC 25104) und *Deinococcus Radiodurans* (DSM 20539, ATCC 13939)

Referenzstämme, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen wurden. Medien und Wachstumstemperaturen wurden wie in den DSMZ-Hinweisen gewählt.

2.1.7 Plasmide

pET-15b

pET-15b ist ein kommerzieller Expressionsvektor (5708 Bp) der Fa. Novagen, der sich ebenfalls von pBR322 ableitet (Vektorkarte vgl. 6.3). Der Vektor trägt eine Ampicillinresistenz. Das klonierte Gen steht unter Kontrolle des T7-Promotors und des *lac*-Operators. Zusätzlich besteht durch Wahl der Restriktionsschnittstellen bei der Klonierung die Möglichkeit einen N-terminalen His-Tag an das zu exprimierende Protein anzufügen.

pSF1

4820 Bp großes pBR322-Derivat mit dem *EcoSSB*-gen unter der Kontrolle eines P_L-Promotors (Bayer *et al.*, 1989). pSF1 trägt das Gen für eine Ampicillinresistenz. (Vektorkarte vgl. 6.4)

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien, Nährmedien

Als universelles Medium für die Anzucht von *E.coli* wird Luria-Bertani-Nährmedium verwendet. Für Agarplatten wird diesem Medium noch 1.5%(w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Für eventuelle Selektion werden dem Medium nach dem Autoklavieren noch die entsprechenden Mengen Antibiotika zugesetzt (Endkonzentrationen für Ampicillin=100 µg/ml, für Chloramphenicol= 30 µg/ml und für Kanamycin=50µg/ml)

<u>LB-Medium</u>	10% (w/v) Hefeextrakt
	10% (w/v) Caseinhydrolysat
	5% (w/v) NaCl, pH 7.5

Die Anzucht der *E.coli*-Zellen erfolgt, sofern nicht anders angegeben, bei 37°C.

Für die Anzucht von *Deinococcus radiodurans* wird das von der DSMZ vorgegebene Medium Nr.53 (Corynebakterium-Medium) verwendet:

<u>Medium 53</u>	1% (w/v) Caseinhydrolysat
	0.5%(w/v) Hefeextrakt
	0.5%(w/v) Glucose
	0.5%(w/v) NaCl, pH 7.2-7.4

Die Anzucht der *D.radiodurans* Kulturen erfolgt bei 30°C ohne Zugabe von Antibiotika.

2.2.2 Transformation und Kompetente Zellen

Alle verwendeten kompetenten Zellen wurden nach der TSS-Methode (*transformation and storage in the same solution*) präpariert (Chung *et al.*, 1989). Die bei der Transformation erreichte Ausbeute beträgt je nach Zelltyp und Alter der Präparation zwischen 10^5 und 10^7 Klonen pro 1 µg transformierter Plasmid-DNA. Für die Transformation wird die Menge der zugegebenen Plasmid-DNA so abgeschätzt, dass die LB-Platten nicht zu dicht mit Bakterien zuwachsen, um später einzelne Klone picken zu können.

- Transformation
- Zugabe der DNA zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen
 - 30 min Inkubation auf Eis
 - Erhitzen auf 42°C für 45 s (*Heatshock*)
 - Abkühlen auf Eis und Ausstreichen auf LB-Platten

2.2.3 Glycerinkulturen

Um hergestellte Bakterienstämme längerfristig zu lagern, werden diese mit Glycerin versetzt. Dazu werden 750 µl einer frischen Übernacht-LB-Kultur mit 150 µl sterilem Glycerin versetzt und vorsichtig gemischt. In dieser Form können die Kulturen über längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.4 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen werden jeweils aus Zellen einer frischen Übernacht-Kultur hergestellt. Dabei unterscheidet man so genannte Mini-Präparationen (*Minipreps*), die aus relativ kleinen Kultur-Volumina (2-4 ml) hergestellt werden von Midi- oder Maxi-Präparationen (>100 ml). Die Methoden werden mit kommerziell erhältlichen Kits der Firma Qiagen durchgeführt (*QIAprep Spin Miniprep*, *Qiagen Plasmid Maxi Kit*) und basieren alle auf folgendem Prinzip: Zunächst werden die aus dem Medium abzentrifugierten Bakterien durch NaOH und SDS lysiert. Dabei wird gleichzeitig die gesamte DNA denaturiert. Durch Zugabe von Acetat wird die DNA renaturiert, dabei finden sich nur Plasmide in löslicher Form wieder, da die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe nicht wieder in ihren Ausgangszustand zurückfindet und aus der Lösung mit den anderen Zellbestandteilen (z.B. Proteine, Membrane, etc.) ausfällt. Diese ausgefällten Bestandteile werden abzentrifugiert und die Plasmid-DNA im Überstand an eine Säule gebunden. Diese Säule wird nun mit ethanolischer Lösung gewaschen. Anschließend kann die Plasmid-DNA mit Puffern niedriger

Ionenstärke (Wasser oder 50 mM Tris) von der Säule eluiert werden. Bei *Midi-* und *Maxipreps* schließt sich noch eine Isopropanol/Ethanol-Fällung zur Entsalzung der Plasmid-DNA an.

2.2.5 Modifikation, Analyse und Amplifikation von DNA

Agarosegelelektrophorese

Zur Größenanalyse von DNA-Fragmenten (>500 Bp) werden standardmäßig 1%(w/v)-Agarosegelelektrophoresen in TPE-Puffer (s.u.) durchgeführt. Die zu analysierende Probe wird mit Auftragspuffer versetzt, dem nach Bedarf auch RNase zugesetzt wird. Diese Proben (bis zu 20 µl) werden in die Taschen des horizontalen Agarosegels pipettiert und das Gel bei einer konstanten Spannung von 90-110 V gefahren. Um Überhitzung und das damit verbundene Schmelzen der Agarose zu verhindern, steht die Gel-Apparatur auf einer von kaltem Wasser durchspülten Kühlplatte. Im Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (~1 µg/ml) für etwa 10 Minuten gefärbt. Nach Spülen mit Wasser kann das Gel im UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) des Easy-Geldokumentationssystems (Fa. Herolab, Deutschland) fotografiert werden.

<u>TPE-Puffer</u>	89	mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 8.0
	2	mM	EDTA-Na ₂
<u>Auftragspuffer</u>	0.25	M	EDTA-Na ₂
	1.2 %	(w/v)	SDS
	25 %	(w/v)	Saccharose
	0.1 %	(w/v)	Bromphenolblau
	0.1 %	(w/v)	Ribonuklease A (nach Bedarf)

TPE-Polyacrylamidgele

Zur Größenanalyse kleinerer DNA-Fragmente (z.B. PCR-Produkte) werden vertikale TPE-Polyacrylamidgele benutzt. Die mit 5 µl Azorubin-Auftragspuffer versetzte Probe (z.B. 4-5 µl PCR-Produkt) wird in die Taschen des vertikalen Gels pipettiert und die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 100 V bzw. einer konstanten Stromstärke von 30 mA gefahren. Die Färbung und Dokumentation des Gels wird wie bei der Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

<u>TPE-AA-Gel</u>	0.7 ml	10xTPE(20mM EDTA,0.89M Tris/H ₃ PO ₄)
	1.16 ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamidlsg
	5.14 ml	QBD
	+ je 16µl	APS (40%) und TEMED zur Polymerisation

Auftragspuffer 0.1% (v/v) Azorubin + Glycerin in QBD

Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Bereichen mit zumindest bekannter Sequenz der umliegenden Bereiche der Ziel-DNA wird die Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt (Mullis *et al.*, 1986). In den verschiedenen Schritten der PCR wird zunächst die Template-DNA mit dem zu amplifizierenden DNA-Bereich durch Temperaturerhöhung (~95°C) denaturiert, d.h. die Stränge der dsDNA werden getrennt. Anschließend findet das so genannte Annealing der Primer statt, üblicherweise bei Temperaturen zwischen 50°C und 60°C. Diese Primer sind synthetische Oligonukleotide, die komplementär zu den Sequenzen sind, die den Bereich umgeben, der amplifiziert werden soll. Die Primer bestehen neben den komplementären Sequenzen eventuell noch aus einem Überhang. Diese Überhänge können Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthalten, über die das Produkt der PCR später in einen Empfängervektor kloniert werden kann. Nach dem Annealing findet die Synthese des komplementären Strangs der Ziel DNA durch eine temperaturstabile DNA-Polymerase (*Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) bei 72°C statt. Diesem Syntheseschritt folgt wieder die Denaturierung der neu synthetisierten dsDNA. Der Vorgang des Annealings, Synthese und Denaturierung wird 20 bis 40-fach wiederholt. Durch die wiederholten Zyklen der PCR im Überschuss von Primern und dNTPs wird schon nach ca. 20 Zyklen eine millionenfache Amplifikation des durch die Primer festgelegten Bereiches erreicht. Nach Beendigung der PCR-Zyklen folgt ein zusätzlicher verlängerter Syntheseschritt, in dem unvollständig synthetisierte Stränge aufgefüllt werden.

Alle durchgeführten PCR-Reaktionen werden mit folgendem PCR-Ansatz und dem beschriebenen Temperaturprogramm durchgeführt:

<u>PCR-Ansatz</u>	1	µl	Plasmid Template (ca. 5 ng/µl)
	0.5	µl	von jedem Primer (25 µM in QBD)
	2.5	µl	dNTP (2 mM)
	2.5	µl	10x- <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer (Stratagene)
	0.5	µl	Cloned <i>Pfu</i> -Polymerase (Stratagene)
	ad 25	µl	QBD

<u>Temperaturprogramm</u>	1. 5 min bei 94°C (Hot-Start)
	2. 45 s bei 94°C (Denaturierung)
	3. 20 s bei Annealing-Temperatur (53°C)
	4. 90 s bei 72°C (Synthese)
	5. Wiederholung ab Schritt 2, 30x
	6. 10 min bei 72°C (Auffüllen)
	7. Kühlung auf 4°C und Lagerung

Zur Amplifikation von Genen aus chromosomaler DNA (*T.aquaticus* oder *D.radiodurans*) wird eine kleine Menge der Zellen (z.B. mit einem Zahnstocher) in TE-Puffer überführt und bei 95°C denaturiert. Diese Lösung kann als Template-Lösung in der PCR verwendet werden.

Zur Entfernung von Protein, Primern und dNTPs wird das PCR-Produkt aufgereinigt. Dazu wird ein kommerzielles Kit der Fa. Qiagen (PCR *Purification-Kit*) verwendet. Dabei wird das PCR-Produkt an eine Säulenmatrix gebunden und die nicht bindenden, in den weiteren Schritten unerwünschten Bestandteile ausgewaschen. Nach Elution des PCR-Produktes mit Wasser oder dem Elutionspuffer wird die Länge des PCR-Produkts zunächst mit einem TPE-Polyacrylamidgel (s.o.) überprüft und bei richtiger Größe direkt in Restriktionsansätzen verwendet.

Restriktionsspaltung

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammen von den Firmen New England Biolabs, Fermentas oder Roche-Diagnostics. Die genauen Spaltbedingungen richten sich nach den jeweiligen Herstellerangaben. Für Ansätze mit zwei Restriktionsenzymen muss auf eine Kompatibilität des verwendeten Puffers geachtet werden, um eventuelle unerwünschte und nicht-selektive Spaltaktivität (*Star*-Aktivität) der Enzyme zu verhindern. Falls die verwendeten Restriktionsenzyme durch Hitze inaktivierbar sind, wird dies den Herstelleranweisungen entsprechend durchgeführt.

Gelextraktion

Um z.B. ein *Insert* eines zuvor mit Restriktionsenzymen gespaltenen Plasmids vom Plasmid-Rahmen abzutrennen, wird zunächst eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Nachdem das gewünschte DNA-Fragment in dem Gel unter UV-Licht identifiziert wurde, wird die entsprechende Bande möglichst genau mit einem Skalpell herausgeschnitten. Anschließend wird das so erhaltene DNA-haltige Gelstück mit einem kommerziellen Kit der Firma Qiagen (*QIAquick Gel Extraction System*) aufgereinigt. Dabei wird zunächst die Agarose durch chaotrope Reagenzien aufgelöst und dann die doppelsträngige DNA an eine Matrix gebunden. Nach mehrfachem Waschen zum Entfernen der Agarose-, Salz- und Ethidiumbromidreste wird die DNA mit Wasser oder Qiagen-Elutionspuffer eluiert.

Ligation

Die Ligation zweier DNA-Fragmente, zum Beispiel Vektor-Rahmen mit PCR-Produkt, wird mit der T4-Ligase der Fa. New England Biolabs entsprechend der Hersteller-vorschriften im T4-Puffersystem bei der vorgeschriebenen Temperatur von 16°C durchgeführt.

Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenz eines neu klonierten Plasmids wird dieses sequenziert. Dabei wird mit der isolierten Plasmid-DNA aus der Plasmid-DNA-Präparation eine *Taq-cycle*-Sequenzierung durchgeführt die nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode funktioniert (Sanger und Coulson, 1975). Dabei entstehen in einer PCR in Anwesenheit von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten 2',3'-Didesoxynukleotiden fluorimetrisch analysierbare Abbruchprodukte (Prober *et al.*, 1987), die entweder auf einem Gel oder in einer Kapillare nach Größe getrennt werden und deren Fluoreszenz bei Laseranregung mit einem CCD-Chip oder einem Photomultiplier detektiert wird. Die einzelnen Fluoreszenzsignale der unterschiedlich langen DNA-Produkte ermöglichen es, die Sequenz der Proben-DNA zu ermitteln. Die aufgrund des Fluorigramms erhaltene Sequenz oder alternativ auch das Fluorigramm selbst kann direkt in Programme wie Lasergene (DNASar) oder VectorSuite NTI (Informax) eingelesen und mit der Ziel-Sequenz verglichen werden. Die Sequenzierung wird im Labor nicht selbst durchgeführt, dieser Service wird von diversen Firmen (z.B. MWG Biotech, GATC) preisgünstig angeboten und wird, wenn nicht anders angegeben, mit den Primern durchgeführt, die auch für die PCR-Amplifikation des entsprechenden Gens verwendet wurden.

2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE)

Die denaturierende Gelelektrophorese ermöglicht es Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung in einem Polyacrylamidgel nach Größe zu trennen (Laemmli, 1970). Dabei wird dem Puffer und dem Gel als denaturierendes Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, das die Proteine in eine gestreckte Form entfaltet und zudem mit negativen Ladungen versieht. Damit hat jedes Protein eine negative Gesamtladung und läuft im elektrischen Feld des Gels in Richtung der Anode. Da alle Proteine gleichmäßig negativ geladen sind erfolgt die Trennung im Gel fast ausschließlich nach Kettenlänge. Das ca. 9 x 9 cm große und 1 mm dicke Gel wird in einer vertikalen Gelapparatur eingespannt und hat am oberen und unteren Ende Kontakt zum Laufpuffer. Das Gel wird diskontinuierlich gegossen, es besteht aus einem Trennbereich (Trenngel) mit höherer Acrylamidkonzentration zwischen 13 % und 15 % (Standard) und einem Sammelgel niedriger Acrylamidkonzentration (6%), das oberhalb des Trenngels liegt und zur Fokussierung der einzelnen Proteinbanden dient.

Für die Herstellung des Gels wird zunächst die Lösung für das Trenngel zwischen die zuvor abgedichteten Gelplatten gegossen. Um eine glatte Kontaktfläche zum später gegossenen Sammelgel zu erhalten, wird die Trenngellösung sofort mit *t*-Butanol überschichtet. Als Nebeneffekt schließt die Alkoholschicht das Trenngel vom Luftsauerstoff ab, der die Polymerisation inhibieren würde. Nach erfolgter Polymerisation (5 min, Raumtemperatur) wird das *t*-Butanol abgesaugt, das Sammelgel eingefüllt und der Teflonkamm zum Freihalten der späteren Probenaschen eingesetzt. Das so erhaltene Gel kann sofort nach Polymerisation des Sammelgels verwendet werden oder alternativ bei 4°C einige Tage gelagert werden. Für die Lagerung sollte das Gel, um Eintrocknen zu vermeiden, in angefeuchtete Papiertücher eingewickelt werden und unter Luftabschluss aufbewahrt werden. Sofern im Text nicht ausdrücklich anders angegeben, wird die SDS-PAAGE wie von Laemmli (1970) beschrieben durchgeführt.

<u>Trenngel</u>	0.6 ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamidsg(Roth)
(15%)	0.38 ml	1 M Tris pH 6.8
	0.15 ml	1%ige SDS-Lösung in QBD
	1.82 ml	QBD
	+ je 6µl	APS (40%) und TEMED zur Polymerisation

<u>Sammelgel</u>	0.6 ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamidlg(Roth)
(6%)	0.38 ml	1M Tris pH 6.8
	0.15 ml	1%-SDS
	1.82 ml	QBD
	+ je 6 µl	APS(40%) und TEMED zur Polymerisation
<u>Laufpuffer</u>	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0.1%(w/v)	SDS pH ca. 8.3

Alternativ zum SDS-Gel kann auch ein Tricin-Gel verwendet werden, das eine bessere Auflösung liefern kann und hier meist für Western-Blots verwendet wird (Schägger und von Jagow, 1987).

<u>Gelpuffer</u>	3 M	Tris/HCl pH 8.45
	0.3%(w/v)	SDS
<u>Trenngel</u>	2.75 ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamidlg(Roth)
(16.5%)	1.7 ml	Gelpuffer
	0.55 ml	QBD
<u>Sammelgel</u>	0.6 ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamidlg (Roth)
(6%)	0.75 ml	Gelpuffer
	1.65 ml	QBD
<u>Kathodenpuffer</u>	0.1 M	Tris/HCl pH 8.25
	0.1 M	Tricin
	0.1%(w/v)	SDS
<u>Anodenpuffer</u>	0.2 M	Tris/HCl pH8.9

Die mit Auftragspuffer (AP) versetzten Proben werden bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Nach kurzem Abschrecken auf Eis und kurzem Zentrifugieren in der Tischzentrifuge kann das zuvor zusammengesetzte Vertikalgel beladen werden. Das Gel wird bei einer konstanten Stromstärke von 32 mA gefahren. Das Probenvolumen für den Auftrag in die Taschen sollte 15 µl nicht überschreiten. Ist die Proteinlösung zu verdünnt, empfiehlt sich eine Fällung mit TCA (siehe 2.2.9) und die Aufnahme des

TCA-Pellets in Auftragspuffer, dem 0.5 M Tris zur Neutralisation des TCA zugesetzt wurde (AP/Tris). Um Aussagen über die Größe der einzelnen Protein-Banden treffen zu können, ist es zweckmäßig, einen Proteingrößenstandard mit aufzutragen (siehe 2.1.5).

<u>Auftragspuffer</u>	50%	(v/v)	Glycerin
	0.16	M	Tris/HCl pH 6.8
	5%	(v/v)	β -Mercaptoethanol (falls erwünscht)
	2%	(w/v)	SDS
	0.01%	(w/v)	Bromphenolblau

Ist die Elektrophorese beendet, wird das zwischen den Glasplatten heraus gelöste Gel einige Minuten in Coomassie-Lösung (s.u.) gekocht und anschließend durch Kochen in 7%iger (v/v) Essigsäure entfärbt. Die Dokumentation erfolgt entweder durch Fotografieren im Durchlicht (Easy-Geldokumentation, Fa. Herolab) oder durch Einscannen am PC. Das Gel wird zu Dokumentationszwecken zusätzlich getrocknet, um es längerfristig lagerfähig zu machen. Dazu wird das Gel zunächst in Wasser gelagert, dann in 55%iges (v/v) Methanol (+2% Glycerin) überführt und etwa 20 Minuten inkubiert. Nun kann das Gel zwischen zwei Cellophanfolien im Geltrockner bei 50°C im Wasserstrahlvakuum getrocknet werden.

<u>Coomassieslg.</u>	42.5%	(v/v)	Ethanol
	5%	(v/v)	Methanol
	10%	(v/v)	Eisessig
	0.2%	(w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
	0.05%	(w/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250

2.2.7 Expression von SSB-Proteinen in *E.coli*

Expressionstest

Ob und in welchem Ausmaß die zuvor klonierten Proteine in *E.coli* exprimierbar sind, wird zunächst in einem Expressionstest überprüft. In einem solchen Test werden etwa gleiche Zellmengen vor und stundenweise nach Induktion der Expression abgenommen und das Gesamtprotein der Zellen auf einem SDS-Polyacrylamidgel (2.2.6) verglichen. Dazu wird zunächst mit einer frischen Übernachtskultur des transformierten Stammes eine 20 ml-Kultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft. Die Kultur wird im Schüttelwasserbad bei 37°C (sofern nicht anders angegeben) bis zu einer Zelldichte angezogen, die einer Extinktion von

$E_{600\text{nm}}=0.5$ entspricht. An diesem Punkt wird der so genannte Nullwert der Kultur abgenommen ($V=0.5$ ml). Da auf dem SDS-Polyacrylamidgel möglichst gleiche Zellmengen miteinander verglichen werden sollen, wird von jeder Probe der Kultur zunächst die Extinktion bei 600 nm bestimmt, um dann die Zellen abzuzentrifugieren und in SDS-Auftragspuffer aufzunehmen. Dabei wird die Menge an Auftragspuffer so berechnet, dass für 500 μl Zellen mit einer $E_{600\text{nm}}=1$ ein Volumen von 50 μl Auftragspuffer benötigt wird. Nach Entnahme des Nullwertes wird die Kultur, sofern nicht anders angegeben, mit IPTG bis zu einer Endkonzentration von $[\text{IPTG}]=1$ mM induziert. Im Abstand von einer Stunde wird nun drei bis viermal eine weitere Probe entnommen und wie beschrieben in Auftragspuffer aufgenommen. Die Zellen in Auftragspuffer werden 10 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAAGE, vgl. 2.2.6) analysiert.

Expression in Schüttelkultur

Für die präparative Expression in mittlerem Kulturmaßstab mit Kulturgrößen bis etwa 1 Liter Medium wird die Anzucht der Bakterien in Erlenmeyerkolben im Schüttelwasserbad durchgeführt. Dazu wird eine entsprechend große Menge LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika versetzt) aus einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei der gewünschten Zelldichte induziert. Bei der präparativen Expression wird in jedem Fall auch die Probenentnahme für einen analytischen Expressionstest mit durchgeführt, um eine qualitative Abschätzung der Expression vor der Aufreinigung durchführen zu können. Nach 3-4 stündiger Expression bei 37°C im Schüttelwasserbad werden die Zellen bei 6000 rpm im GSA-Rotor bei 4°C abzentrifugiert und bis zur Aufreinigung bei -20°C eingefroren.

Expression im Fermenter

Zur Expression von Proteinen im größeren Maßstab wird die Expression in einem 10 Liter-Fermenter durchgeführt. Für das Beispiel der Expression von *Taq*SSB mit dem pET-15b-Plasmid in BL21(DE3)pLysS wird die Fermentation wie folgt durchgeführt:

Mit einer 37°C -Übernacht-Vorkultur in LB-Medium (Ampicillin, Chloramphenicol) werden zwei 500 ml-LB-Medien angeimpft (Ampicillin, Chloramphenicol) und wieder über Nacht im Schüttelwasserbad inkubiert. Mit diesen beiden Starter-Kulturen wird der Fermenter angeimpft. Der Fermenter wird vor dem Animpfen mit 6.5 l Wasser (bidest) befüllt und über Nacht bei 120°C im Trockenschrank entkeimt. Nach dem Abkühlen und Zusammenbau des Fermenters wird das autoklavierte 10-fach LB-

Medium (s.u.) und 60 ml 1 M NaOH zugegeben. Der pH-Wert wird auf pH=7.5 eingestellt, die Luftzufuhr eingeregelt und der Fermenter auf 37°C thermostatisiert. Von den beiden 500 ml-Starterkulturen werden 100 ml für eine Plasmid-Präparation abgenommen und mit dem Rest der Fermenter angeimpft. Die DNA der Plasmid-Präparation wird sequenziert um eventuelle Mutationen des Gens auszuschließen. Wie bei jeder präparativen Expression wird auch hier zur Kontrolle jeweils ein Nullwert und stundenweise Proben gezogen, um eine Expressionskontrolle durchführen zu können. Nachdem die Fermenterkultur etwa eine Extinktion $E_{600nm}=1$ hat, wird die Expression durch Zugabe von 2.38 g IPTG (gelöst in Wasser) induziert. Gleichzeitig wird auch die zusätzliche Glucose und das Casein (beide in Wasser, s.u.) zugegeben. Bei regelmäßiger Kontrolle des pH-Wertes und eventueller Zugabe von NaOH wird für 3-4 Stunden inkubiert.

Zur Ernte der Zellen werden die Bakterien bei 5050 rpm und 4°C in der Heraeus Cryofuge 8500 in 1 l-Bechern abzentrifugiert. Die Zellen werden nach dem Waschen mit SSB-Waschpuffer gewogen und in 100 ml SSB-Suspensionspuffer pro 30 g Zellen resuspendiert. Die so erhaltene Zellsuspension kann bei -70°C gelagert werden.

<u>10-fach LB</u>	50 g	NaCl
	100 g	Hefe-Extrakt
	100 g	Caseinhydrolysat
	ad ~750 ml	Wasser (bidest), autoklavieren
<u>Glucose</u>	125 g	Glucose
	ad ~20 ml	Wasser (bidest), autoklavieren
<u>Casein</u>	100 g	Caseinhydrolysat
	ad ~300 ml	Wasser (bidest), autoklavieren
<u>SSB-Waschp.</u>	200 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8.3
	1 mM	EDTA
	10% (w/v)	Sucrose

<u>Suspensionsp.</u>	200 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8.3
	1 mM	EDTA
	10% (w/v)	Sucrose
	15 mM	Spermidin

2.2.8 Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen

Säulenchromatographie

Alle im Folgenden beschriebenen säulenchromatographischen Schritte und Fraktionierungen wurden mit einer Äkta Purifier-10 HPLC-Anlage der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Die Programmierung der Aufreinigungsstrategien, die Steuerung und Datenerfassung der (Durchfluss-) Extinktion und die Fraktionszuordnung erfolgte mit dem zur Anlage gehörenden Softwarepaket *Unicorn*. Die Säulengröße wird entsprechend der aufzutragenden Menge an Proteinlösung angepasst. Alle bei der HPLC verwendeten Puffer sind sterilfiltriert und entgast. Um Verunreinigungen der Anlage und ein Zusetzen der Filter oder des Säulenmaterials zu verhindern, wird auch die aufzutragende Probe vorher sterilfiltriert.

Aufreinigung von *TaqSSB* aus *E.coli*

Die in Suspensionspuffer eingefrorenen Zellen werden langsam aufgetaut und mit 1/100 des Suspensionsvolumens einer frischen 4%-igen Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt. Weiterhin wird 1/1000 des Suspensionsvolumens einer 0.1 M PMSF-Lösung (in Isopropanol), sowie die für das Suspensionsvolumen nötige Menge *Complete-EDTA-free*-Proteaseinhibitor zugesetzt (Fa. Roche, entsprechend der Herstellerangabe verwendet). Die Zellsuspension wird auf Eis mit Ultraschall (Fa. Branson Sonifier 250) aufgeschlossen (Duty cycle 50%, Output 6). Nach dem Aufschluss werden die Zellbestandteile durch präparative Ultrazentrifugation (35000 rpm, Ti-45-Rotor, 4°C) vom klaren Lysat getrennt. Es folgt eine Hitzefällung des klaren Lysats im Wasserbad (4-6 min, 65°C) mit anschließender Ultrazentrifugation (30 min, 20000 rpm, Ti-45-Rotor). Aus dem so erhaltenen Überstand wird durch Zugabe von 5%-iger Polyethyleniminlösung (pH 6.8) bis zu einer Endkonzentration von 0.4% das *TaqSSB* gefällt. Das nach Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, HB-4-Rotor) erhaltene Pellet wird mit TGE-500 (s.u.) extrahiert. Der erhaltene TGE-500-Extrakt mit gelöstem *TaqSSB*-Protein wird über Nacht durch Zugabe von Ammoniumsulfat (25 g/100 ml) im Kühlraum gefällt. Diese Fällung wird

am nächsten Tag in BS-Puffer (s.u.) aufgenommen und auf eine im gleichen Puffer äquilibrierte Blueseparose-Säule aufgetragen die mit BS-Puffer gewaschen wird, um nicht an die Säule bindende Proteine auszuwaschen. Es folgt ein linearer Harnstoff-Gradient mit den Elutionspuffern A1 und B1. Die *Taq*SSB-haltigen Fraktionen werden vereinigt und gegen Puffer BS dialysiert. Nach dieser Dialyse wird das Protein erneut durch Zugabe von Ammoniumsulfat (35 g/100 ml) gefällt. Nach der Fällung wird das Pellet in AE1-Puffer aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Das so erhaltene Protein wird in einer Anionen-Austausch-Chromatographie (Resource Q-Säule, Amersham Biosciences, linearer Gradient AE1→AE2-Puffer) aufgereinigt. Die *Taq*SSB-haltigen Fraktionen werden unter den Gesichtspunkten der Reinheit vereinigt und mit 35 g/100 ml Ammoniumsulfat gefällt. Das Pellet wird in SBP-Puffer aufgenommen und die so erhaltene SBP-Protein-Lösung eine Stunde bei 4°C im Ti-70-Rotor ultrazentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wird gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert und bei -20°C gelagert.

<u>TGE500</u>	500 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8.3
	1 mM	EDTA
	10% (v/v)	Glycerin
<u>BS</u>	wie TGE500 nur 1 M NaCl und pH 7.5	
<u>A1</u>	wie BS, nur 2 M NaCl	
<u>A2</u>	wie A1 + 6 M Harnstoff	
<u>AE1</u>	50 mM	NaCl
	20 mM	Tris/HCl pH 7.5
	1 mM	EDTA
	10% (v/v)	Glycerin
<u>AE2</u>	wie AE1 nur 1 M NaCl	
<u>SBP</u>	500 mM	NaCl
	20 mM	KP _i pH 7.5
	1 mM	EDTA
	20% (v/v)	Glycerin

<u>Aufbew.puffer</u>	1	M	NaCl
	20	mM	KP _i pH 7.5
	1	mM	EDTA
	60%	(v/v)	Glycerin

Aufreinigung von *DraSSB* aus *E.coli*

Wie bei SSB aus *Thermus aquaticus* wird zunächst die Zellsuspension langsam aufgetaut und mit Proteaseinhibitoren (+1/1000 Volumen PMSF, *Complete-EDTA-free* (Roche)) und 1/100 des Volumens mit 4%-iger Natriumdesoxycholatlösung versetzt. Nach dem Ultraschallaufschluss und der Präparation des klaren Lysats (wie bei *TaqSSB*, hier ohne Hitzefällung) wird dem erhaltenen klaren Lysat 5%-ige Polyethyleniminlösung bis zu einer Endkonzentration von 0.4% zugegeben. Das Pellet dieser Fällung wird mit TGE400 extrahiert und der erhaltene Extrakt mit Ammoniumsulfat gefällt (20 g/100 ml). Nach Resuspendierung des Ammoniumsulfat-Pellets in TGE400 wird mit dieser Lösung eine zuvor im gleichen Puffer äquilibrierte Bluesephrose-Säule beladen und mit gleichem Puffer nachgewaschen. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten TGE400 → TGE3000. Die *DraSSB*-haltigen Fraktionen werden unter dem Gesichtspunkt der Anreicherung (nach Reinheit getrennt) vereinigt und über Nacht mit Ammoniumsulfat (20 g/100 ml) gefällt. Das nach Zentrifugation erhaltene (NH₄)₂SO₄-*DraSSB*-Pellet wird in SBP (s.o.) aufgenommen und für eine Stunde in der präparativen UZ bei 45000 rpm zentrifugiert (Rotor Ti70). Der Überstand wird gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert und bei -20°C gelagert.

(TGE-Puffer wie TGE500 (s.o.) , nur 400 mM (TGE400) bzw. 3 M (TGE3000) NaCl)

Aufreinigung von *EcoSSB* und *EcoSSB*-Mutanten

Die Expression des Wildtyp-*EcoSSB* und der Mutanten F171W und P176S erfolgt im Stamm *E.coli* BT317, die das pK248-Plasmid tragen, das für den thermosensitiven λ cl857 Repressor codiert. Die Expression des unter dem λ P_L-Promotors stehenden *ssb*-Gens wird durch Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C induziert. Die Aufreinigung von *EcoSSB*-wt und *EcoSSBP176S* erfolgt wie in Lohman *et al.* (1989) beschrieben. Die Aufreinigung von *EcoSSB* Q152* erfolgt analog zu *HsmtSSB* wie beschrieben in Curth *et al.* (1994).

Aufreinigung und Expression von Polymerase III χ

Das χ -Gen aus *E.coli* JM109 wurde durch PCR amplifiziert (Primer vgl. 2.1.4) und in pET-15b (Novagen) zwischen die *Nco*I und die *Xho*I Schnittstellen kloniert. Aufgrund der *Nco*I-Restriktionsschnittstelle mit der Erkennungssequenz CCATGG wurde die zweite Aminosäure des χ -Proteins von Lysin zu Alanin mutiert. Der Rest des Proteins ist unverändert. Für die Expression wurde das Plasmid in *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformiert (Novagen). Die Aufreinigung erfolgte modifiziert nach Xiao *et al.* (1993). Die ATP-Agarose-Säule wurde ausgelassen, das Protein nach der Aufreinigung mit 40 g/100 ml Ammoniumsulfat gefällt und das nach Zentrifugation erhaltenen Pellet in 20 mM Hepes pH 6.9, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerin wieder aufgenommen. Diese Lösung wird gegen Aufbewahrungspuffer, dem 2 mM DTT zugesetzt wurde, dialysiert und bei -20°C gelagert. Das so aufgereinigte χ -Protein ist ein Monomer mit einer Molmasse von 16.6 kg/mol, was durch analytische Ultrazentrifugation bestätigt wurde.

2.2.9 Quervernetzungsexperimente

Eine einfache Möglichkeit eine (Selbst-)Interaktion oder die räumliche Nähe zweier Proteine festzustellen ist ein Quervernetzungsexperiment (*Crosslink*). Bei diesem Experiment werden funktionelle Gruppen (z.B. freie Aminogruppen) durch einen bifunktionellen *Crosslinker* kovalent miteinander verbunden. Durch nahezu beliebige Kombinationen aus reaktiven Gruppen und *Spacern* zwischen diesen reaktiven Gruppen kann die Selektivität des *Crosslinks* beeinflusst werden. In den durchgeführten Experimenten wird als Quervernetzungssubstanz Dimethylsuberimidat (DMS, Abbildung 8) verwendet, das in wässriger Lösung selektiv mit den funktionellen Imidoestern die ϵ -Aminogruppen von Lysin-Resten vernetzen kann (Davies und Stark, 1970). Der Crosslink-Abstand beträgt etwa 1.1 nm.

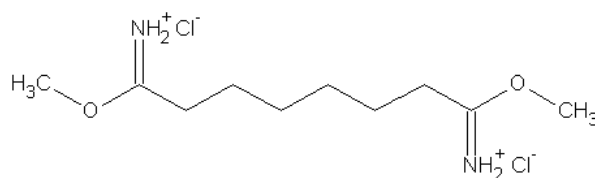


Abbildung 8: Strukturformel des Vernetzungsreagens Dimethylsuberimidat (als Hydrochlorid)

Die Reaktion erfolgt in moderat hohen pH-Werten (pH 8.5) in 0.2 M Triethanolaminpuffer um die Amid-Reaktion gegenüber der Konkurrenzreaktion der Esterhydrolyse zu bevorzugen. Die Endkonzentration im Reaktionsansatz beträgt

3 mg/ml DMS. Die Lösung von DMS in TRA-Puffer wird erst kurz vor Verwendung frisch angesetzt. Die Quervernetzungsreaktion wird wie folgt durchgeführt:

1. Etwa 10 µg Protein wird in TRA-Puffer mit DMS 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Dabei ergibt sich das Gesamtvolumen der Reaktion durch die Vorgaben der Endkonzentration an DMS (3 mg/ml) und der finalen TRA-Konzentration (0.2 M). Typischerweise beträgt das Reaktionsvolumen 100 µl, das sich aus 50 µl DMS-Lösung (6 mg/ml) und 50 µl Protein in TRA-Puffer (0.4 M) zusammensetzt.
2. Nach der 3-stündigen Inkubation wird durch Zugabe eines Reaktionsvolumens (100 µl) 20%-iger TCA-Lösung das Gesamtprotein gefällt (4°C, 10 min) und bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert.
3. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 µl AP/Tris (vgl. 2.2.6) aufgenommen und bei 95°C für 5 min erhitzt.
4. Es folgt die Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel (vgl. 2.2.6)

2.2.10 Immunologischer Proteinnachweis (Western-Blot)

Die in einer SDS-PAAGE (siehe 2.2.6) im Gel nach Größe aufgetrennten Proteine lassen sich elektrophoretisch im Western-Blot-Verfahren auf eine Membran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, durch Verwendung spezifischer Antikörper einzelne Proteine auf der Membran nachzuweisen. Dabei ist die Empfindlichkeit dieses Nachweises bei vollständiger Übertragung der Proteine auf die Membran um etwa eine Größenordnung besser als die Nachweisgrenze von Coomassie-Färbungen im Lämmli-Gel (vgl. 2.2.6). Für den Western-Blot wird zunächst eine SDS-PAAGE mit den zu untersuchenden Proben durchgeführt. Dabei ist es aufgrund der hohen Empfindlichkeit des immunologischen Verfahrens wichtig, das Gel nicht zu überladen. Weiterhin sollte ein vorgefärbter Größenstandard zur späteren Größenbestimmung mit aufgetragen werden (z.B. ein *Rainbowstandard*, siehe 2.1.5). Die Proteine im ungefärbten Gel werden nun im Tank-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wird das SDS-Gel zunächst im Blotpuffer (s.u.) äquilibriert. Die PVDF-Membran wird kurz in Methanol inkubiert und dann auch in Blotpuffer überführt. Die fertige Anordnung des Gels, der PVDF-Membran und der puffergetränkten Blotpapiere in der Apparatur zeigt Abbildung 9:

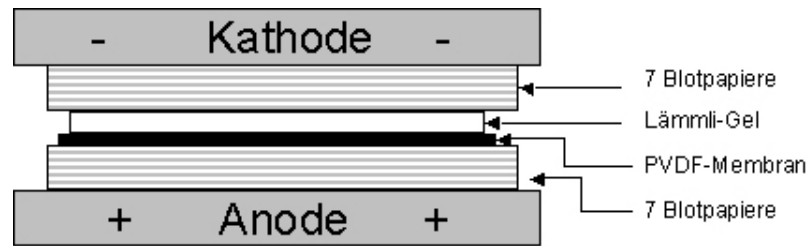


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Blotsandwichs in Seitenansicht.

Das so erhaltene *Blotsandwich* wird hochkant in den mit Blotpuffer (s.u.) gefüllten Tank eingesetzt. Der Blotvorgang dauert bei konstantem Strom von 250 mA etwa 30-45 Minuten. Anschließend wird das *Blotsandwich* wieder vorsichtig zerlegt. Zur Kontrolle der Bloteffizienz kann das Gel wie in 2.2.6 beschrieben mit Coomassie-Lösung gefärbt werden. Die weiteren Arbeiten mit der PVDF-Membran sind:

- Blocken der Membran mit Milchpulver bei Raumtemperatur für 1 Stunde (1% (w/v) Milchpulver in TBS, s.u.)
- Inkubation mit dem 1. Antikörper (z.B. Kaninchen-Anti-*EcoSSB*) über Nacht bei 4°C (1:1000 in TBS/Milchpulver)
- Intensives Waschen (3x 5 min) mit TBST (s.u.) bei Raumtemperatur
- Inkubation mit dem 2. Antikörper (gegen das F_C-Fragment des 1. Antikörpers, z.B. Ziege-Anti-Kaninchen-F_C, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) in TBS/Milchpulver für 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Erneutes gründliches Waschen erst mit Wasser, dann 3x 5 min mit TBST

Die Nachweisreaktion erfolgt über Chemilumineszenz-Detektion oder colorimetrische Detektion. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgt nach Substratumsetzung des CDP-Star (Perkin Elmer Applied Biosystems) durch die am zweiten Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase. Durch Dephosphorylierung entsteht dabei ein metastabiles angeregtes Phenolat-Anion, das unter Aussendung von Licht zerfällt. Die Chemilumineszenz kann mit Röntgenfilmen sehr empfindlich nachgewiesen werden. Für die Chemilumineszenz-Detektion wird zunächst die PVDF-Membran 5 Minuten mit Alkalischem-Phosphatase-Puffer (AP-Puffer, s.u.) gewaschen. Danach wird die Membran auf Frischhaltefolie gelegt und mit dem CDP-Star Reagenz (in AP-Puffer) inkubiert. Nach einigen Minuten wird das Reagenz abgesaugt, die Membran vollständig in Folie eingeschlagen und in der Filmkassette auf dem Röntgenfilm platziert (in der Dunkelkammer). Nach der gewünschten Belichtungszeit wird der Film entnommen und entwickelt. Anschließend an die Chemilumineszenz-Detektion wird zusätzlich die colorimetrische Detektion durchgeführt. Dazu wird die Membran einige Minuten in einer Lösung mit 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und

Nitrotetrazolium-Blau (NBT) in AP-Puffer geschwenkt. Dabei dient das BCIP als Substrat für die alkalische Phosphatase und NBT als Verstärker. Bei der Dephosphorylierung des BCIP entsteht ein wasserunlöslicher Indigofarbstoff. Die Färbung kann zur Vermeidung von unspezifischer Hintergrundfärbung durch einfaches Spülen mit Wasser beendet werden

<u>10x-Blotpuffer</u>	0.25	M	Tris
	1.92	M	Glycin
	0.3%	(w/v)	SDS
<u>TBS</u>	20	mM	Tris pH 7.5
	0.5	M	NaCl
<u>TBST</u>	TBS + 0.05% Tween20		
<u>AP-Puffer</u>	0.1	M	Tris/HCl pH 9.5
	0.1	M	NaCl
	5	mM	MgCl ₂
<u>NBT</u>	50	mg	Nitrobluetetrazolium Salz in 1 ml N,N-Dimethylformamid (4°C, dunkel aufbewahren)
<u>BCIP</u>	50	mg	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat in 1 ml N,N-Dimethylformamid (4°C, dunkel aufbewahren)

2.2.11 Konzentrationsmessungen und UV/Vis-Spektren

Für die Bestimmung von Protein- und DNA-Konzentrationen wird die Absorption der Lösung im Spektralphotometer Jasco UV-560 gegen den entsprechenden Puffer als Referenz gemessen. Für die Messung werden ausschließlich Küvetten aus Quarzglas verwendet. Der genaue Wert der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge ergibt sich aus der dort gemessenen Extinktion abzüglich der bei 320 nm gemessenen Extinktion $E_{320\text{nm}}$ (Streulicht). Die gemessenen Extinktionen sollten bei der gewünschten Wellenlänge im Bereich < 2 liegen.

2.2.12 Dialyse

Für nahezu alle biophysikalischen Experimente zur Charakterisierung von Eigenschaften oder auch zur Durchführung bestimmter Aufreinigungsschritte der zu untersuchenden Probe werden definierte Pufferbedingungen benötigt. Die zur Dialyse verwendeten Visking®-Dialyseschläuche stammen von der Firma Serva und haben eine Ausschlussgrenze (MWCO) von 12000 – 14000 kDa (Protein-Molekulargewicht). Die getrocknet gelieferten Schläuche werden zunächst mit einer Reinigungslösung (2% (w/v) NaHCO₃, 1 mM EDTA) gekocht, mehrfach mit Wasser gespült und dann in der Lager-Lösung (10 mM NaN₃, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) Ethanol) im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung der Schläuche müssen diese intensiv mit Wasser gespült werden. Die Menge des Dialyse-Puffervolumens richtet sich nach dem Volumen der zu dialysierenden Probe, z.B. wird für eine extensive Dialyse von bis zu 15 ml Proteinstammlösung gegen insgesamt 2000 ml Puffer dialysiert, wobei jeweils nach ca. 6-8 Stunden ein Pufferwechsel stattfindet.

2.2.13 Komplementationsexperimente

Anhand von Komplementationsexperimenten lässt sich überprüfen, ob ein bestimmtes Protein das analoge Protein in einem anderen Organismus *in vivo* ersetzen kann. In Bezug auf das SSB-Protein wird meist versucht, das gut charakterisierte EcoSSB in *E.coli* durch andere SSBs zu ersetzen. Dazu wird ein *E.coli* Stamm (RDP268, resistent gegen Kanamycin) nach Porter *et al.* (1990) verwendet, der ein chromosomal deletiertes *ssb*-Gen trägt und nur überleben kann, wenn ein *ssb*-Gen für ein in *E.coli* funktionierendes SSB-Protein auf einem Helferplasmid vorhanden ist. Dieses Kontroll-Helferplasmid trägt in RDP268 das *ssb*-Gen für Wildtyp-EcoSSB (pACYCSSB) und codiert zudem für eine Chloramphenicolresistenz.

Der Ablauf des Komplementationsexperiments gliedert sich wie folgt:

1. Transformation der RDP268-Zellen mit einem Plasmid, in das die für das zu untersuchende SSB-Protein codierende Sequenz kloniert wurde. Dieses neue Plasmid muss einen anderen Selektionsmarker haben als das bereits in RDP268 vorhandene pACYCSSB und einen nicht reprimierten Promotor für das *ssb*-Gen aufweisen, damit eine Expression gewährleistet ist. In diesen Experimenten wird dazu das pSF1-Plasmid verwendet, in dem die EcoSSB-wt-Sequenz durch die Sequenz des zu überprüfenden SSB-Proteins

ersetzt wurde. Das pSF1-Plasmid ist kompatibel zu pACYCSSB und trägt eine Ampicillinresistenz.

2. Die Zellen werden nach Transformation in 4ml LB-Kulturen angezogen, die ausschließlich Kanamycin (Stammresistenz) und Ampicillin (pSF1) enthalten. Es folgen drei weitere Überimpfungen (1 µl Bakterien auf 4 ml LB-Medium) unter gleichen Bedingungen. Bei einer funktionellen Komplementation wird das pACYCSSB nach und nach aus den RDP268 verschwinden, da neben der komplementierten essentiellen Funktion des Wildtyp-*EcoSSBs* für den Erhalt der Selektionsdruck auf pACYCSSB durch Chloramphenicol fehlt.
3. Von der letzten Kultur werden gleiche Zellmengen auf verschiedene LB-Platten ausgestrichen:
 - a) Kanamycin + Ampicillin
 - b) Kanamycin + Ampicillin + Chloramphenicol
4. Von Platte a) werden die dort gewachsenen Klone entweder durch Stempeln oder mit sterilen Zahnstochern auf eine neue Platte b) übertragen. Alle Klone die ausschließlich auf a) und nicht auf b) wachsen werden weiter untersucht.

Schon anhand der Verteilung der Klone lässt sich vermuten, ob das neu eingeführte *ssb*-Gen (in pSF1) das pACYCSSB verdrängen konnte. In diesem Fall sollten auf der Platte b) keine oder nur sehr wenige Klone wachsen. Für einen sicheren Nachweis der vollständigen Verdrängung des Wildtyp-*EcoSSBs* bietet sich eine immunologische Detektion der SSB-Proteine auf einem Western-Blot an (Klone aus Punkt 4., s.o.).

2.3 Biophysikalische Methoden

2.3.1 DNA-Schmelzexperimente

Betrachtet man das Einzelstrang-Doppelstrang-Gleichgewicht eines poly(dA·dT)-Stranges, so sollte sich der Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNA in Anwesenheit von Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen zu niedrigeren Temperaturen hin verschieben, da die SSB-Proteine ssDNA aus diesem Gleichgewicht entfernen und damit den Doppelstrang destabilisieren. Der Übergang zwischen dsDNA und ssDNA lässt sich aufgrund des hyperchromen Effektes gut photometrisch beim Absorptionsmaximum der DNA ($\lambda=260$ nm) beobachten. Die Messungen werden im Zeiss DMR 10 Spektrophotometer durchgeführt. Die Steuerung des Photometers und des Thermostaten erfolgt mit dem im Institut entwickelten Programm „Schmelz2“

(J. Greipel), die Auswertung der Schmelzkurven erfolgt mit dem Programmpaket BPCFit (Kindler, 1997). Aufgrund des niedrigen Schmelzpunktes wird für die Untersuchungen poly(dA·dT) verwendet. Falls nicht anders angegeben, werden folgende Bedingungen und Konzentrationen für das Schmelzexperiment gewählt:

- 38 μ M poly(dA·dT)
- Überschuss an SSB-Protein (2 bis 5-fach über n)
- 900 μ l Gesamtvolumen der Küvette
- Pufferbedingungen: 75 mM NaCl, 20 mM KP_i pH 7.4

Von der Probe wird vor und nach dem Schmelzexperiment im DMR-10 ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Das Schmelzexperiment wird mit einer Heizrate von 20 K/h durchgeführt. Eine reversible Schmelzkurve darf keine Unterschiede zwischen Aufheizphase und Abkühlphase zeigen. Der im Experiment durchlaufene Temperaturbereich liegt zwischen 20°C und 60°C, wobei eventuell früheres Denaturieren des Proteins eine Verkleinerung des Temperaturintervalls erforderlich machen kann. Die Kurven der Aufheiz- und Abkühlphase werden gemittelt. Als Referenz für die Schmelzexperimente dient zum einen das Schmelzverhalten von poly(dA·dT) ohne Zusatz von SSB-Protein und die Schmelzkurve von poly(dA·dT) in Anwesenheit von Wildtyp-*Eco*SSB. Da der Schmelzpunkt stark von den Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen abhängig ist, müssen alle Messungen im gleichen Puffer (75 mM NaCl, 20 mM KP_i) und mit gleichem Überschuss an SSB durchgeführt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

2.3.2 Fluoreszenztitrationen

Bei der Bindung von ssDNA an SSB-Proteine wird die Fluoreszenz der an der Bindung beteiligten Tryptophanreste ($\lambda_{Em}=350$ nm) stark gelöscht. Dieser Effekt ermöglicht es, die Bindung von ssDNA an das SSB in einer statischen Fluoreszenzmessung (Titration) zu verfolgen. Für die Titrationen wird ein Schoeffel RRS1000 Doppel-Monochromator-Spektrofluorimeter verwendet, das mit einer automatischen Titrationseinheit ausgerüstet ist (J. Greipel, Institutsentwicklung). Die Excitationswellenlänge ist für die Beobachtung der Tryptophan-Fluoreszenz $\lambda_{Exc}=295$ nm, die Emission wird beim Emissionsmaximum der Tryptophanreste bei $\lambda_{Em}=350$ nm gemessen. Die Datenaufnahme und Steuerung des Fluorimeters wird mit dem Programm „Ftit_b“ (J. Greipel, Insitutsentwicklung) durchgeführt. Den Aufbau des Fluorimeters zeigt Abbildung 10. Alle Fluoreszenzmessungen werden sofern nicht anders angegeben bei 22°C durchgeführt.

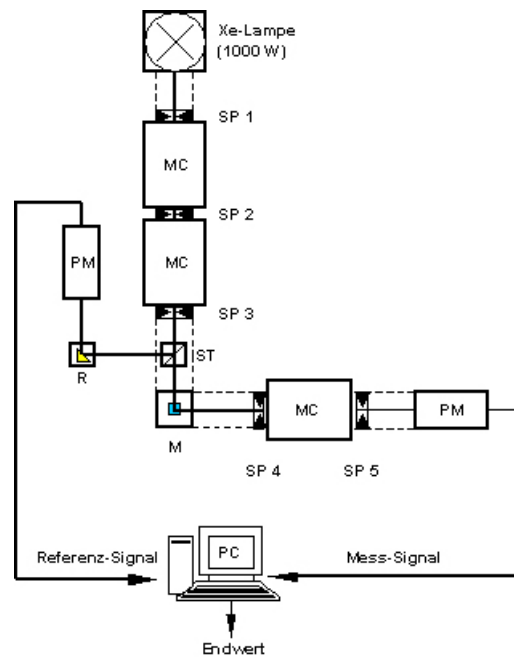


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Schoeffel RRS1000 Doppel-Monochromator-Fluorimeters. Die Küvetten werden über einen thermostatisierbaren Küvettenhalter temperiert, ein eingebauter Magnetrührer unter der Messkuvette ermöglicht, den Küvetteninhalt mittels Mini-Rührfisch zu rühren (für Titrations). (Abkürzungen: SP=Spalt, MC=Monochromator, ST=Strahlteiler, M=Messkuvette, R=Referenzkuvette)

Bei der Titration wird zum SSB-Protein in der Vorlage eine Lösung einzelsträngiger Nukleinsäure (poly(dT) oder poly(rU)) in gleichem Puffer und gleicher SSB-Konzentration wie in der Vorlagelösung zugegeben. Da in diesem Fall der Ligand mit der Matrix titriert wird, spricht man von inverser Titration. Ein typisches Experiment gliedert sich wie folgt:

- Die zuvor abzentrifugierte (13000 rpm, 4°C) SSB-Stammlösung im UV/Vis Absorptionsspektrometer vermessen um deren genaue Konzentration zu bestimmen.
- Aufnahme des Pufferspektrums und Herstellung von 900 µl SSB-Lösung mit der gewünschten Extinktion ($E_{280\text{nm}} = 0.03$) in der gleichen Absorptions-Kuvette. Es folgt eine Kontrollmessung.
- Von den 900 µl werden 600 µl-Aliquot der hergestellten Lösung abgenommen, diese dient als Vorlagelösung für die Titration und wird in eine Fluoreszenzrührkuvette gegeben.
- Mit den restlichen 300 µl in der Absorptions-Kuvette wird ein neues Basislinienspektrum aufgenommen und die berechnete Menge an einzelsträngiger Nukleinsäure für eine Extinktion von $E_{\text{max}} \sim 1.5$ zu den 300 µl

Proteinlösung zugegeben. Die genaue Konzentration ist aus dem Absorptionsspektrum zu errechnen, das nach Zugabe der ssDNA aufgenommen wird. Diese Lösung dient als Titrationslösung und wird in die Zugabespritze der Titrationseinheit des Fluorimeters aufgezogen.

- Die Vorlagelösung in der Fluoreszenzrührküvette wird für einige Zeit im Fluorimeter temperiert und danach die Titration gestartet.

Für die Auswertung der Daten wird das Programm BPCFit (Kindler, 1997) benutzt. Dabei werden zunächst die gemessenen Daten reduziert, d.h. für Messwerte gleicher eingesetzter Verhältnisse wird ein Mittelwert gebildet. Danach erfolgt die Pufferkorrektur der Daten durch Subtraktion der Pufferfluoreszenz. Anschließend werden die Daten normiert, so dass der erste gemessene Punkt die relative Fluoreszenz 1 hat. Die theoretischen Bindungsisothermen für die Bindung von SSB an ssDNA werden iterativ an die gemessenen Daten angepasst. Bei der Bindung von SSB an ssDNA handelt es sich um die Bindung eines mehrzähligen Liganden an ein lineares Gitter. Dabei können bei hohen Ligandenkonzentrationen Lücken auf dem Gitter entstehen, die kleiner als die Bedeckungslänge des SSBs sind. Die thermodynamische Ausarbeitung dieser Bindung nach Schwarz und Watanabe (1983) berücksichtigt die Lückenproblematik, die durch die kooperative Bindung eines mehrzähligen Liganden der Bedeckungslänge n an ein infinites Gitter entsteht. In der Auswertung können die Parameter Assoziationsgleichgewichtskonstante (K_{ass}), Bindungsplatzgröße (n) und Kooperativität (ω) angepasst werden.

$$\frac{[\text{Ligand}]_{\text{gesamt}}}{[\text{Gitter}]_{\text{gesamt}}} = \frac{\theta}{n} + \frac{\omega \cdot (\lambda - 1) \cdot \lambda^n}{K_{\text{Ass}} \cdot [\text{Gitter}]_{\text{gesamt}} \cdot [1 + \omega \cdot (\lambda - 1)]}$$

Dabei bezeichnet θ den Besetzungsgrad des Gitters und K_{Ass} die Bindungskonstante des isolierten Liganden. λ beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass auf einen freien Platz auf dem Gitter ein weiterer freier Platz folgt und ergibt sich aus:

$$\lambda = 1 + \frac{\sqrt{(1 - \beta)^2 + 4 \cdot \omega \cdot \beta} - (1 - \beta)}{2 \cdot \omega} \quad \text{mit} \quad \beta = \frac{\theta}{n \cdot (1 - \theta)}$$

Da die Kooperativität für die Bindung von *Dra*SSB und *Taq*SSB an ssDNA nicht bestimmt wurde, werden die Bindungsisothermen mit der für *Eco*SSB angenommenen moderaten Kooperativität (Greipel *et al.*, 1987, $\omega=150$, konstanter Parameter) ausgewertet und diskutiert.

2.3.3 Stopped-Flow-Kinetiken

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bindung von SSB-Proteinen an einzelsträngige DNA kann in Fluoreszenz-*Stopped-Flow* Experimenten bestimmt werden. Bei der *Stopped-Flow*-Messung werden die beiden Edukte schnell miteinander gemischt. Der Fluss wird nach Füllen der Messküvette schnell gestoppt (*stopped-flow*), dabei dient das Signal einer Stop-Spritze als Triggersignal für den Beginn der Messung. Die in einem solchen Gerät minimal messbaren Reaktionszeiten liegen im Millisekundenbereich, bei einem durchschnittlichen „Alter“ der Lösung in der Küvette von ca. 2 ms bei Beginn der Messung (Totzeit). In einem SSB/ssDNA-Bindungsexperiment wird, wie auch bereits in 2.3.2 beschrieben, die Löschung der Fluoreszenz zur Messung der Reaktion ausgenutzt. Dabei wird bei 295 nm in die Probe eingestrahlt. Da der Beobachtungsweg keinen Monochromator besitzt, wird durch einen geeigneten Filter (z.B. WG320) die Excitationswellenlänge ausgeblendet um die Fluoreszenzemission bei 350 nm zu verfolgen. Den typischen Aufbau einer solchen *Stopped-Flow*-Apparatur zeigt die Abbildung 11:

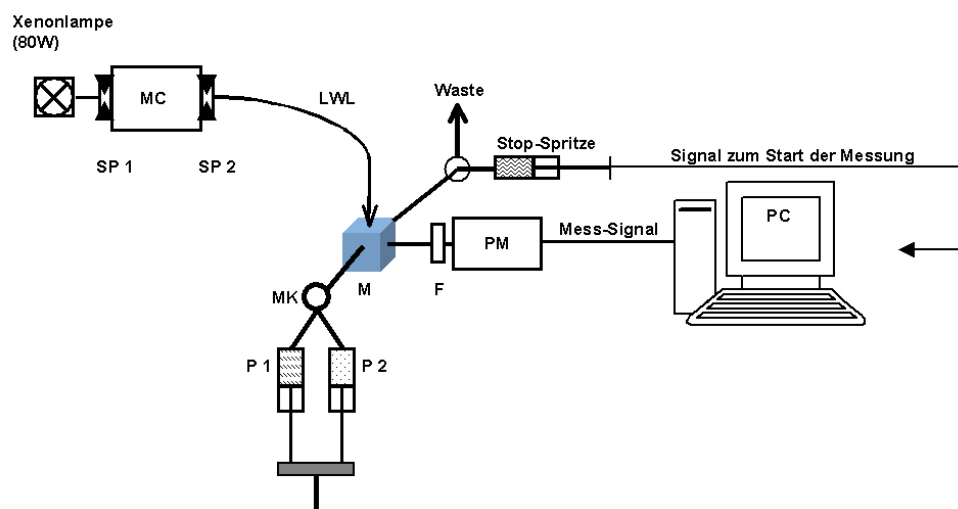


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Stopped-Flow-Gerätes: Die beiden Proben in den Spritzen P1 und P2 werden durch Kolbenvorschub in die Mischkammer (MK) gedrückt und gelangen von dort in die Messküvette (M). Die durch die neue Reaktionsmischung verdrängte Lösung aus der Messküvette wird in die Stop-Spritze gedrückt, die am Anschlag einen Triggerimpuls für den PC auslöst, der die Messung startet. Gemessen wird das durch einen Filter (F) auf einen Photomultiplier treffende Fluoreszenzlicht. Die Excitation erfolgt über eine Hg-Xenon-Hochdrucklampe mit der am Monochromator (MC) ausgewählten Wellenlänge. Das Licht gelangt über einen Lichtwellenleiter (LWL) zur Messküvette.

Die durchgeführten Messungen wurden entweder am *Pi-Star* (Applied Photophysics), dem SF-61 (Hitech Scientific) oder einem modifizierten Durrum-Gibson-Gerät

(Urbanke und Schaper, 1990) durchgeführt. Für die Messungen ist ein vorheriges Entgasen der verwendeten Puffer nötig, da schon kleinste Gasblasen die Messung stören können. Dies ist besonders wichtig wenn mit Puffern gearbeitet wird, die zuvor bei 4°C aufbewahrt wurden.

Die Messungen werden jeweils mehrfach mit einer Konzentration durchgeführt und die Daten anschließend akkumuliert. Die akkumulierten Kurven unterschiedlicher Konzentrationen, aber gleichem molaren Verhältnis werden zusammen ausgewertet. Für die Experimente mit SSB und poly(dT) werden die molaren Verhältnisse so gewählt, das das SSB einen vollständig gesättigten Komplex mit poly(dT) bildet. Die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion als anzupassender Parameter für alle Messungen gleich, während Basislinie und Fluoreszenzfaktoren für jede akkumulierte Kurve individuell angepasst werden. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgt unter Annahme einer initialen Bindungsplatzgröße, der Kooperativität der Bindung und einer anschließenden Umordnung der Moleküle mit einem bereits für SSB angewendeten Bindungsmodell von Urbanke und Schaper (1990).

2.3.4 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen

Eine weitere Möglichkeit Assoziationsgeschwindigkeits- und Assoziationsgleichgewichtskonstanten zu bestimmen ist die Ausnutzung von Oberflächenplasmonresonanz-Effekten. Bei dieser Technik kommt es zu einer Energieübertragung des durch Totalreflektion an einer Glasoberfläche entstehenden austretenden Feldes (*evanescent field*) auf die frei beweglichen Elektronen einer auf dem Glas befindlichen Goldschicht (*surface plasmon resonance*). Diese Energieübertragung lässt sich durch ein deutliches Absinken der Intensität der totalreflektierten Welle beim Totalreflektionswinkel θ erkennen. Dabei ist diese Resonanzbedingung abhängig vom Brechungsindex der Lösung über der Oberfläche im Bereich des austretenden Feldes. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Dicke der Goldschicht kleiner als die Ausdehnung des Feldes ist. Da der Brechungsindex in der Lösung über der Goldschicht in etwa proportional zur Massenkonzentration ist, bewirkt eine Erhöhung der Masse im Volumen des *evanescent fields* eine Änderung des Winkels bei dem die Oberflächenplasmonresonanz auftritt. Messgröße dieser Technik ist also die Änderung des Resonanzwinkels $\Delta\theta$ bzw. indirekt die Änderung der Massenkonzentration (oder auch die Änderung des Brechungsindex) im Bereich des *evanescent fields*, das etwa 500 nm über die Goldschicht hinausreicht. Das

Signal wird als relative Einheit in *Resonance Units* (RU) beschrieben, wobei 1 RU in etwa einer Masse von 1 pg/mm² entspricht.

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bietet es sich also an, ein Protein kovalent im Bereich des *evanescent fields* zu koppeln, während sich das andere Protein (im weiteren bezeichnet als Ligand) in der Lösung befindet. Eine Bindung des Liganden an das Protein muss dann eine Änderung der Massenkonzentration, und damit auch des Resonanzwinkels hervorrufen, die beobachtet werden kann. Damit die Proteine nicht direkt an einer Goldoberfläche immobilisiert werden müssen, werden im allgemeinen Dextrane auf diese Goldschicht gekoppelt, die ihrerseits aktivierte Gruppen zur kovalenten Proteinkopplung tragen (Carboxy-methyl-Gruppen, CM5-Chip, Biacore). Die Kopplung des Proteins erfolgt über die Aminogruppen mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivierung und wird wie in den Herstelleranweisungen des CM5-Chips beschrieben durchgeführt. Freie nicht mit Protein gekoppelte aktivierte Gruppen werden mit Ethanolamin blockiert. Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung der Oberfläche eines SPR-Chips mit am Dextran immobilisierten Proteinen.

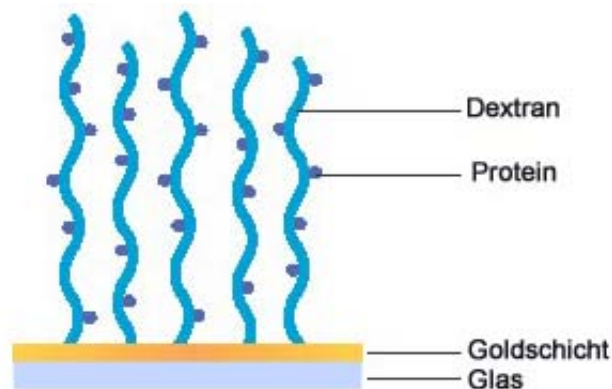


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Oberfläche eines SPR-Chips. Die Dextranketten sind kovalent an die Goldschicht der Chip-Oberfläche gekoppelt. Die Proteine sind kovalent an diese Dextranketten gebunden (Bild: Biacore Advisor Kinetics CDROM, 2001, modifiziert).

Die in den Experimenten verwendeten SPR-Chips haben vier so genannte Flusszellen (FC, *Flowcell*), die jeweils mit vier unterschiedlichen Proteinen gekoppelt werden können. Durch ein steuerbares Flusssystem können verschiedene Flusswege eingestellt werden. Um eventuelle unspezifische Bindung des Liganden an die Matrix mit berücksichtigen zu können, wird eine der Flusszellen (meistens die erste auf dem Chip, bezeichnet als FC1) nicht mit Protein gekoppelt, sondern die aktivierten Dextrane nur mit Ethanolamin abgebunden. Eine solche Zelle bezeichnet

man als *blank*-FC. Bei den Messungen kann die Ligandenlösung nun zuerst über FC1 und dann direkt weiter auf FC2, FC3 und FC4 geleitet werden auf denen die Proteine gekoppelt sind. Der Wert für die unspezifische Bindung an FC1 kann dann von den RU-Signalen an FC2-FC4 subtrahiert werden, um ein korrigiertes Signal zu erhalten. Eine schematische Darstellung der Flusszellen zeigt Abbildung 13.

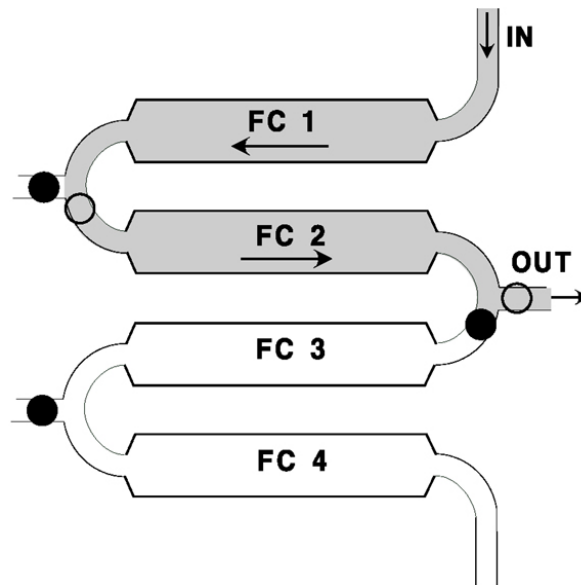


Abbildung 13: Schematische Anordnung der einzelnen Flusszellen (FC) im Flusssystem. Im gezeigten Bild fließt die Lösung zuerst über FC1 und danach über FC2. Auf FC1 wird meist kein Protein gekoppelt, das Signal dieser Zelle wird als Referenz für unspezifische Bindung von den Signalen der folgenden Flusszellen subtrahiert. Die Symbole deuten die Ventilstellung im Flusssystem an (○=offenes Ventil, ●=geschlossenes Ventil). Durch den Einsatz mehrerer Ventile und Zuleitungen können verschiedene Flusszellen miteinander kombiniert werden. (Bild: Biacore 3000 Instrument Handbook, 1999)

Nachdem ein Protein an die Dextranschicht gekoppelt wurde, kann das Bindungsexperiment durchgeführt werden. Dazu wird zunächst Pufferlösung zur Äquilibration, dann der Ligand im gleichen Puffer in einer bestimmten Konzentration und danach wieder Pufferlösung durch die Flusszelle geleitet. Bei Bindung des Liganden erfolgt eine Erhöhung des RU-Signals. Wird wieder auf Puffer zurückgestellt, dissoziiert der Ligand wieder und das Signal geht zurück. An die Dissoziationsphase anschließend erfolgt ein Regenerationsschritt mit 0.1 M Glycin-Puffer pH 9.5 zur Entfernung eventuell noch auf dem Chip vorhandener Liganden. Das Experiment wird mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden wiederholt. Die Reihenfolge der Konzentrationen wird dabei zufällig ausgewählt und automatisch in das Flusssystem injiziert. Den typischen Verlauf als Darstellung des SPR-Signals

als Funktion der Zeit (*Sensogramm*) eines solchen Experimentes für ein System mit beobachtbarer Assoziations- und Dissoziationskinetik zeigt Abbildung 14.

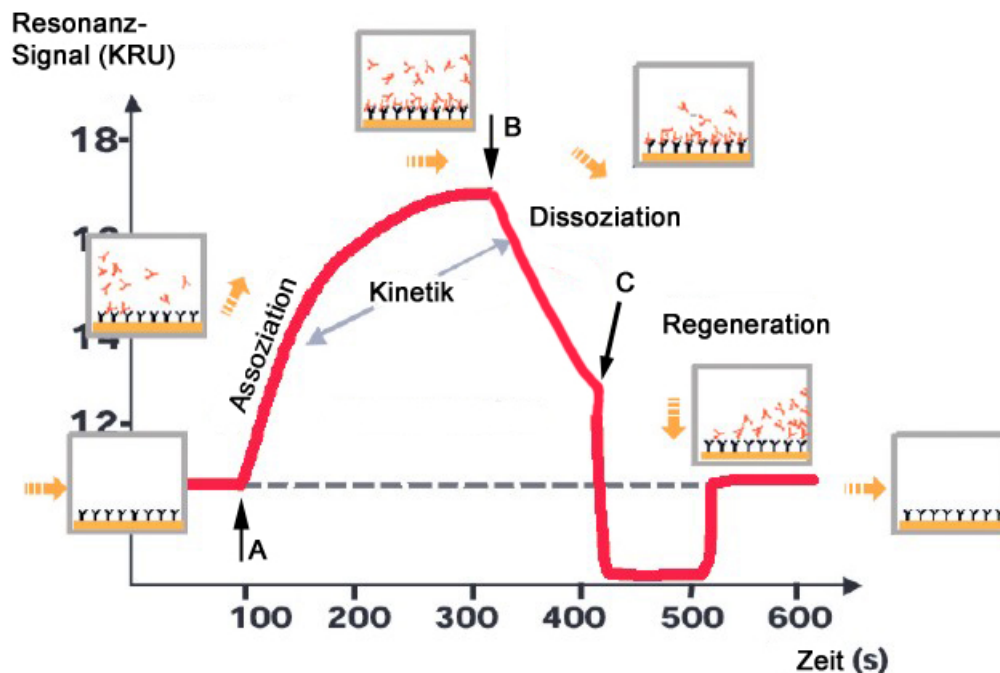


Abbildung 14: Typischer Verlauf eines kinetisch auswertbaren Experiments. Zunächst fließt nur Pufferlösung ohne Ligand durch die Flusszelle. Bei Umschalten auf Ligandenlösung (A) steigt das Signal an. Steigt das Signal nicht weiter an ist ein quasi-Gleichgewichtszustand erreicht. Wird wieder auf Pufferlösung zurückgeschaltet (B), dissoziiert der gebundene Ligand vom Protein ab, das RU-Signal sinkt. Nach Assoziations- und Dissoziationsphase folgt ein Regenerationsschritt (C), der sicherstellt, dass vor der Injektion der nächsten Ligandenkonzentration keine Liganden-Reste des vorherigen Experiments mehr in der Flusszelle vorhanden sind. (Bild: Biacore, modifiziert)

Für den Fall einer sehr schnellen Assoziationsgeschwindigkeit ist der Anstieg des RU-Signals sehr schnell und kann vom Gerät nicht mehr aufgelöst werden. Durch Verringerung der eingesetzten Konzentrationen lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit prinzipiell senken, jedoch führt dies dazu, dass bei schwacher Bindung auch sehr wenig Komplex gebildet wird, der schwierig zu detektieren ist. Dieser Fall tritt ungefähr bei Konzentrationen unterhalb der inversen Bindungskonstante ein. In diesem Fall einer schwachen Bindung und den damit verbundenen schnellen Assoziationen und Dissoziationen bei entsprechend hohen Konzentrationen kann nur die Höhe des RU-Signals im Gleichgewicht (*steady-state*) für jede Ligandenkonzentration bestimmt werden. Die Ermittlung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten aus dem Quotienten der kinetischen

Konstanten ist somit nicht möglich. Da es sich jedoch im Prinzip um eine Titration handelt, lässt sich aus den Höhen der Signale jeder eingesetzten Ligandenkonzentration eine Adsorptionsisotherme erstellen und die Assoziationsgleichgewichtskonstante durch Anpassung von Modellparametern des für die Bindung postulierten Modells bestimmen (Langmuir'sche Adsorptionsisotherme).

Neben der beschriebenen Bestimmung der Bindungskonstanten und der kinetischen Konstanten ist es auch möglich, die Stöchiometrie der Bindung aus den absoluten RU-Signalen der an den Chip gekoppelten Proteine und den RU-Signalen bei Sättigung des Proteins mit Ligand zu bestimmen. Da die RU-Signale proportional zur Masse auf dem Chip sind (s.o.) lässt sich mit Hilfe des Molekulargewichts die Stöchiometrie n der Bindung errechnen, hier am Beispiel für auf dem Chip gebundenes EcoSSB und χ als Ligand in freier Lösung:

$$n = \frac{RU_{\max}}{RU_{\text{EcoSSB auf Chip}}} \cdot \frac{M_{\text{EcoSSB}}}{M_{\chi}}$$

Eine gute Übersicht über die SPR-Technik und deren Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten gibt z.B. Schuck (1997) und Myszka (1997). Problematisch bei der SPR-Technik ist, dass es sich nicht um ein homophasisches System handelt. Weiterhin kommt wie bei allen Immobilisierungen von Proteinen eine Blockierung von Bindungsstellen oder eine partielle Denaturierung in Frage, die nicht überprüfbar ist.

Neben dem bereits beschriebenen CM5-Chip mit aminoreaktiven Gruppen an den Dextranmolekülen, gibt es weitere Chiptypen für andere Kopplungsarten, z.B. einen Streptavidin-Chip (SA-Chip) zur Kopplung biotinylierter Moleküle, der für die Experimente mit einzelsträngiger Nukleinsäure verwendet wird (in diesem Fall biotinyliertes (dT)₆₅, MWG Biotech). Das auf dem SA-Chip an das Dextran kovalent gebundene Streptavidin bindet Biotin mit sehr hoher Affinität von $K_{\text{ass}} \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$ als Resultat einer diffusionskontrollierten Assoziation und einer sehr langsamen Dissoziation (Chilkoti und Stayton, 1995). Die Anwendung der Streptavidin-Biotin Wechselwirkung in SPR-Experimenten beschreibt beispielsweise Nilsson *et al.* (1995)

Alle SPR-Messungen wurden an einem Biacore 3000-Gerät (Biacore™, Schweden) mit den dazu erhältlichen Chips der gleichen Firma entsprechend den Herstelleranweisungen zur Bedienung durchgeführt. Die Flussrate betrug in allen Fällen 10 µl/min bei einer vom Biacore-Gerät thermostatisierten Temperatur von

20°C. Alle verwendeten Puffer wurden zuvor entgast. Die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Daten erfolgte mit den zur Anlage gehörenden Softwarepaketen Biacore 3000 Control und Bia Evaluation.

Das verwendete Biacore 3000-Gerät wurde aufgrund eines Lotteriegewinns auf der Biotechnica-Messe im Jahr 2001 von der Firma Biacore für die durchgeführten Experimente mit allen Materialien (z.B. PC, Software, SPR-Chips usw.) zur Verfügung gestellt.

2.3.5 Analytische Ultrazentrifugation

Die Analytische Ultrazentrifugation (AUC) ist ein Verfahren zur kontinuierlichen (*in situ*) Beobachtung des Verhaltens massebehafteter Teilchen in starken Schwerfeldern. Bei der analytischen Zentrifugation wird durch ein Optik-System der Zentrifuge (Beckman XL-A) die optische Dichte der wässrigen Lösung eines Makromoleküls radial und zeitabhängig gemessen, es ergeben sich die typischen *Scans* als Plot der optischen Dichte, die gegen die Radiusposition aufgetragen wird. Solche *Scans* verschiedener Zeitpunkte zeigen in einem Sedimentationsexperiment z.B. direkt die Sedimentation als Wanderung der Grenzschicht in Richtung des Schwerfeldes und ihre Verbreiterung durch Diffusion. Eine vollständige Beschreibung der Transportvorgänge in sektorförmigen Zellen liefert die Lamm'sche Differentialgleichung (Lamm, 1929), die die Änderung der Konzentration c mit der Zeit t als Funktion der Diffusion (D =Diffusionskoeffizient) und Sedimentation (s =Sedimentationskoeffizient) beschreibt (ω =Winkelgeschwindigkeit, x =Abstand von der Rotorachse):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \frac{1}{x} \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \right) - s \cdot \omega^2 \cdot \left(x \cdot \frac{\partial c}{\partial x} + 2c \right)$$

Prinzipiell unterscheidet man bei der analytischen Ultrazentrifugation zwischen zwei Typen von Experimenten: In Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten wird die Sedimentation der Spezies in einer Lösung über eine relativ große Distanz und bei hohen Drehzahlen beobachtet. Dies dient vorrangig zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten der Spezies. In Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimenten ist die vollständige Sedimentation nicht erwünscht. Wie der Name ausdrückt, wird ein Gleichgewichtszustand zwischen den beiden Transportprozessen angestrebt. Daher sind die in den Sedimentations-Diffusionsexperimenten verwendeten Drehzahlen kleiner als bei den Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten.

Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente

Bei den Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten wird bei relativ hohem Schwerefeld (bis zu ~200000-fache Erdbeschleunigung) die Geschwindigkeit der Sedimentation der Teilchen in der Lösung verfolgt. Die Experimente müssen in sektorförmigen Zellen durchgeführt werden, da die Moleküle nicht durch Stöße mit der Wand der Zelle beeinträchtigt werden sollen. Die Probe befindet sich dabei in einem Sektor einer Doppel-Sektorzelle, in dem anderen befindet sich eine Pufferreferenz. Die Geschwindigkeit v der Sedimentation ergibt sich aus der Svedberg-Gleichung:

$$v = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f} \cdot \omega^2 \cdot r = s \cdot \omega^2 \cdot r \quad \text{bzw.} \quad s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A \cdot f}$$

$\bar{v}$ = partielles spez. Volumen, f = Reibungskoeffizient, ρ = Dichte

Das partielle spezifische Volumen ergibt sich näherungsweise anteilig aus den spezifischen Volumina der Aminosäuren (Durchschlag und Jaenicke, 1982; Laue *et al.*, 1992). Der Sedimentationskoeffizient s (Einheit 1 S = 1 Svedberg = 10^{-13} s) ergibt sich aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht bei der Zentrifugation. Diese Grenzschicht ist durch Diffusion verbreitert. Betrachtet man eine mittlere Grenzschichtposition $\bar{x}$ so ergibt sich die Sedimentationskonstante aus:

$$s = \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{\partial \ln \bar{x}}{\partial t}$$

Da der Sedimentationskoeffizient eines Makromoleküls von der Dichte und der Viskosität der Lösung abhängig ist, müssen die bei der Temperatur (Temp.) im Puffer gemessenen s -Werte $s_{\text{Temp.,Puffer}}$ auf standardisierte Bedingungen (Wasser, 20°C) umgerechnet werden. Eine Übersicht der Umrechnungen gibt z.B. Lebowitz *et al.* (2002):

$$s_{20^\circ\text{C}, \text{Wasser}} = s_{\text{Temp.,Puffer}} \cdot \frac{\eta_{\text{Temp.,Puffer}}}{\eta_{20^\circ\text{C}, \text{Wasser}}} \cdot \frac{1 - \bar{v}\rho_{20^\circ\text{C}, \text{Wasser}}}{1 - \bar{v}\rho_{\text{Temp.,Puffer}}}$$

Durch Analyse der Diffusions-Verbreiterung der Grenzschicht im Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit Hilfe der Lamm'schen Differentialgleichung lässt sich auch die Molmasse der in der Grenzschicht sedimentierenden Teilchen bestimmen. Diese Bestimmung ist jedoch sehr anfällig für Inhomogenitäten und niedermolekulare Verunreinigungen in der Probenlösung, die die Grenzschicht schneller verbreitern. Daher sind die durch Lamm-Auswertung erhaltenen Molmassen immer etwas niedriger als die tatsächliche Molmasse.

Ein wichtiger Faktor für die Abschätzung der Form des sedimentierenden Teilchens ist der Reibungskoeffizient. Das Verhältnis des gemessenen Reibungskoeffizienten und dem einer Kugel gleicher Masse ergibt den Perrin-Faktor f/f_0 :

$$\frac{f_{\text{gemessen}}}{f_{\text{Kugel}}} = \frac{f_{\text{gemessen}}}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \sqrt[3]{\frac{4 \cdot \pi \cdot N_A}{3 \cdot \bar{v} \cdot M}}$$

Da in der Analytischen Ultrazentrifuge keine Ausrichtung der Teilchen stattfinden sollte, hat eine Kugelform den geringsten Reibungskoeffizienten. Somit nimmt der Perrin-Faktor für eine Kugel den Wert $f/f_0=1$ an, Formen die von der Kugelgestalt abweichen haben Perrin-Faktoren $f/f_0 > 1$.

Erklärt man rein formal die Verbreiterung der Grenzschicht nicht als durch Diffusion hervorgerufen, sondern durch die Anwesenheit verschiedener Spezies, die ihrerseits keine Diffusionsverbreiterung der Grenzschicht zeigen, so ergibt sich die gemessene Grenzschicht als Summe der aller Subspezies. Wird die Konzentration in der Zelle zu verschiedenen Zeiten und an verschiedenen Orten $c(x,t)$ betrachtet, ergibt sich für ein in der Zeit t vom Meniskus (x_m) zum Ort x gewandertes Teilchen ein Sedimentationskoeffizient nach Gralén und Lagermalm (1952) zu:

$$s = \frac{\ln\left(\frac{x}{x_m}\right)}{\int_0^t \omega^2 dt'}$$

Korrigiert man für die radiale Verdünnung in der sektorförmigen Zelle ergibt sich aus der $c(x,t)$ -Verteilung eine $p(s)$ -Verteilung:

$$p(s) = c \left(\frac{\ln\left(\frac{x}{x_m}\right)}{\int_0^t \omega^2 dt'} \right) \cdot \left(\frac{x}{x_m} \right)^2$$

Diese Parametrisierung berechnet eine kumulative Verteilung der Sedimentationskoeffizienten. Zur übersichtlicheren Darstellung wird die Verteilungsfunktion $dp(s)/ds$ verwendet.

Eine weitere Möglichkeit eine Verteilung von Sedimentationskoeffizienten aus einem gegebenen Satz von *Scans* eines Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments zu erhalten, bietet das Programm Sedfit von P.Schuck (Schuck, 2000). Die in diesem Programm errechnete differentielle Verteilung korrigiert durch Diffusion erzeugte Effekte in der Verbreiterung der sedimentierenden Grenzschicht. Die Methode

basiert auf direkter Modellierung der Form der Grenzschicht (*direct boundary modeling*) durch eine Verteilung von Lamm-Funktionen:

$$a(r,t) = \int c(s)\Phi(s,D(s),r,t)ds + \varepsilon$$

Dabei repräsentieren $a(r,t)$ die beobachteten Daten der Sedimentation und $c(s)$ die die Konzentration von Spezies mit Sedimentationskoeffizienten zwischen s und $s+ds$. $\Phi(s,D(s),r,t)$ bezeichnet dabei die durch numerische Integration erhaltene Lösung der Lamm'schen Differentialgleichung für die Spezies Φ (Schuck, 2000). Dabei kann das Programmpaket Sedfit beim Fitten der theoretischen Daten an die Messwerte auch einen gegebenen Perrin-Faktor anpassen. Die Anwendung der Lamm'schen Differentialgleichung ermöglicht es erstmals die durch Diffusion verfälschten Peaks einer $c(s)$ -Verteilung adäquat zu korrigieren. Die so erhaltene $c(s)$ -Verteilung hat für die diskreten Spezies daher schmalere Peaks als die Gralén-Lagermalm-Verteilung die von vielen verschiedenen Spezies ohne Diffusionsverbreiterung ausgeht.

Bestimmung von Bindungskonstanten

Im Fall zweier interagierender Spezies, z.B. Protein P und Ligand L (*EcoSSB* und χ) im chemischen Gleichgewicht $P+L \rightleftharpoons PL_n$ ergibt sich in einem Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment folgendes Bild: Der gebildete Komplex PL_n sedimentiert zusammen mit P in einer gemeinsamen Grenzschicht in Gegenwart einer konstanten Konzentration freien Liganden L (Krauss *et al.*, 1975). Das dabei zu beobachtende Sedimentationsprofil ist als Ergebnis einer Simulation für ein Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit *EcoSSB* und einem Überschuss χ in Abbildung 15 exemplarisch dargestellt.

Für den Fall einer schnellen Reaktion (Relaxationszeit < 20 s) im Verhältnis zur Sedimentationsgeschwindigkeit sedimentieren alle Spezies *EcoSSB*/ χ und auch freies *EcoSSB* in einer einzelnen Grenzschicht in Gegenwart einer konstanten Konzentration an χ (Urbanke *et al.*, 1980; Machner *et al.*, 2001; Witte, 2001). Dabei unterscheiden sich jedoch alle diese Spezies im Diffusionskoeffizienten und in der Sedimentationskonstante. Eine Möglichkeit die Absorptionen der beiden Grenzschichten zu bestimmen bietet die Anpassung einer Summe aus Gaußfunktionen an die Sedimentationsprofile, welche zwar die Diffusionsverbreiterung der Grenzschichten nicht exakt wieder gibt, aber die Plateaukonzentrationen gut beschreibt (z.B. Philo, 1997).

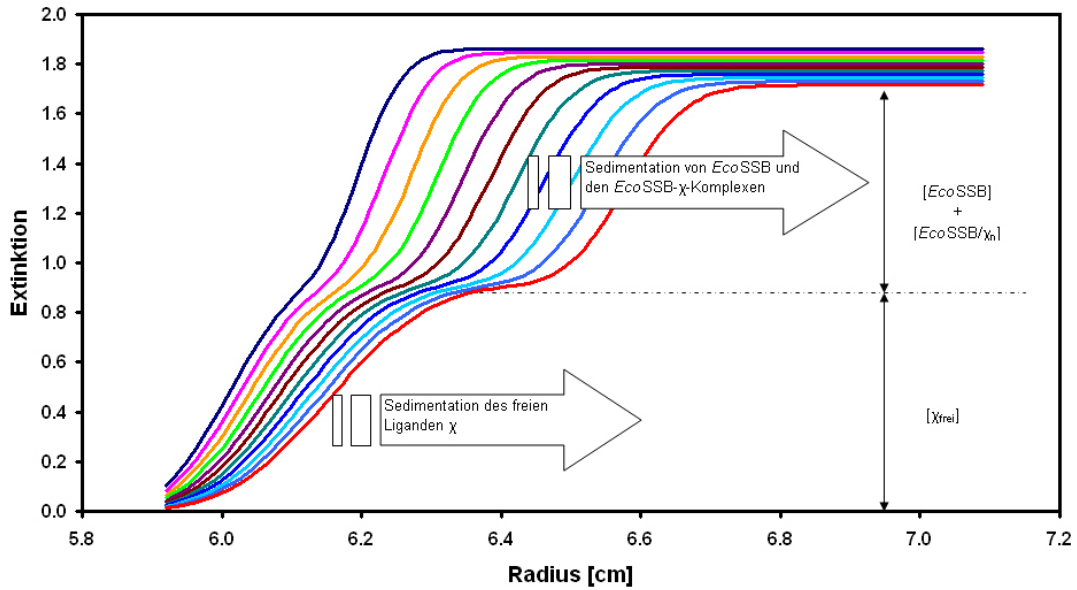


Abbildung 15: Mit dem Programm BPCFit erzeugte Lamm-Simulation der Sedimentation zweier Spezies am Beispiel von EcoSSB und χ . (Molmassen: 16 kg/mol (χ) und 108 kg/mol ($\sim$ EcoSSB/ χ_2 -Komplex), Sedimentationskoeffizienten $s_{\chi}=2$ S, $s_{\text{Komplex}}=5$ S). Der Komplex aus EcoSSB und χ sedimentiert in Gegenwart des freien Liganden χ .

Zur Bestimmung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten kann man die Sedimentation des Komplexes in Gegenwart des freien Liganden in einer Titration ausnutzen. Dabei werden verschiedene Verhältnisse Matrix:Ligand in einem Sedimentationsexperiment zentrifugiert und die Plateauhöhen der einzelnen Grenzsichten in den gemessenen Scans durch Anpassung der Gaußfunktionen errechnet. Werden diese für jeden Scan ermittelten Konzentrationen auf die Konzentrationen am Meniskus zum Zeitpunkt $t=0$ zurückgerechnet, lässt sich aus den freien Konzentrationen des Liganden für jedes eingesetzte Verhältnis auf die gebundene Konzentration zurückrechnen. Für die Reaktion ergibt sich die Gesamtaborption der Lösung $A(x,t)$ durch die anteiligen Absorptionen bei Beginn des Experiments $A(0)$ der durch Gaußfunktionen beschriebenen Spezies A_{slow} und A_{fast} :

$$A(x,t) = \frac{A_{\text{slow}}(0) \cdot e^{-2 \cdot s_{\text{slow}} \cdot \omega^2 \cdot t}}{\sigma_{\text{slow}}(t) \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{y - x_m \cdot e^{-2 \cdot s_{\text{slow}} \cdot \omega^2 \cdot t}}{\sigma_{\text{slow}}(t)} \right)^2} dy + \frac{A_{\text{fast}}(0) \cdot e^{-2 \cdot s_{\text{fast}} \cdot \omega^2 \cdot t}}{\sigma_{\text{fast}}(t) \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{y - x_m \cdot e^{-2 \cdot s_{\text{fast}} \cdot \omega^2 \cdot t}}{\sigma_{\text{fast}}(t)} \right)^2} dy$$

Dabei sind s_{slow} und s_{fast} die Sedimentationskoeffizienten der beiden Grenzsichten. Sowohl die Sedimentationskoeffizienten als auch die Absorptionen der Spezies bei $t=0$ gelten für alle Scans und werden durch *global fit* bestimmt. Die Breiten σ der Gaußterme werden für jeden Scan extra angepasst (lokaler Parameter).

Die aus den Gaußfunktionen ermittelten Absorptionen der Grenzschichten zu Beginn des Experiments werden mit der bekannten Gesamtaborption der eingesetzten Komponenten verglichen. Die von der analytischen Ultrazentrifuge gemessenen Absorptionswerte sind nicht absolut, daher müssen die durch Anpassung der Gaußfunktionen ermittelten Absorptionen normiert werden. Da die eingesetzte Gesamtaborption der Komponenten vor Beginn des Experiments bekannt ist, ist eine Normierung der Absorptionen aus der analytischen Ultrazentrifuge auf reale Absorptionen möglich. Die durch Anpassung der Summe der Gaußfunktionen erhaltenen Absorptionen $A_{\text{slow}}(0)$ und $A_{\text{fast}}(0)$ werden mit der bekannten Gesamtaborption (A_{total}), die sich aus den theoretischen Absorptionen zusammensetzt ($A_{\text{total}} = A_{\text{P, eingesetzt}} + A_{\text{L, eingesetzt}}$), normiert und ergeben die Werte A^{norm} für die langsame und schnelle Grenzschicht:

$$A_{\text{slow}}^{\text{norm}} = \frac{A_{\text{slow}}}{A_{\text{slow}} + A_{\text{fast}}} \cdot A_{\text{total}} \quad \text{und} \quad A_{\text{fast}}^{\text{norm}} = \frac{A_{\text{fast}}}{A_{\text{slow}} + A_{\text{fast}}} \cdot A_{\text{total}}$$

Aus der mit dem Extinktionskoeffizienten ε_{L} berechneten Konzentration des freien Liganden $[L]_{\text{frei}}$ kann bei Kenntnis der im Experiment eingesetzten Konzentration die Menge an gebundenem Liganden (bei Beginn des Experiments) berechnet werden:

$$[L]_{\text{gebunden}} = [L]_{\text{eingesetzt}} - [L]_{\text{frei}}$$

Mit den so erhaltenen Konzentrationen lässt sich eine Bindungsisotherme als Plot der bei unterschiedlichen eingesetzten Verhältnissen erhaltenen Werte $[L]_{\text{gebunden}}/[P]_{\text{total}}$ gegen $[L]_{\text{eingesetzt}}/[B]_{\text{eingesetzt}}$ darstellen. Die Isotherme wird durch eine theoretische Kurve beschrieben:

$$\frac{[L]_{\text{gebunden}}}{[P]_{\text{total}}} = \frac{n \cdot K_{\text{Ass}} \cdot [L]_{\text{frei}}}{1 + K_{\text{Ass}} \cdot [L]_{\text{frei}}}$$

Die theoretische Kurve wird durch Variation der Parameter Assoziationsgleichgewichtskonstante K_{Ass} und Stöchiometrie n an die Messwerte angepasst (Machner *et al.*, 2001; Witte, 2001).

Die Absorption wird bei allen Experimenten in der Analytischen Ultrazentrifuge zusätzlich bei der Wellenlänge $\lambda = 220 \text{ nm}$ gemessen, da die eingesetzten Konzentrationen des EcoSSB zu klein sind um verlässlich bei 280 nm gemessen werden zu können.

Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimente

Im Gegensatz zu den Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten wird bei den Gleichgewichtsexperimenten bei geringeren Drehzahlen gearbeitet, da ein Gleichgewichtszustand zwischen Sedimentation und Diffusion in der Zelle erreicht werden soll. Sowohl aus der Gleichgewichtsbedingung $dp/dx=0$, als auch aus expliziten Lösung der Lamm'schen Differentialgleichung für $dc/dt=0$, ergibt sich ein exponentieller Gradient:

$$\frac{\partial \ln c}{\partial x^2} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{2RT} \cdot \omega^2$$

Da die weiteren Parameter wie das partielle spezifische Volumen ($\bar{v}$) die Temperatur (T) und die Dichte der Lösung (ρ) bekannt sind, kann die Molmasse durch Anpassung einer theoretischen Kurve an die gemessenen Werte errechnet werden.

Bei der praktischen Durchführung werden dabei die Proben in 6-Kanal-Zellen (3x Probe, 3x Puffer) bei relativ geringen Drehzahlen in der analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Einstellung des Gleichgewichtes in der Zelle wird durch scannen im Stundenabstand verfolgt. Der Gleichgewichtszustand gilt als erreicht, wenn sich die gemessenen Gradienten (gemessen im Abstand mehrerer Stunden) nicht mehr unterscheiden. Nach Einstellung des Gleichgewichtes kann auf eine höhere Drehzahl des Rotors beschleunigt werden, um bei Bedarf auch bei dieser höheren Drehzahl die Einstellung des Gleichgewichtszustandes abzuwarten. Nachdem bei allen gewünschten Geschwindigkeiten die Gleichgewichtsgradienten gescannt wurden, muss noch die Pufferabsorption als Basislinie gemessen werden. Dazu wird die Zentrifuge auf 44000 rpm beschleunigt um die Moleküle in den Zellen zu sedimentieren. Nach einigen Stunden wird wieder langsam auf die Geschwindigkeiten abgebremst, bei denen die Gleichgewichts-Scans aufgenommen wurden um bei diesen Geschwindigkeiten die Basislinien aufzunehmen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm BPCFit (Kindler, 1997) und besteht aus Subtraktion der Basislinie, Akkumulation der Scans für die die Gleichgewichtsbedingung erfüllt ist und der iterativen Anpassung eines theoretischen Modells and die gemessenen Daten.

Durch die Bestimmung der Molmasse aus Gleichgewichtsexperimenten lassen sich auch Denaturierungsexperimente mit quantitativer Bestimmung der Denaturierungsenthalpie durchführen, die Aussage über die Stabilität eines oligomeren Proteins gibt. Dazu werden Gleichgewichtsläufe durchgeführt, in denen

unterschiedliche Konzentrationen eines denaturierenden Agens (meistens Guanidiniumchlorid) anwesend sind. Zerfällt bei dieser Denaturierung z.B. ein SSB-Dimer mit steigenden Konzentrationen an Guanidiniumchlorid in seine Untereinheiten, zeigt die Kurve der apparenten Molmasse gegen die Guanidiniumchloridkonzentration aufgetragen einen Übergangsbereich zwischen der Molmasse des Dimers zur Molmasse des Monomers. Die Auswertung des Gradienten erfolgt dabei unter der Annahme, dass nur eine Spezies vorhanden ist, es werden also apparente Molmassen im Übergangsbereich bestimmt. In diesem Übergangsbereich lässt sich unter der Annahme, dass die apparente Molmasse in einem linearen Zusammenhang mit dem Dissoziationsgrad steht, durch Bestimmung der anteiligen Konzentrationen von Dimer und Monomer für jede Guanidiniumchloridkonzentration ein K_{Ass} der Entfaltung bestimmen. K_{Ass} ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz zu $K_{\text{Ass}} = [\text{Dimer}_{\text{gefaltet}}] / [\text{Monomer}_{\text{ungefaltet}}]^2$. Mit Hilfe des so erhaltenen K_{Ass} lässt sich mit $\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K_{\text{Ass}})$ eine Denaturierungsenthalpien für die jeweilige Konzentration des denaturierenden Stoffes ($\Delta G^{0, \text{GuaHCl}}$) errechnen. Dabei gilt für diese Bestimmung von K_{Ass} der Oligomerisierung, dass es sich um einen Alles-oder-Nichts Übergang zwischen gefaltetem Dimer und ungefaltetem Monomer ohne Zwischenzustände handelt ($\text{Dimer}_{\text{gefaltet}} \rightleftharpoons \text{Monomer}_{\text{ungefaltet}}$). Natürlich sind die so bestimmten Werte für die anteiligen Konzentrationen von Monomer und Dimer nur Näherungen. Trägt man die so ermittelten $\Delta G^{0, \text{GuaHCl}}$ gegen Guanidiniumchlorid-Konzentrationen auf, so lässt sich aus der linearen Extrapolation der ΔG^0 -Werte gegen $[\text{GuaHCl}] = 0$ der Wert für die Denaturierungsenthalpie in Wasser $\Delta G^{0,0}$ bestimmen.

Für eine genauere Analyse müssen die Gleichgewichtsgradienten bei verschiedenen Geschwindigkeiten und unterschiedlichen Konzentrationen Guanidiniumchlorid und Protein in einer gleichzeitigen Anpassung durch ein Modell gefittet werden. Dabei ist zudem zu berücksichtigen, dass besonders bei höheren Konzentrationen des denaturierenden Agens die apparente Protein-Molmasse durch Bindung von Guanidiniumchlorid an das Protein erhöht wird. Eine solche Prozedur des gleichzeitigen Auswertens verschiedener Datensätze mit gemeinsamen aber auch für jeden Datensatz individuell angepassten Parametern wird als *global-fit* bezeichnet.

2.3.6 Proteinkristallisation

In Zusammenarbeit mit Dr. Roman Fedorov soll versucht werden, die dreidimensionale Struktur von SSB und SSB- χ -Komplexen durch Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen. Für die theoretischen Grundlagen zur Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen empfehlen sich Lehrbücher wie Rhodes (2000) oder van Holde *et al.* (1998). Die Grundvoraussetzung für die Röntgenkristallographie ist natürlich das Vorhandensein geeigneter Kristalle. Die Versuche Proteine zu kristallisieren gleichen im Gegensatz zur Herstellung von Kristallen kleiner anorganischer Verbindungen eher einer Art Empirie denn einer gezielten Technik. Kristalle bilden sich aus Lösungen, wenn die Konzentration des Moleküls die Löslichkeit überschreitet. Zunächst bilden sich dabei Nukleationskeime, an die sich weitere Moleküle während der Wachstumsphase anlagern. Wird die Löslichkeit des Moleküls sehr schnell überschritten, bilden sich viele kleine Kristallisationskeime und ein amorpher Niederschlag entsteht. Für die röntgenkristallographische Analyse werden jedoch möglichst große Kristalle benötigt. Dazu ist ein extrem langsames Annähern an die Löslichkeitsgrenze nötig, um wenige Kristallisationskeime zu erzeugen, die dann durch Anlagerung weitere Moleküle aus der Lösung zu größeren Kristallen heranwachsen.

Für diese extrem langsamen Prozesse werden derzeit ausschließlich Dampfdiffusionsmethoden angewendet. Dabei wird die zu kristallisierende Proteinlösung in einem abgeschlossenen Raum in Gegenwart einer Lösung mit präzipitierenden Substanzen gebracht. Dabei wird die Proteinlösung zunächst in einem abgetrennten Bereich der Kristallisationskammer mit dem gleichen Volumen an Präzipitationslösung versetzt. Im großen Volumen des Reservoir-Bereichs befindet sich nur die Präzipitationslösung. Da die Konzentration der Substanzen in der Reservoirlösung größer ist, als in dem sehr kleinen Volumen mit der Proteinlösung, findet gerichtete Diffusion der Wassermoleküle durch die Dampfphase statt. Dadurch steigt die Konzentration aller Stoffe in der Proteinlösung nach und nach, während die Konzentration des volumenmäßig viel größeren Reservoirs nahezu gleich bleibt. Bei geeigneten Präzipitanten, Temperaturen und evtl. anderen Additiven bilden sich im Idealfall nur wenige Kristallisationskeime, die zu verwertbaren (Ein-)Kristallen heranwachsen. Für die Technik der Dampfdiffusion kommen zwei Geometrien zum Einsatz, zum einen die „*sitting drop*“-Technik, bei der die Proteinlösung auf einer Erhöhung über der Reservoir-Lösung sitzt, und die

„*hanging drop*“-Technik, bei der die Proteinlösung in einem Tropfen über der Reservoirolösung an dem Deckglas der Kammer hängt (Abbildung 16).

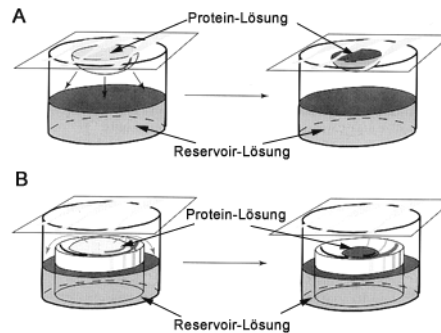


Abbildung 16: *Hanging drop (A) und sitting drop (B) Geometrien zur Kristallisation von Proteinen. In der Protein-Lösung ist die Konzentration an präzipitierenden Zusätzen kleiner als in der Reservoirolösung. Dadurch ist der Dampfdruck des Wassers der Reservoirolösung kleiner als der der Proteinlösung und daher findet eine Wasserdiffusion über die Dampfphase von der Proteinlösung zur Reservoirolösung statt, die zur Konzentration der Proteinlösung führt. (modifiziertes Bild aus van Holde et al. (1998))*

Das Wachstum von einigen wenigen Einkristallen ist jedoch nicht der Regelfall und eher die Ausnahme, da die Aussage welches Protein unter welchen Bedingungen und welchen Präzipitanten Kristalle bildet nicht exakt vorhersagbar ist. Die allermeisten Bedingungen erzeugen keine Kristalle oder präzipitieren das Protein amorph, auch Denaturierung und so genannte Ölphasen kommen vor. Aufgrund der schwierigen Vorhersehbarkeit wird für die Kristallisation ein *Screening*-Verfahren angewendet. Dabei werden meist unterschiedliche Proteinkonzentrationen mit vielen verschiedenen Präzipitanten bei verschiedenen pH-Werten, Salzkonzentrationen etc. gleichzeitig in einem Kristallisations-Assay getestet. Für dieses Verfahren stehen kommerzielle Kits von einigen Firmen (z.B. Jena Biosciences, Hampton Research) zur Verfügung, die in so genannten 96-well Platten durchgeführt werden. Die Verwendung dieser Kits ermöglicht die Abdeckung eines relativ großen Bereiches an Bedingungen. In weiteren Schritten werden dann die Bedingungen, welche Kristallbildungen zeigen bewertet und neue feiner abgestufte *Screenings* mit den so erhaltenen Bedingungen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Wechselwirkung der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III mit *EcoSSB*

3.1.1 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der Interaktion zweier Proteine hat der entstehende Komplex eine größere Masse, und damit auch meist einen größeren Sedimentationskoeffizienten als jede der einzelnen Spezies. Das macht Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge hervorragend geeignet für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Im Falle der Bindung von *EcoSSB* ($s_{20,w}=4.3$ S) und χ ($s_{20,w}=1.8$ S) sollten sich daher in einem gemeinsamen Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit einem Überschuss an χ -Protein zwei Grenzschichten beobachten lassen: Eine langsame Grenzschicht, die freies χ repräsentiert, und eine schnelle Grenzschicht bestehend aus *EcoSSB* und *EcoSSB*/ χ Komplexen, deren s-Wert größer ist, als der des *EcoSSB*. Dabei sedimentieren im Fall einer schnellen Reaktion alle Spezies *EcoSSB*/ χ_n und auch freies *EcoSSB* in einer gemeinsamen Grenzschicht (Krauss *et al.*, 1975; Machner *et al.*, 2001). Die gemessenen Konzentrationsverläufe (*Scans*) eines solchen Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments mit *EcoSSB* und einem Überschuss χ zeigt Abbildung 17.

Aus den so erhaltenen Datensätzen wird eine Verteilung der Sedimentationskoeffizienten (*c(s)*-Verteilung) mit dem Programm Sedfit (Schuck, 2000) berechnet (vgl. 2.3.5). Abbildung 18 zeigt die *c(s)*-Verteilung für ein Sedimentationsexperiment von 2.5 μ M *EcoSSB* in An- und Abwesenheit von 20 μ M χ . Der Peak des *EcoSSB* bei 3.9 S wird in Gegenwart von χ zu höheren s-Werten verschoben (4.9 S), dies ist ein eindeutiges Indiz für die Bildung von *EcoSSB*/ χ -Komplexen. In einer *c(s)*-Verteilung ist die Fläche unter einem Peak proportional zur Absorption der jeweiligen Spezies zu Beginn der Zentrifugation. In Gegenwart von χ sedimentiert also mehr Protein in der schnellen Grenzschicht als im Fall von *EcoSSB* alleine (vgl. Abbildung 18). Da die eingesetzte Menge *EcoSSB* in beiden Fällen gleich groß ist, kann diese Zunahme nur durch Bindung von χ an SSB erklärt werden.

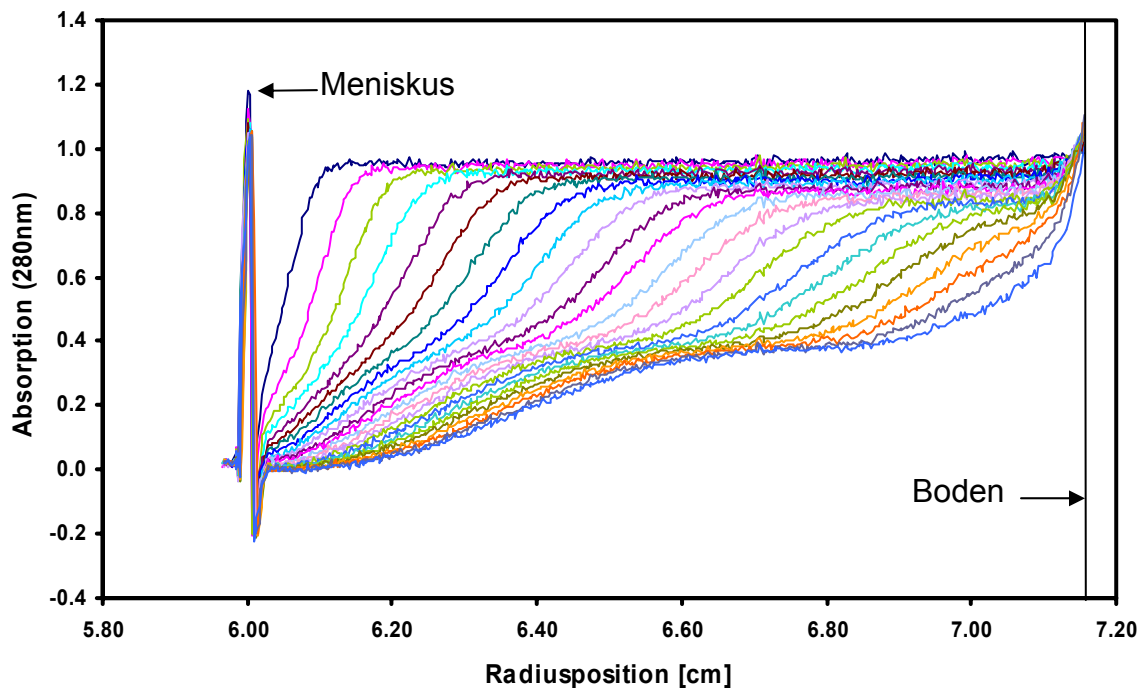


Abbildung 17: Sedimentation von $2.5 \mu\text{M}$ EcoSSB-wt in Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ χ in 0.3 M NaCl , 20 mM KP_i pH 7.4. Die Scans (farbig) zeigen die Absorption in der Zelle zu verschiedenen Zeiten (Abstand zwischen den Scans ca. 8.5 min, Beckman XL-A, Rotor An-50Ti, 50000rpm, 20°C).

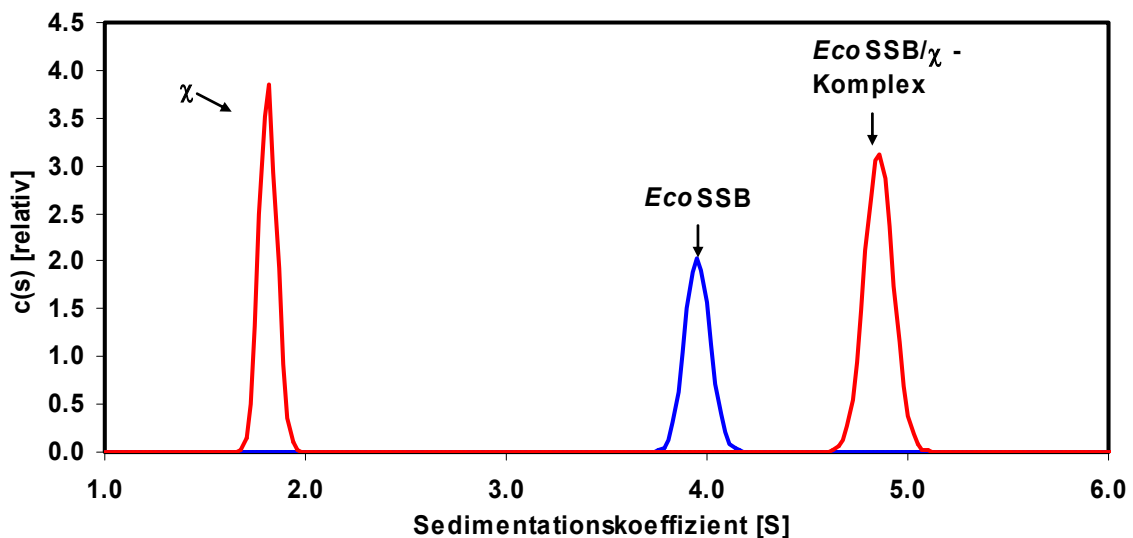


Abbildung 18: Verteilung der Sedimentationskoeffizienten für die Sedimentation von $2.5 \mu\text{M}$ Wildtyp EcoSSB (—) und $2.5 \mu\text{M}$ Wildtyp EcoSSB in Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ χ (—, vgl. Abbildung 17) in 0.3 M NaCl , 20 mM KP_i pH 7.4 (Beckman XL-A, Rotor An-50Ti, 50000rpm, 20°C , ausgewertet mit $c(s)$ -Modell in Sedfit (vgl. 2.3.5), s -Werte nicht auf $s_{20,w}$ korrigiert).

In einem entsprechenden Experiment mit der Mutante *EcoSSB* Q152*, der die letzten 26 Aminosäuren von *EcoSSB* fehlen, ist in der *c(s)*-Verteilung keine Verschiebung des *s*-Wertes der schnelleren Grenzschicht zu sehen (siehe Abbildung 19).

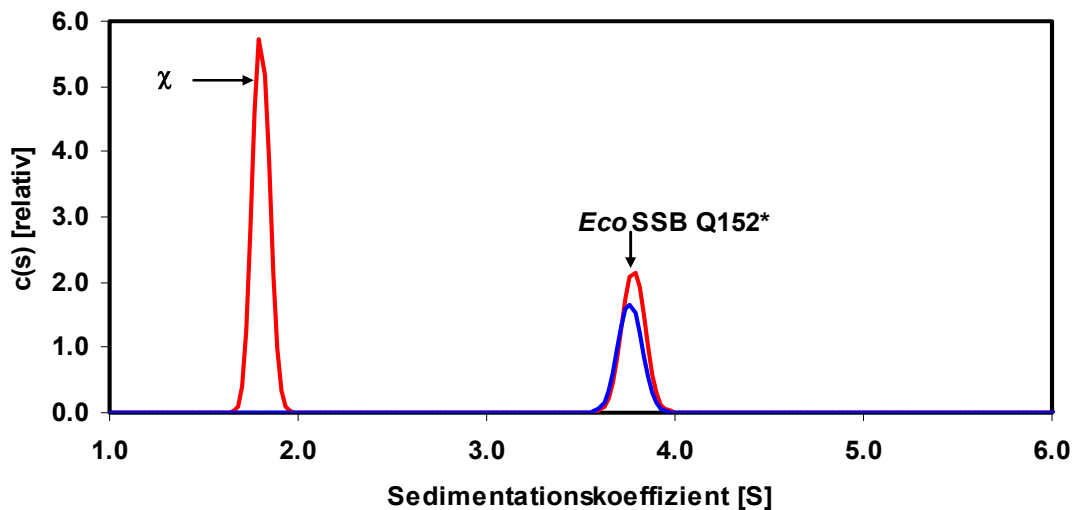


Abbildung 19: Verteilung der Sedimentationskoeffizienten für die Sedimentation von $2.5 \mu\text{M}$ *EcoSSB* Q152* (—) und $2.5 \mu\text{M}$ *EcoSSB* Q152* in Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ χ (—) in 0.3 M NaCl , 20 mM KP_i pH 7.4 (Beckman XL-A, Rotor An-50Ti, 50000rpm, 20°C , ausgewertet mit *c(s)*-Modell in Sedfit (vgl. 2.3.5), *s*-Werte nicht auf $s_{20,w}$ korrigiert).

Die Fläche unter dem Peak der schnelleren Spezies ist nur geringfügig größer, was auf eine sehr geringe Menge von χ -Protein in der schnellen Grenzschicht hinweisen könnte. Aus der Tatsache, dass *EcoSSB* Q152* eine drastische Reduktion in der Bindung von χ zeigt, kann geschlossen werden, dass der carboxyterminale Bereich von *EcoSSB* für die Bindung des χ -Proteins essentiell ist.

Für die Quantifizierung der Wechselwirkung wurden Titrationsexperimente in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt (vgl. 2.3.5). Im Folgenden wird der prinzipielle Ablauf der Methode beschrieben, bevor auf die Ergebnisse der einzelnen Experimente weiter eingegangen wird.

In den Titrationen wurden konstante Mengen *EcoSSB* mit unterschiedlichen Mengen χ versetzt und in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten analysiert. Die Ermittlung der Absorptionen der langsamen und schnellen Grenzschicht erfolgte durch Anpassung einer Summe zweier Gaußfunktionen an die Sedimentationsprofile unter Berücksichtigung einheitlicher Sedimentationskoeffizienten und der radialen Verdünnung in der sektorförmigen Zelle (vgl. 2.3.5). Ein typisches Bild eines solchen Einzelexperimentes zeigt Abbildung 20.

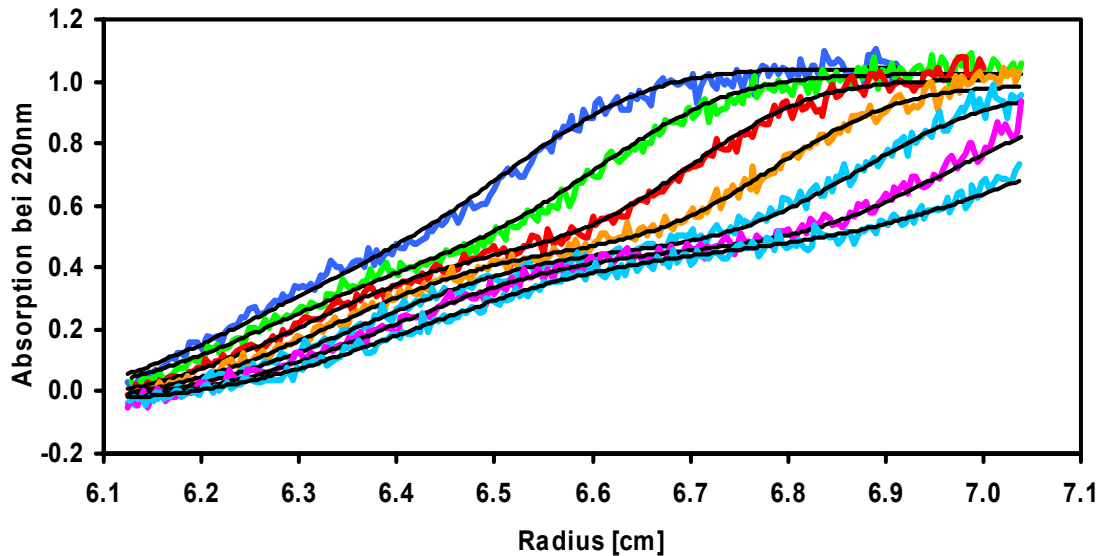


Abbildung 20: Sedimentation von $0.5 \mu\text{M}$ EcoSSB in Gegenwart von $3 \mu\text{M}$ χ . Die einzelnen Scans (farbig) zeigen die Absorption in der Zelle zu verschiedenen Zeiten (Abstand zwischen den Scans ca. 23 min). Die schwarzen Linien repräsentieren die Summe zweier Gaußfunktionen (vgl. 2.3.5), mit $E_{\chi, \text{Meniskus}}=0.65$ und $E_{\text{SSB}/\chi\text{-Komplex}, \text{Meniskus}}=0.55$ (Puffer: 5 mM NaCl, 5 mM KP_i pH 7.4, 5%(v/v) Glycerin; Beckman XL-A, Rotor An-50Ti, 45000rpm, 20°C , ausgewertet mit dem Programmpaket BPCFit).

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, lassen sich die Grenzschichten der Spezies deutlich voneinander trennen und werden durch die Gaußfunktionen sowohl in der Amplitude als auch in der Form gut beschrieben. Aus den durch die Anpassung erhaltenen Absorptionen der Spezies zu Beginn des Experiments und dem bekannten Extinktionskoeffizienten für χ lässt sich die Konzentration an freiem χ bestimmen. Die Konzentration des gebundenen χ -Proteins wurde daraus mit Hilfe der eingesetzten Gesamtkonzentration von χ berechnet (vgl. 2.3.5).

Um den Einfluss einzelsträngiger DNA auf die Wechselwirkung von EcoSSB und χ zu untersuchen, wurde ein analoges Experiment in Anwesenheit von poly(dT) durchgeführt. Dazu wurde die Sedimentation von mit EcoSSB gesättigten poly(dT)-Strängen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen χ analysiert. Da der SSB/poly(dT)-Komplex einen im Vergleich zu χ sehr hohen Sedimentationskoeffizienten (ca. 16 S) hat, wurde dieses Experiment bei zwei Drehzahlen durchgeführt. Zunächst wurde der Komplex bestehend aus EcoSSB/poly(dT) bzw. EcoSSB/poly(dT) und χ bei 24000 rpm abzentrifugiert, um anschließend das bei dieser Drehzahl fast nicht sedimentierende freie χ bei 45000 rpm abzusedimentieren. Mit Hilfe des zweiten Schritts kann die Konzentration des freien χ und die

Pufferextinktion durch Auswertung der *Scans* mit einer Gaußfunktion für eine einzelne Spezies bestimmt werden (vgl. 2.3.5). Die Bestimmung der Konzentration des gebundenen χ -Proteins erfolgte aus der eingesetzten und freien χ -Konzentration. Die für die verschiedenen molaren Verhältnisse errechneten Werte von gebundenem χ pro *EcoSSB*-Tetramer wurden gegen das eingesetzte Verhältnis aufgetragen und ergeben die Punkte der Bindungsisothermen (siehe Abbildung 21 und 22). Zur Bestimmung der Bindungsparameter wird ein Modell für die unabhängige Bindung von n χ -Proteinen an ein *EcoSSB*-Tetramer verwendet und an die gemessenen Daten angepasst:

$$\frac{\chi_{\text{gebunden}}}{\text{EcoSSB}} = n \cdot \left(\frac{K_{\text{ass}} \cdot \chi_{\text{frei}}}{1 + K_{\text{ass}} \cdot \chi_{\text{frei}}} \right)$$

Die Anpassung der theoretischen Kurve an die gemessenen Daten erfolgt über die Minimierung der Fehlerquadratsumme mit Hilfe des Solvers in Microsoft Excel.

Das angenommene Bindungsmodell schließt eine Bindung von χ an ssDNA aus. Die Abwesenheit einer solchen Bindung wurde in einem Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit (dT)₆₅-Oligonukleotiden (0.83 μ M) und einem 10-fachem Überschuss χ in 50 mM NaCl, 20mM KPi gezeigt. In diesem Experiment zeigte sich keine Erhöhung des s-Wertes von χ in Gegenwart von DNA (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass χ nicht an einzelsträngige Nukleinsäure bindet.

Titration im Hochsalz

Unter Hochsalzbedingungen (0.3 M NaCl, 20 mM KPi) wurden unterschiedliche molare Verhältnisse χ /*EcoSSB* mit der beschriebenen Methode (s.o.) in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Für die Titration in Gegenwart von poly(dT) wurden Komplexe mit einem molaren Verhältnis von 68 Nukleotiden pro *EcoSSB* eingesetzt, was bei dieser Ionenstärke einem leichten Überschuss Nukleinsäure entspricht (Lohman und Overman, 1985). Dieser leichte Überschuss verhindert das Auftreten von freiem *EcoSSB*. Das Ergebnis der Titrations in An- und Abwesenheit von Einzelstrang-DNA zeigt Abbildung 21.

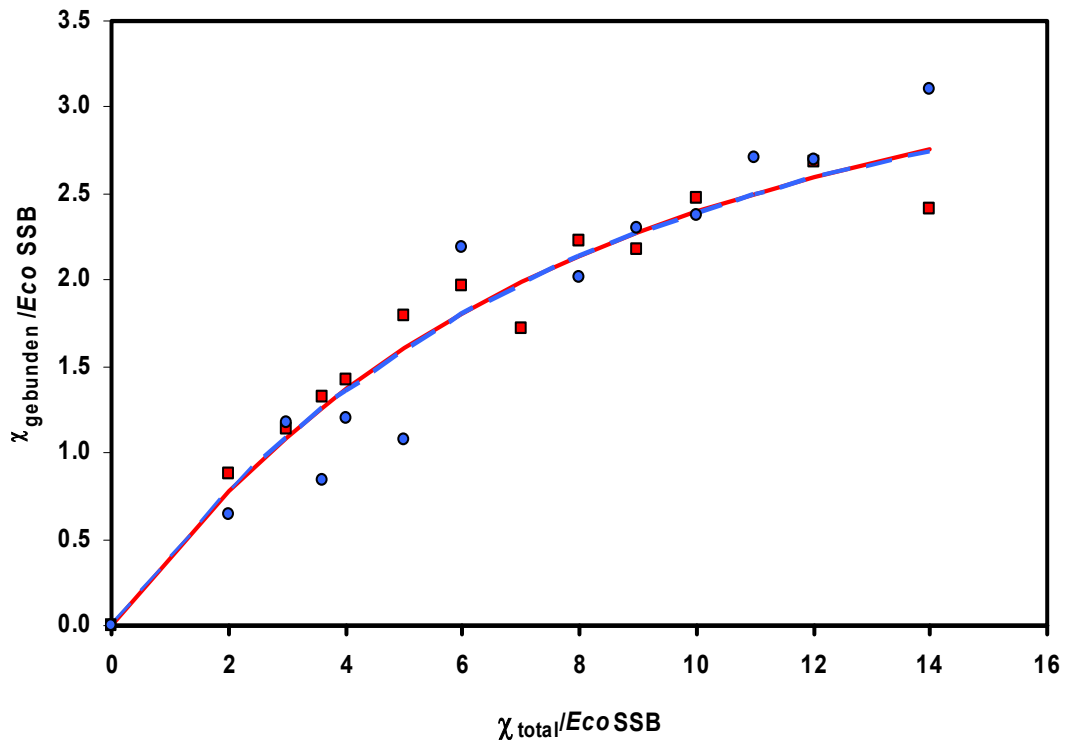


Abbildung 21: Bindungsisothermen von EcoSSB bzw. EcoSSB/poly(dT)-Komplexen und χ -Protein bei 0.3 M NaCl, 20 mM KPi pH7.4. Es wurden jeweils 0.5 μM EcoSSB (●) bzw. 0.5 μM EcoSSB mit 34 μM poly(dT) (■) mit unterschiedlichen χ -Konzentrationen in der analytischen Ultrazentrifuge analysiert (Absorption bei 280nm gemessen) und die relativen Konzentrationen der Spezies durch Anpassung von Gaußfunktionen ermittelt (vgl. 2.3.5). Die Linien stellen die theoretischen Kurven für die Bindung von 4 χ -Molekülen an ein EcoSSB-Tetramer mit $K=3.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (---) und $K=4.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (—) dar.

Unter Annahme einer Stöchiometrie von $n=4 \chi/\text{EcoSSB}$ ergeben sich für beide Bindungsisothermen nahezu identische Affinitäten. Diese Stöchiometrie wurde in der Titration in Anwesenheit von poly(dT) im Niedrigsalz bestimmt (s.u.) und wird für alle Auswertungen verwendet. Die Bindung des χ -Proteins an EcoSSB ist unter diesen Bedingungen also unabhängig von der Anwesenheit einzelsträngiger DNA und mit einer Assoziationsgleichgewichtskonstanten von $K_{\text{ass}}=(3.9 \pm 1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ schwach, woraus die fehlende Sättigung der Titrationskurve bei den eingesetzten Konzentrationen resultiert.

Titration im Niedrigsalzmodus

Das gleiche Experiment wurde unter Bedingungen mit niedrigen Ionenstärken wiederholt (5 mM NaCl, 5 mM KPi pH 7.4), da die Vermutung nahe liegt, dass es sich bei der Wechselwirkung des stark negativ geladenen C-terminalen Bereichs von EcoSSB mit χ um eine Interaktion mit vorwiegend ionischem Charakter handelt, die

durch hohe Ionenstärken abgeschirmt wird. Für den *EcoSSB*/poly(dT)-Komplex wurden bei dieser Ionenstärke nur 35 Nukleotide poly(dT) pro SSB eingesetzt, da *EcoSSB* im Niedrigsalzmodus nur 35 Nukleotide binden kann (Lohman und Overman, 1985). Um unspezifische Aggregation zu verhindern enthielt der verwendete Puffer 0.67 M Glycerin. Das Ergebnis der unter Niedrigsalzbedingungen durchgeführten Titrations in An- und Abwesenheit von poly(dT) zeigt Abbildung 22.

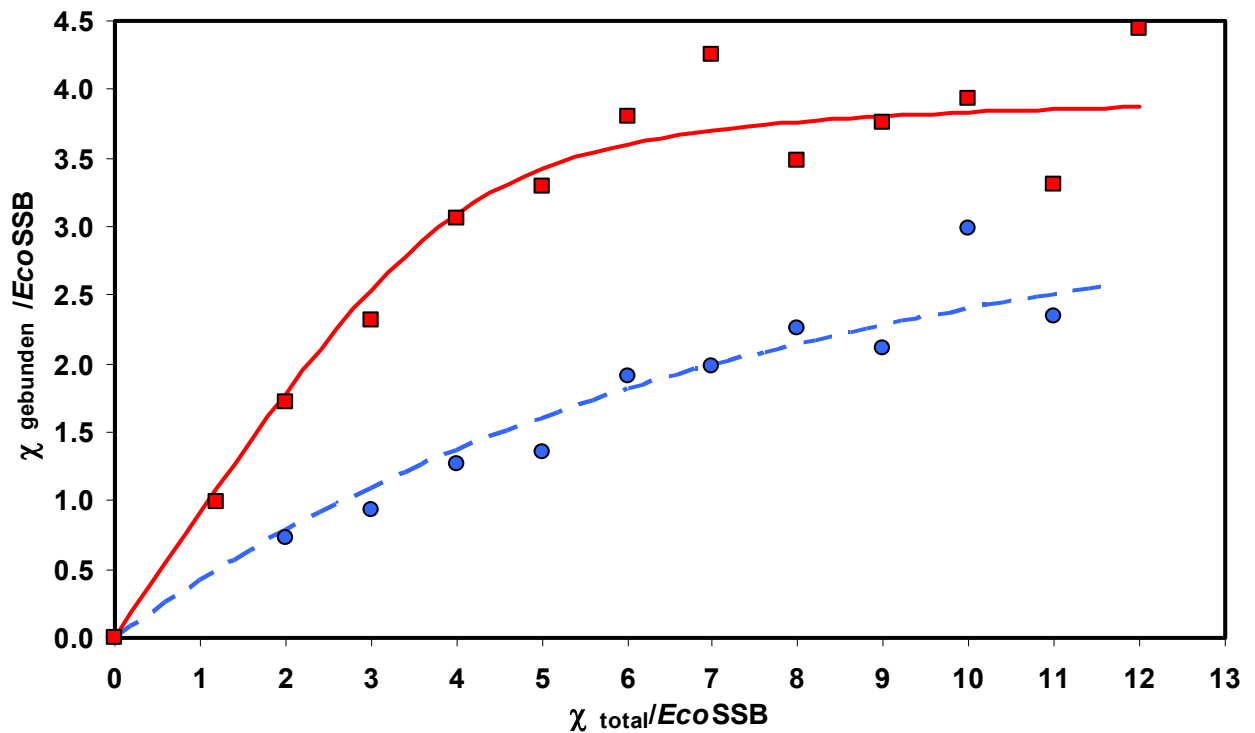


Abbildung 22: Titration von *EcoSSB* bzw. *EcoSSB*/poly(dT)-Komplexen mit χ Protein bei 5 mM NaCl, 5 mM KPi , pH 7.4, 0.67 M Glycerin. Es wurden jeweils 0.5 μM *EcoSSB* (•) bzw. 0.5 μM *EcoSSB* mit 17.5 μM poly(dT) (■) mit unterschiedlichen Konzentrationen χ in der analytischen Ultrazentrifuge analysiert (Absorption bei 220 nm gemessen) und die relativen Konzentrationen der Spezies durch Anpassung von Gaußfunktionen ermittelt (vgl. 2.3.5). Die Linien stellen die theoretischen Kurven für die Bindung von 4 χ -Molekülen an ein *EcoSSB*-Tetramer mit $K = 4.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (---) und $K = 7.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (—) dar.

Die Bindung von χ an *EcoSSB* in An- und Abwesenheit einzelsträngiger DNA unterscheidet sich bei dieser Ionenstärke deutlich. Die Assoziationsgleichgewichtskonstante in Abwesenheit von Nukleinsäure ($K_{\text{ass}} = (4 \pm 1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) stimmt mit der unter Hochsalzbedingungen ermittelten Bindungskonstanten überein. Dagegen ist die Affinität von χ und *EcoSSB*/poly(dT) mit $K_{\text{ass}} = (7.4 \pm 1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ in etwa 20fach höher als in Abwesenheit von einzelsträngiger Nukleinsäure. Die Kurve in Anwesenheit von ssDNA zeigt eine deutliche Sättigung der Bindung bei höheren

molaren Verhältnissen. Wegen der höheren Affinität konnte hier auch die bislang mit $n=4$ angenommene Stöchiometrie experimentell bestätigt werden.

3.1.2 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen

Die Wechselwirkung zwischen der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III und EcoSSB wurde zusätzlich mit Hilfe des Oberflächenplasmonresonanz-Verfahrens mit einem Gerät der Firma Biacore untersucht. Im Fall von auf dem Chip gekoppelten SSB bewirkt eine Bindung von χ eine Massenzunahme und damit eine Änderung des Brechungsindex, die als Änderung des Resonanzwinkels gemessen wird (vgl. 2.3.4). Um die unspezifische Bindung von χ an die Matrix zu berücksichtigen werden Differenzsignale gemessen, d.h. das Signal einer Chipoberfläche ohne gekoppeltes SSB-Protein wird von dem gemessenen Signal der Oberfläche mit immobilisiertem Protein subtrahiert. Dies ist ein gängiges Verfahren, um für die unspezifische Wechselwirkung eines Liganden mit der Dextranmatrix eines Chips zu korrigieren (Myszka, 1999).

Zunächst wurde die Bindung von χ an EcoSSB-Mutanten qualitativ überprüft. Tabelle 4 zeigt die gemessenen RU-Signale in Anwesenheit von $2\ \mu\text{M}$ χ auf einem CM5-Chip, auf dem jeweils ca. 1000 RU der verschiedenen EcoSSBs immobilisiert wurden (vgl. 2.3.4).

Tabelle 4: Die in Anwesenheit von $2\ \mu\text{M}$ χ im Gleichgewicht erhaltenen RU-Werte bei der Bindung von χ an EcoSSB-wt, EcoSSB P176S und EcoSSB Q152*. Die angegebenen RU-Werte sind bereits Differenzsignale (Puffer: 150mM NaCl-Standardpuffer, 20°C).

Protein auf Chip	RU-Signale im Gleichgewicht
EcoSSB-wt	193 ± 0.5
EcoSSB P176S	11 ± 0.2
EcoSSB Q152*	kein Signal (-0.7 ± 0.3)

Die Zunahme des RU-Signals um 193 RU bei der Reaktion von χ mit der Wildtyp-EcoSSB Flusszelle des Chips zeigt deutlich eine Bindung des χ -Proteins an. Für die Mutante EcoSSB Q152* kann im Rahmen der Fehlergenauigkeit keine Bindung nachgewiesen werden. Das zwar vorhandene, aber im Vergleich zu EcoSSB-wt sehr kleine Signal bei der Bindung von χ an EcoSSB P176S deutet auf einen starken Einfluss der Mutation an Position 176 auf die Wechselwirkung hin, diese Mutation

zerstört die Interaktion nahezu. Die Ergebnisse der Oberflächenplasmonresonanz-Experimente bestätigen somit, dass der C-terminale Bereich von *EcoSSB* essentiell für die Interaktion mit χ ist.

Charakterisierung der Bindung von χ an *EcoSSB* in Abwesenheit von Nukleinsäure

Zur Quantifizierung der Wechselwirkung von χ und *EcoSSB* wurden zunächst 1028 RU *EcoSSB*-wt entsprechend einer Menge von ungefähr 1 ng Protein auf einem CM5-Chip gekoppelt. Über die mit 150 mM NaCl-Standardpuffer äquilibrierten Flusszellen wurden für 1 Minute Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen χ -Protein im gleichen Puffer in das Flusssystem injiziert (vgl. 2.3.4). Das Ergebnis einer Reihe solcher Messungen zeigt das Sensogramm in Abbildung 23. Die jeweiligen Signale vor einer Injektion wurden als Basislinie definiert.

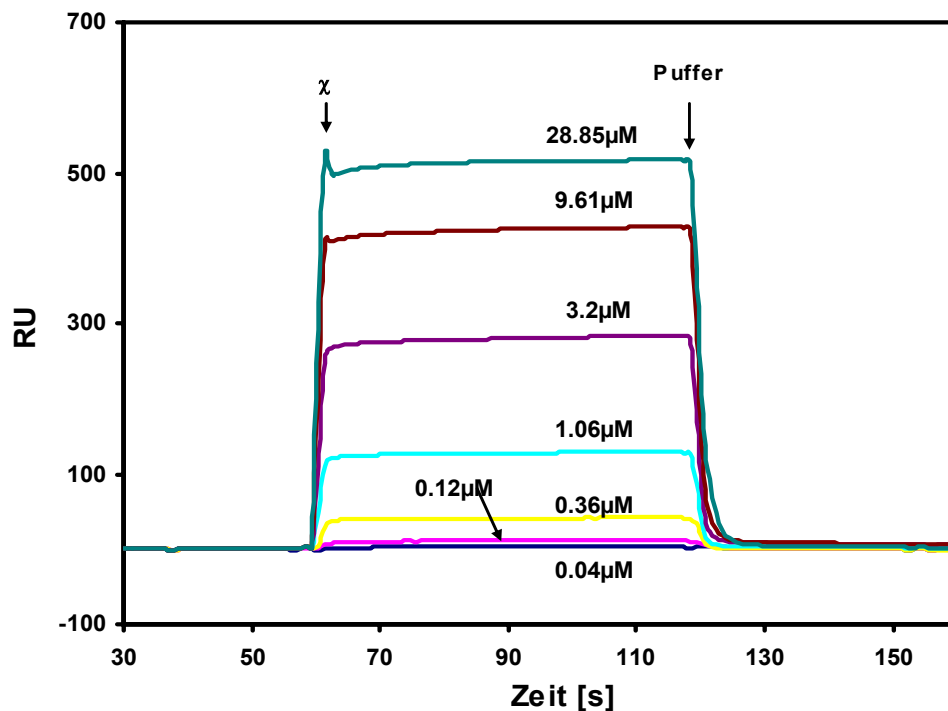


Abbildung 23: Bindung von χ an Wildtyp-*EcoSSB*. Dargestellt sind die SPR-Signale bei Injektion unterschiedlicher χ -Konzentrationen (farbig) über einen mit *EcoSSB* beladenen CM5-Chip bei 20°C. Eine Messung besteht dabei aus einem 60 s Äquilibrierungsschritt (150 mM NaCl, 20 mM KPi pH 7.4), der Injektion der χ -Lösung im gleichen Puffer (60 s) gefolgt vom Zurückschalten auf Puffer für 60 s. Nach jeder Injektion wird eine Regenerierung mit 0.1 M Glycin pH 9.5 durchgeführt (nicht gezeigt).

Bei Injektion von χ und Zurückschalten auf Puffer erfolgt die Änderung des RU-Signals sehr schnell. Die Assoziations- und Dissoziationskinetik lässt sich mit der zur

Verfügung stehenden zeitlichen Auflösung des Geräts nicht erfassen, somit kann keine Bestimmung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten aus dem Quotienten der kinetischen Konstanten erfolgen. Eine Verringerung der Assoziationsgeschwindigkeit wäre nur durch den Einsatz niedrigerer χ -Konzentrationen möglich, aufgrund der geringen Affinität wäre dann aber keine Bindung zu erwarten (vgl. 2.3.4). Daher werden die Signalhöhen im Gleichgewicht (20 s nach Injektionsstart) zur Bestimmung der Assoziationsgleichgewichtskonstanten herangezogen. Die Auftragung der RU-Signale gegen die jeweilige χ -Konzentration ergibt eine Titrationskurve (Abbildung 24).

Für die Auswertung wird eine Langmuir'sche Adsorptionsisotherme für die Bindung von χ an EcoSSB an die Messdaten angepasst:

$$RU([\chi]) = RU_{\max} \cdot \frac{K_{\text{Ass}} \cdot [\chi]}{1 + K_{\text{Ass}} \cdot [\chi]}$$

Die gemessenen Punkte lassen sich gut mit diesem Modell beschreiben. Die so bestimmte Assoziationsgleichgewichtskonstante liegt bei $K_{\text{ass}} = 2.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

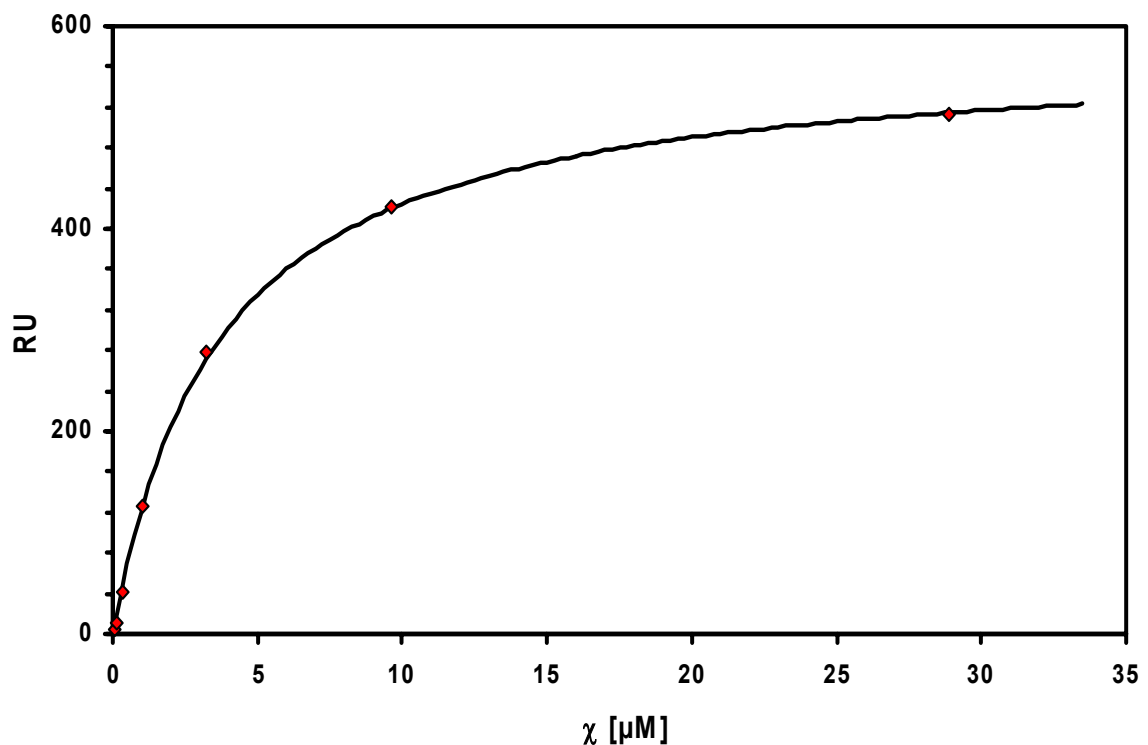


Abbildung 24: Auftragung der Gleichgewichts-RU-Signale (♦) aus Abbildung 23 gegen die Konzentration an injiziertem χ . Die Linie repräsentiert die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme für die Bindung von χ an EcoSSB mit den Parametern $K_{\text{ass}} = (2.7 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ und $RU_{\max} = 580 \text{ RU}$.

Die Stöchiometrie des gesättigten Komplexes konnte aus dem Sättigungswert ($RU_{\max}$), der bekannten Menge an gekoppeltem *EcoSSB* (in RU) und den bekannten Molmassen der Komponenten zu ca. $n=2.5 \chi/\text{EcoSSB-Tetramer}$ abgeschätzt werden (vgl. 2.3.4). Das zeigt, dass deutlich weniger als die erwarteten vier χ -Moleküle an ein *EcoSSB*-Tetramer auf der SPR-Oberfläche gebunden werden können. Dieser Unterschied zur der in der analytischen Ultrazentrifuge (vgl. 3.1.1) bestimmten Stöchiometrie könnte durch die Immobilisierung des *EcoSSBs* auf dem SPR-Chip und durch die damit hervorgerufene Unzugänglichkeit von Bindungsstellen verursacht werden.

Die bei höherer Ionenstärke (0.3 M NaCl, 20 mM KP_i pH 7.4) bestimmte Affinität ist mit $K_{\text{ass}}=1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ähnlich der in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmten Affinität (vgl. 3.1.1).

Um eine Aussage über die Affinität von χ und *EcoSSB* im Niedersalz zu treffen, wurde das gleiche Experiment unter ähnlichen Pufferbedingungen wie in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt (5 mM NaCl, 5 mM KP_i pH 7.4). Die für die unterschiedlichen χ -Konzentrationen erhaltenen SPR-Signale zeigt Abbildung 25. Auch hier steigt das SPR-Signal bei Injektion sehr schnell an und fällt bei Umschalten auf Puffer sehr schnell wieder ab, was eine Auswertung der kinetischen Konstanten unmöglich macht.

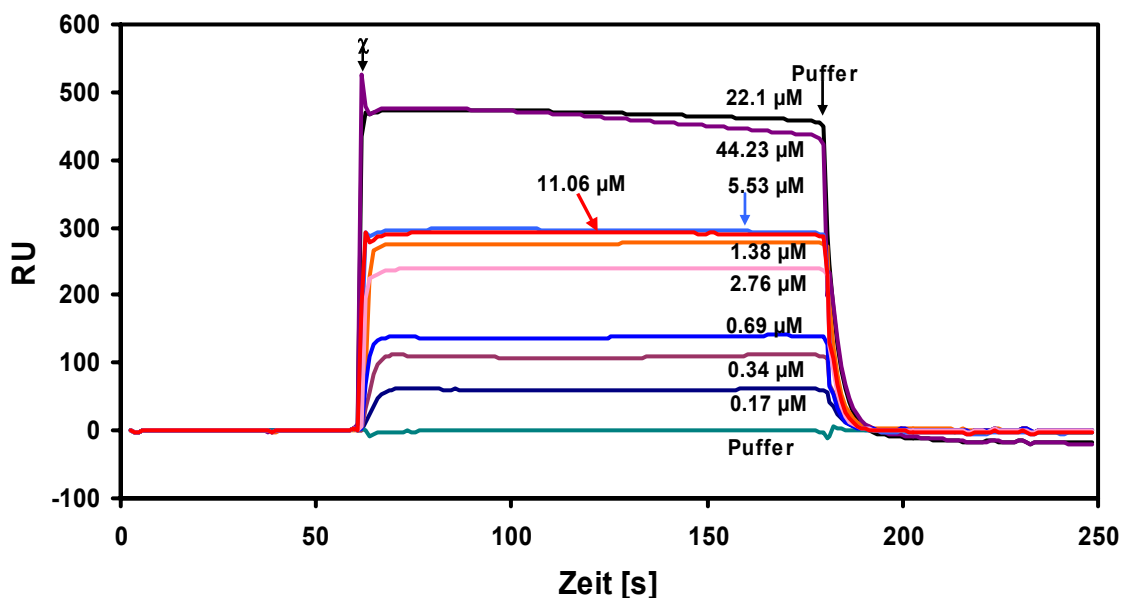


Abbildung 25: Sensogramm der Injektion unterschiedlicher χ -Konzentrationen (farbig) über den mit *EcoSSB*-wt beladenen CM5-Chip. Die jeweiligen Signale vor einer Injektion wurden als Basislinie definiert. Puffer: 5 mM NaCl, 5 mM KP_i pH 7.4, 5%(v/v) Glycerin, gemessen bei 20°C

Die Messwerte nach Injektion unterschiedlicher χ -Konzentrationen zeigen eine starke Streuung der SPR-Signalhöhen. So ist beispielsweise das Signal bei 11 μM χ (roter Pfeil) niedriger als das bei 5.5 μM χ (blauer Pfeil) und das Signal der 44 μM χ -Lösung fällt unter das der 22 μM χ -Lösung ab. Aufgrund der Streuung der Messwerte war die Messung nicht quantitativ auswertbar. Ein Grund dafür könnten die bei den niedrigen Ionenstärken auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen der Proteine mit der negativ geladenen carboxy-methylierten Dextranmatrix sein.

Charakterisierung der Bindung von χ an EcoSSB in Anwesenheit von Nukleinsäure

Um die Wechselwirkung des an Einzelstrang-DNA gebundenen EcoSSBs mit χ zu quantifizieren wurde zunächst versucht, einzelsträngige Oligonukleotide ((dT)₆₅) an die auf dem CM5-Chip kovalent gebundenen SSB-Proteine zu binden. Die Injektion der (dT)₆₅-Oligonukleotide in 150 mM NaCl-Standardpuffer zeigte jedoch keine Zunahme des SPR-Signals, was darauf hindeutet, dass keine Nukleinsäure an das SSB auf dem Chip bindet. Vermutlich ist auch hierfür die kovalente Kopplung des EcoSSBs auf dem SPR-Chip verantwortlich, durch die Bindungsstellen eventuell unzugänglich gemacht oder gar denaturiert worden sind. Auch abstoßende elektrostatische Effekte zwischen der DNA und der carboxy-methylierten Dextranmatrix könnten die Bindung von (dT)₆₅ an das gekoppelte SSB schwächen.

Um derartige Einflüsse auszuschließen wurde ein anderer Ansatz zur Charakterisierung der Bindung von χ an EcoSSB in Anwesenheit von ssDNA gewählt. Dazu wurden 686 RU biotinyliertes (dT)₆₅ an die Oberfläche eines Streptavidin-Chips (SA-Chip, Biacore) gekoppelt (vgl. 2.3.4). Anschließend wurde durch Injektion von EcoSSB ein EcoSSB/(dT)₆₅-Komplex hergestellt. Dabei wurden 2893 RU EcoSSB gebunden. Nach der Herstellung des Komplexes wurde 6 min mit Puffer gewaschen und anschließend wurden unterschiedliche χ -Konzentrationen für 60 s injiziert. Nach einem Waschschrift und der folgenden Regeneration mit 0.1 M Glycin pH 9.5 wurde der EcoSSB/(dT)₆₅-Komplex durch Injektion von EcoSSB jeweils neu gesättigt, um das beim Regenerationsschritt abdissoziierte EcoSSB wieder zu ersetzen. Dabei wurde der Ausgangszustand mit etwa 2900 RU gebundenem EcoSSB vor jeder Messung wiederhergestellt. Erst danach erfolgte die nächste Injektion der χ -Probe. Die Signale der Messung für die Bindung von χ an einen EcoSSB/(dT)₆₅-Komplex unter Hochsalzbedingungen (150 mM NaCl, 20mM KP_i pH 7.4) zeigt Abbildung 26.

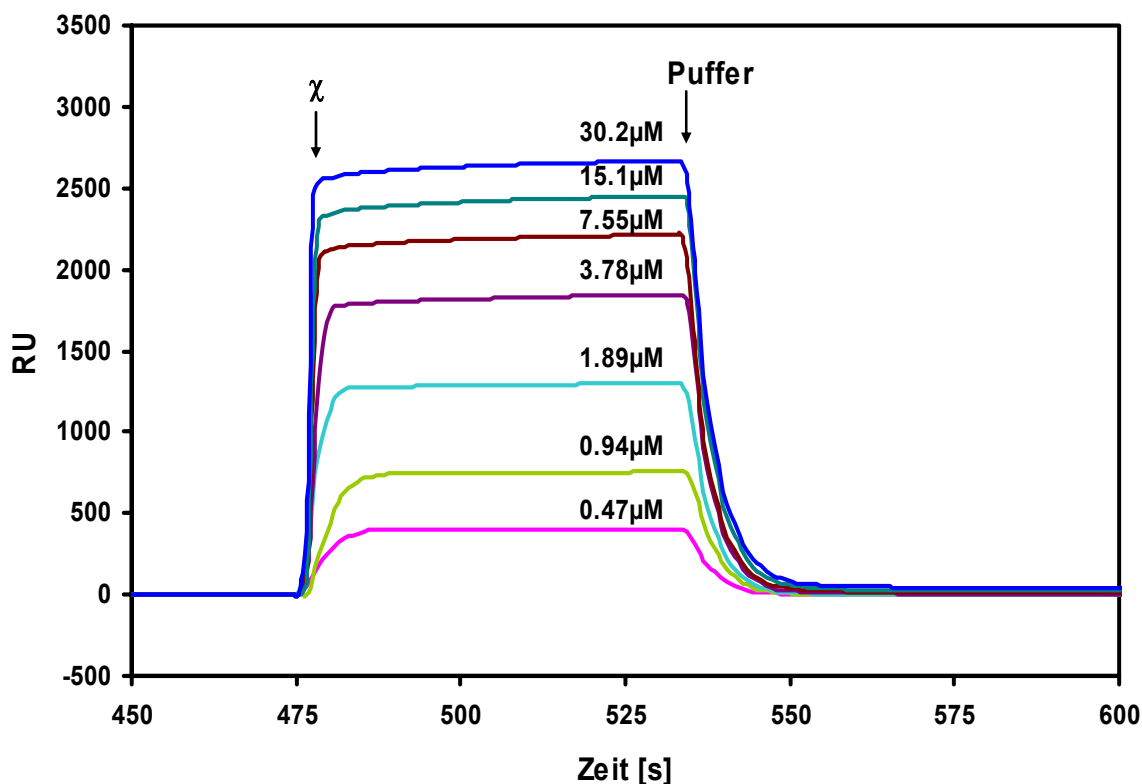


Abbildung 26: Sensogramm der Bindung unterschiedlicher χ -Konzentrationen (farbig) an einen EcoSSB/(dT)₆₅-Komplex unter Hochsalzbedingungen (SA-Chip). Die jeweiligen Signale vor einer Injektion wurden als Basislinie definiert. Nach jeder Injektion und Regeneration wurde der EcoSSB/(dT)₆₅-Komplex durch Injektion von EcoSSB neu gesättigt und mit Puffer gewaschen (nicht gezeigt). Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM KP_i pH 7.4, 20°C

Die Auftragung der RU-Signale im Gleichgewicht (20 s nach Injektion) gegen die eingesetzte Konzentration des Liganden ergibt eine Kurve, deren Punkte sich durch eine Langmuir'schen Adsorptionsisotherme mit $K_{\text{ass}}=4.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ beschreiben lassen (Abbildung 27). Die Auswertung erfolgte durch Anpassung der Parameter RU_{max} und K_{ass} (s.o.). Die aus den RU-Werten abgeschätzte Stöchiometrie liegt bei ca. $n=4.4 \chi/\text{EcoSSB}$. Sie ist damit ungefähr doppelt so groß wie im Experiment mit dem direkt an den Chip gekoppelten EcoSSB in Abwesenheit von Nukleinsäure. Vermutlich stehen durch die nicht-kovalente Kopplung des SSBs an seinen natürlichen Liganden alle C-Termini eines SSB-Tetramers für die Bindung von χ zur Verfügung. Zudem zeigt sich in diesem Experiment im Vergleich zum Experiment mit gekoppeltem SSB (s.o.) diesmal auch eine deutliche Bindung des SSBs an die ssDNA.

Der Versuch, das Experiment unter Niedrigsalz-Bedingungen durchzuführen ergab, wie auch schon in Abwesenheit von ssDNA, stark streuende Messwerte (nicht dargestellt).

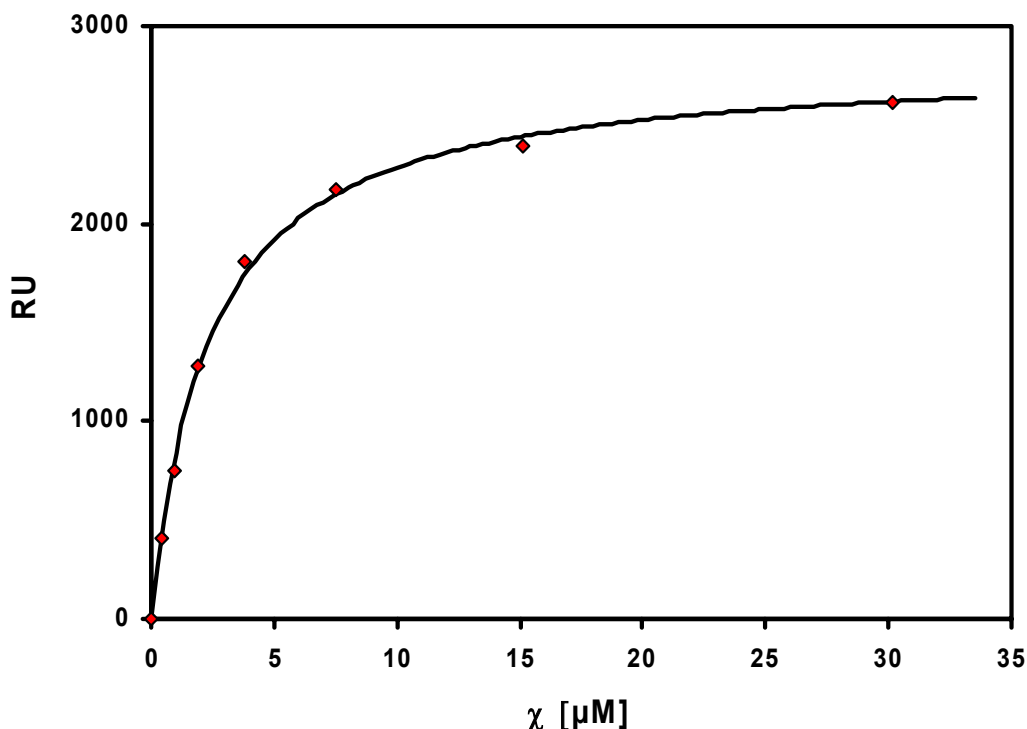


Abbildung 27: Adsorptionsisotherme der Gleichgewichts-RU-Signale (♦) aus Abbildung 26. Die Linie repräsentiert die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme für die Bindung von χ an EcoSSB mit den Parametern $K_{\text{ass}} = (4.2 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ und $\text{RU}_{\text{max}} = 2823 \text{ RU}$.

3.1.3 DNA-Schmelzexperimente

In DNA-Schmelzexperimenten bei denen das Schmelzen doppelsträngiger DNA absorptionsphotometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verfolgt wird (vgl. 2.3.1), kann der Einfluss von SSB auf das Schmelzverhalten der DNA untersucht werden. Dabei wird durch Bindung der ssDNA an SSB das Gleichgewicht zwischen Doppel- und Einzelstrang-DNA auf die Seite der Einzelstrang-DNA verschoben. Die Absenkung des Schmelzpunktes der dsDNA ist demzufolge ein Maß für die Affinität des SSB zu ssDNA. Da sich die Anwesenheit von ssDNA auf die Affinität von EcoSSB zu χ auswirkt (vgl. 3.1.1), ist es im Gegenzug interessant den Einfluss der EcoSSB/ χ -Wechselwirkung auf die Affinität von EcoSSB zu ssDNA durch DNA-Schmelzexperimente zu untersuchen. Dazu wurden $38 \mu\text{M}$ poly(dA·dT) in Standard-Schmelzpuffer (75 mM NaCl , 20 mM KPi pH 7.4) in Anwesenheit von $1.26 \mu\text{M}$ EcoSSB geschmolzen ($n = 30 \text{ nt/EcoSSB}$). Zum Vergleich wurde der gleiche Ansatz in Anwesenheit von $6.33 \mu\text{M}$ χ geschmolzen ($n = 5 \chi/\text{EcoSSB}$). Das Ergebnis der Schmelzexperimente zeigt Abbildung 28, dabei ist die Absorptionsänderung ΔAbs (bei 260 nm) als Funktion der Temperatur dargestellt.

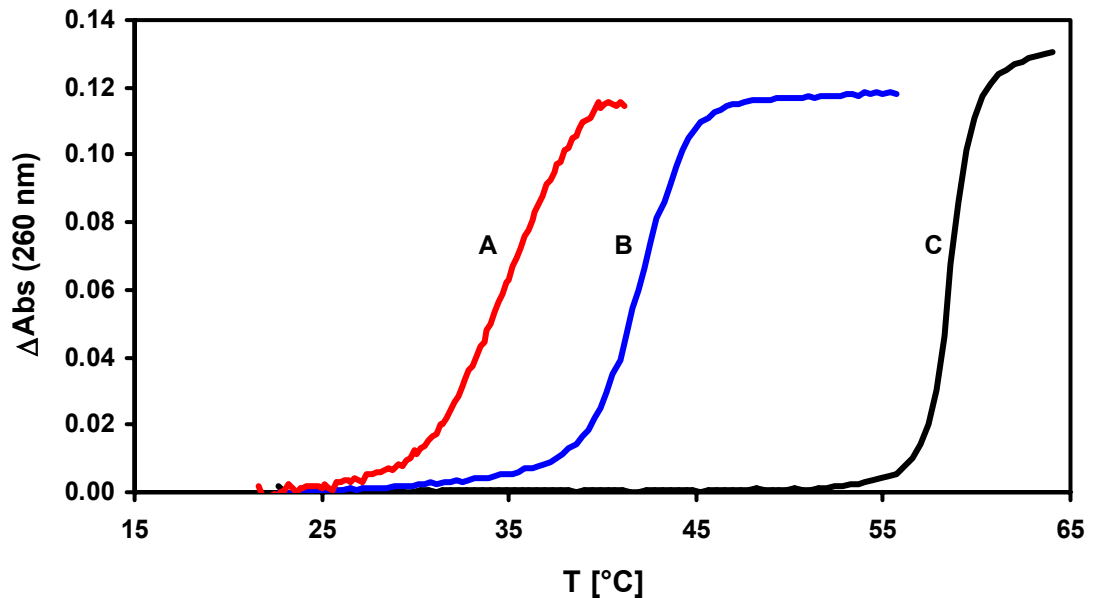


Abbildung 28: Schmelzkurven von 38 μM poly(dA·dT) alleine (—, C), in Gegenwart von 1.26 μM EcoSSB (—, B) und in Gegenwart von 1.26 μM EcoSSB und 6.33 μM χ (—, A) in 75 mM NaCl, 20 mM KP_i pH 7.4 bei einer Heizrate von 20 K/h. Es konnte kein Unterschied zwischen den Kurven der Aufheizphase und den Kurven der Abkühlungsphase beobachtet werden. Dargestellt sind die gemittelten Daten einer Aufheiz- und Abkühlphase.

Die Gegenwart eines Überschusses von EcoSSB bewirkt eine Erniedrigung der Schmelztemperatur des poly(dA·dT) von 59°C auf ca. 42°C. Die Anwesenheit von χ bewirkt eine weitere Erniedrigung des Schmelzpunktes auf 35°C. Die Schmelzkurve in Anwesenheit von χ konnte wegen der bei höheren Temperaturen auftretenden Denaturierung des Proteins nur bis 42°C aufgenommen werden. Die Bindung von χ an EcoSSB bewirkt also eine Erhöhung der Affinität von EcoSSB zu Einzelstrang-DNA.

In unter gleichen Bedingungen durchgeführten Schmelzexperimenten mit der carboxyterminal verkürzten Mutante EcoSSB Q152* zeigte sich kein Einfluss der Anwesenheit von χ auf das Schmelzverhalten von poly(dA·dT) (Abbildung 29). Der Schmelzpunkt des poly(dA·dT) wird durch Anwesenheit des EcoSSB Q152* von 59°C auf ca. 27°C gesenkt. Damit hat EcoSSB Q152* einen größeren Einfluss auf den Schmelzpunkt der Nukleinsäure als EcoSSB-wt.

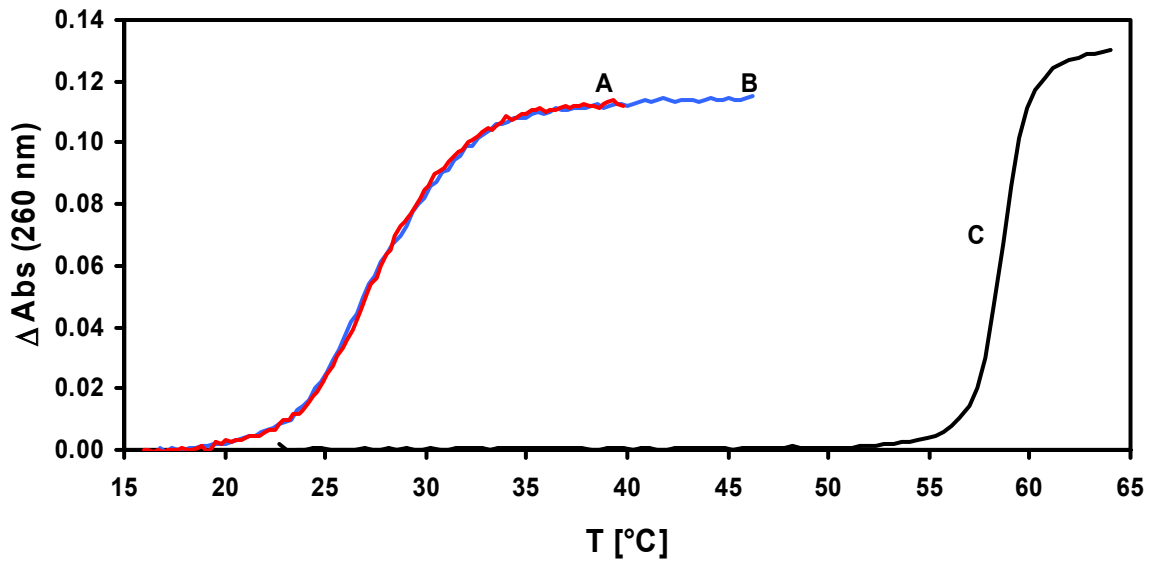


Abbildung 29: Schmelzexperimente von 38 µM poly(dA·dT) alleine (—, C), in Gegenwart von 1.26 µM EcoSSB Q152* (—, B) und in Gegenwart von 1.26 µM EcoSSB Q152* und 6.33 µM χ (—, A) unter gleichen Bedingungen wie in Abbildung 28.

Diese Beobachtung stimmt mit denen von Curth *et al.* (1996) überein. Die Autoren vermuten, dass die carboxyterminal verkürzte Mutante aufgrund der fehlenden elektrostatischen Abstoßung zwischen den Phosphatresten der DNA und dem negativ geladenen C-terminalen Bereich stärker an Einzelstrang-DNA bindet. Die Schmelzkurve in Anwesenheit von χ ist identisch mit der in Abwesenheit des χ -Proteins aufgenommenen Kurve und zeigt, dass bei EcoSSB Q152* die Anwesenheit von χ keinen Einfluss auf die Affinität des Proteins zu ssDNA hat. Da die Erhöhung der Affinität bei EcoSSB-wt deutlich zu beobachten ist, sprechen auch diese Experimente für die Bindung des χ -Proteins an den C-terminalen Bereich von EcoSSB.

3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung der SSBs aus *T.aquaticus* und *D.radiodurans*

3.2.1 SSB aus *Thermus aquaticus*

Klonierung des *Taqssb*-Gens in pET-15b

Ausgehend von der in der EMBL-Datenbank zugänglichen Sequenz für das Gen des SSB-Proteins aus *T.aquaticus* (AF276705) wurden zwei PCR-Primer für die Amplifikation des Gens und die spätere Klonierung in den Empfängervektor pET-15b entworfen (vgl. 2.1.7). Der Vorwärtsprimer trägt vor dem *Taq*SSB-Start-Codon eine *Nco*I-Schnittstelle (*Taq*SSB1, vgl. 2.1.4) und der Rückwärtsprimer eine *Bam*HI-Schnittstelle, die in Expressionsrichtung gesehen hinter dem Stop-Codon folgt (*Taq*SSB2, vgl. 2.1.4). Die PCR-Amplifikation des Gens erfolgte direkt aus der chromosomalen DNA der bei 95°C in Puffer aufgeschlossenen *T.aquaticus* Zellen (DSM 625^T) mit einer Annealing-Temperatur von 54°C und 35 Wiederholungszyklen (vgl. 2.2.5). Das auf einem TPE-Polyacrylamidgel analysierte PCR-Produkt hatte eine abgeschätzte Länge von etwa 800-850 Bp und entsprach damit der erwarteten Länge von 810 Bp (*Taqssb*-Gen+Schnittstellen). Das Produkt wurde in einem präparativen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bam*HI gespalten und anschließend wurden die Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert. Das Empfängerplasmid pET-15b wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und der Plasmid-Rahmen durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gel-Extraktion isoliert (vgl. 2.2.5). Das PCR-Produkt wurde mit dem Plasmid-Rahmen ligiert und der Ligationsansatz in *E.coli* LK111(λ) transformiert (vgl. 2.1.6). Nach dem Ausstreichen auf LB-Platten (+Amp) und Inkubation bei 37°C wurden von einigen der Kolonien *Miniprep*-LB-Kulturen angeimpft und die daraus isolierten pET-*Taq*SSB-Plasmide mit *Nco*I und *Bam*HI gespalten. Aus Kolonien, deren Plasmide ein Insert mit der erwarteten Größe von etwa 800 Bp trugen, wurden *Maxiprep*-Kulturen für die Isolierung und Sequenzierung des Plasmids angeimpft (vgl. 2.2.5). Die DNA-Sequenz des so klonierten *Taqssb*-Gens entsprach bei mehreren sequenzierten Klonen der in der EMBL-Datenbank hinterlegten Sequenz.

Expression und Aufreinigung von *Taq*SSB

Für die Expression des *Taq*SSB-Proteins wurde das Plasmid pET-*Taq*SSB in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS (vgl. 2.1.6) transformiert. Der anschließend bei 37°C durchgeführte Expressionstest zeigte nach Induktion durch 1 mM IPTG in der SDS-PAAGE (vgl. 2.2.6) das Auftreten einer Proteinbande bei etwa 30 kDa (vgl. Abbildung

30). Diese Größe stimmt gut mit der aus der Aminosäurezusammensetzung errechneten Molmasse von 30.03 kDa überein.

Für die präparative Expression wurde eine Fermentation im 10 l-Maßstab durchgeführt (vgl. 2.2.7, 37°C, 3h Induktion). Die Aufreinigung des Proteins aus den Zellen erfolgte wie unter 2.2.8 angegeben durch Polyethylenimin-Fällung des klaren Zell-Lysats mit anschließender Aufreinigung des Extraktes dieser Fällung über Affinitätschromatographie mit Blueseparose und Anionen-Austausch-Chromatographie. Abbildung 30 zeigt die SDS-Polyacrylamidgele des Gesamtzell-extraktes vor und nach Induktion sowie die wichtigsten Aufreinigungsschritte. Die Ausbeute der Aufreinigung aus Zellen der Fermentation im 10 l-Maßstab ergab *Taq*SSB-Proteinmengen von mehr als 100 mg.

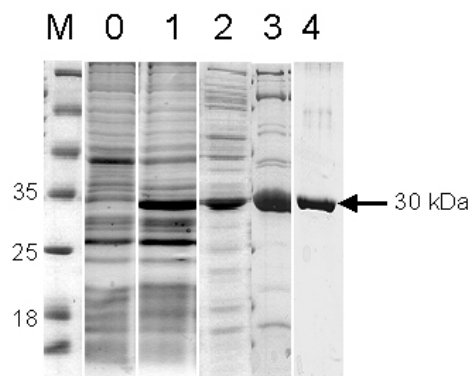


Abbildung 30: Ausschnitte aus SDS-Polyacrylamidgelen (15%, vgl. 2.2.6) der wichtigsten Aufreinigungsschritte von *Taq*SSB: 0:Gesamtzell-extrakt vor der Induktion, 1:Gesamtzell-extrakt 2h nach Induktion, 2:TGE500-Extrakt des Polymix-P-Pellets, 3:eine Hauptfraktion der Blueseparose-Affinitätschromatographie, 4:Protein nach Anionen-Austausch-Chromatographie. Die *Taq*SSB-Bande ist durch einen Pfeil markiert (30 kDa), M: Größenstandard (MWM, Fermentas, Größen in kDa)

3.2.2 SSB aus *Deinococcus radiodurans*

Klonierung des *Dra*SSB-Gens in pET-15b

Vor der Klonierung des *Dra*SSB-Gens wurden zunächst die zu Beginn dieser Arbeit in den Datenbanken (EMBL, TIGR) zugänglichen Sequenzen des *Dra*SSB (DR099) mit den anderen SSB-Sequenzen aus Organismen der *Thermus*-Gruppe (*T.aquaticus* und *T.thermophilus*) verglichen. Ein Alignment dieser drei Proteine zeigt Abbildung 31.

DraSSB	mllssepavrrqghrtlvilpatqgef	MARGMNHVYLIGALARDPELRYTGNGMAVFE	60
TaqSSB	-----	MARGLNQVFLIGTLTARPDMDRYTPGGLAILD	31
TthSSB	-----	MARGLNRVFLIGALATRPDMRYTPAGLAILD	31
DraSSB	ATVAGEDRVIGNDGRERNLPWYHRVSILGKPAEWQAERnLKGGDVAVVEGTLEYRQWEap		120
TaqSSB	LNLAGQDAFTDESGQEREVPWYHRVRLLRQAEMWGD L-LEKGQLIFVEGRLEYRQWEKD		90
TthSSB	LTLAGQDLLLS DNGGEREVSWYHRVRLLRQAEMWGD L-LDQGQLVFVEGRLEYRQWERE		90
DraSSB	eaanaaqstskpsawnnssapn-----		143
TaqSSB	GEKKSEVQVRAEFIDPLEGRGRETLEDARGQPRLRRALNQVILMGNLTRD PDLRYTPQGT		150
TthSSB	GERRSELQIRADFLD PLDDR GKERAEDSRGQPRLRAALNQVFLMGNLTRD PELRYTPQGT		150
DraSSB	-----		143
TaqSSB	AVVRLGLAVNE rRRGQEERTHFLEVQAWRELAEWASELRKGDGL LVIGRLVNDSTSSS		210
TthSSB	AVARLGLAVNE -RRQGAERTHFVEVQAWRD LAEWAAELRKGDGL FVIGRLVNDSTSSS		209
DraSSB	-----		143
TaqSSB	GERRFQTRVEALRLER PTRGPAQAGGSR PPTVQTGGVDIDEGLEDF PPEEDLPF		264
TthSSB	GERRFQTRVEALRLER PTRGPAQAGGSR SREVQTGGVDIDEGLEDF PPEEDLPF		263

Abbildung 31: Alignment des annotierten DraSSBs (EMBL DR099) mit den SSBs der *Thermus*-Gruppe *T.aquaticus* (Taq) und *T.thermophilus* (Tth) (Programm MACAW (Schuler et al., 1991), dunklere Farben stehen für stärker konservierte Aminosäuren, deren Austausch evolutionär gesehen unwahrscheinlicher ist.).

Im dargestellten Alignment fällt zunächst die extrem hohe Homologie von TaqSSB und TthSSB auf. Das DraSSB ist viel kürzer als die Proteine aus der *Thermus*-Gruppe und hat einen N-terminalen Überhang. Berücksichtigt man, dass die Gattungen *Thermus* und *Deinococcus* aufgrund großer Ähnlichkeiten in dieselbe Gruppe eingeordnet werden (Madigan et al., 2001), ist der große Unterschied zwischen den *Thermus*-SSBs und *Deinococcus*-SSB nicht zu erwarten. Bei genauerer Betrachtung der für DraSSB codierenden DNA-Sequenz konnte der N-terminale Überhang durch Auswahl eines alternativen Start-Codons (TTG) erklärt werden. Im Hinblick auf die anderen beiden SSB-Proteine der Gruppe scheint es unwahrscheinlich, dass dieses Start-Codon das tatsächlich verwendete ist. Die ab dem normalen Start-Codon (ATG, liegt im gleichen Leseraster) gelesene Sequenz ab Methionin-30 zeigt etwa bis zu Aminosäure 120 eine hohe Homologie zwischen DraSSB und den *Thermus*-Proteinen, die jedoch danach endet. Eine genauere Analyse des annotierten *DraSSB*-Gens ergab stromabwärts vom Stop-Codon eine Sequenz, die für einen zu TaqSSB und TthSSB homologen carboxyterminalen Bereich mit anschließendem Stop-Codon codiert. Jedoch war dieser Bereich durch zwei *Frameshifts* vom normalen Leseraster getrennt. Aufgrund des Auftretens dieser Wechsel im Leseraster wurden bereits *Frameshifts* während der Transkription oder Translation in *D.radiodurans* in Betracht gezogen (Lipton et al., 2002).

Wegen dieser Befunde wurden die für die Amplifikation des *Dra*SSB-Gens verwendeten Primer so gewählt, dass die Sequenz beginnend mit dem ATG-Start-Codon und einschließlich dem für den zu *Taq*SSB homologen Carboxyterminus codierenden Bereich in der PCR amplifiziert wurde. Die PCR erfolgte wie bei *Taq*SSB direkt aus der genomischen DNA eines *D.radiodurans* Referenzstammes, dessen Zellen in Puffer bei 95°C aufgeschlossen wurden (vgl. 2.2.5). Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 53°C (Primer: *Dra*SSB1+2, vgl. 2.1.4). Das erhaltene Produkt hatte eine Länge von 950-1000 Bp und entsprach damit der erwarteten Länge von etwa 980 Bp (*Dra*SSB-Gen bis C-Terminus+Schnittstellen). Bei der PCR wurden durch die Primer eine *Nco*I- und eine *Bam*HI-Schnittstelle an das Produkt angefügt. Über diese Schnittstellen wurde das PCR-Produkt, wie zuvor auch das *Taq*SSB-Gen, in pET-15b im Stamm LK111(λ) kloniert (vgl. 3.2.1).

Die durch den Einsatz von 4 Primern (*Dra*SSB1-4, vgl. 2.1.4) erhaltene überlappende Sequenzierung beider Stränge des so erhaltenen pET-*Dra*SSB ergab eine Sequenz, die durch zwei *Frameshifts* von der in der Datenbank annotierten Sequenz abwich. Auch eine zweite mit einer unabhängigen *D.radiodurans*-Kultur der DSMZ durchgeführte Klonierung und Sequenzierung des *Dra*SSB-Gens führte zum gleichen Ergebnis (vgl. 6.1). Die so korrigierte DNA- und Protein-Sequenz wurde an die EMBL und TrEMBL-Datenbanken zur Korrektur der bestehenden Datensätze übermittelt (EMBL DRA564860). Die aus der DNA-Sequenz (906 Bp) abgeleitete neue Proteinsequenz für *Dra*SSB ist in Abbildung 32 als Alignment mit den SSBs aus *T.aquaticus* und *T.thermophilus* dargestellt.

Wie in dem Vergleich der Aminosäuresequenzen deutlich zu erkennen ist, zeigt *Dra*SSB eine sehr hohe Homologie zu den SSBs aus *Thermus*. Im Gegensatz zu *Taq*SSB und *Tth*SSB hat das *Dra*SSB einen zusätzlichen etwa 30 Aminosäuren umfassenden Bereich vor dem C-Terminus.

DraSSB	MARGMNHVYLIGALARDPELRYTGNGMAVFEATVAGEDRVIGNDGRERNLPWYHRVSILGKP	62
TaqSSB	MARGLNQVFLIGTLTARPDMDRYTPGGLAILDLNLAGQDAFTDESGQEREVPWYHRVRLLRQ	62
TthSSB	MARGLNRVFLIGALATRPDMRYTPAGLAILDLTLAQDLLLLSDNGGEREVSWYHRVRLLRQ	62
DraSSB	AEWQAERNLKGgDAVVVEGTLEYRQWEAPEGGKRSVNVKALRMEQLGTQPELIQDAGGGVR	124
TaqSSB	AEMWGD LLEKG-QLIFVEGRLEYRQWEKDGEK KSEVQVRAE FIDPLEGRGRETLEDARGQPR	123
TthSSB	AEMWGD LLDQG-QLVFVEGRLEYRQWEREGE RSELQIRAD FLDPLDDRGERAEDSRGQPR	123
DraSSB	MSGAMNEVLVLGNVTRDPEIRYTPAGDAVLSLSIAVNENyqdRQGQRQEKVHYIDATLWRDL	186
TaqSSB	LRRALNQVILMGNLTRDPDLRYTPQGTAVVRLGLAVNER---RRGQEEERTHFLEVQAWREL	182
TthSSB	LRAALNQVFLMGNLTRDPELRYTPQGTAVARLGLAVNE----RRQGAEEERTHFVEVQAWREL	181
DraSSB	AENMKELRKGD PVMIMGRLVNEGWTDKDGNKRNSTRVEA TRVEALARGAGNAnsgyaaatpa	248
TaqSSB	AEWASELRKGD GLLVI GRLVNDSTSSSGERRFQTRVEA LRLERPTRGPAQAggsrpptv--	242
TthSSB	AEWAAELRKGD GLFVI GRLVNDSTSSSGERRFQTRVEA LRLERPTRGPAQAggsrsrev--	241
DraSSB	aprtqtassaarptsggyqspsraantgs RSGGLDIDQGLDDFpPEEDDLPF	301
TaqSSB	----- QTGGVDIDEGLEDF-PPEEDLPF	264
TthSSB	----- QTGGVDIDEGLEDF-PPEEDLPF	263

Abbildung 32: Proteinalignment der in dieser Arbeit ermittelten DraSSB-Sequenz mit TaqSSB und TthSSB (vgl. Abbildung 31).

Expression und Aufreinigung von DraSSB

Das Plasmid pET-DraSSB wurde zur Expression von DraSSB in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert (vgl. 2.1.6). Der mit diesem Stamm bei 30°C und einer IPTG-Konzentration 1 mM durchgeführte Expressionstest (vgl. 2.2.7) zeigte nach Induktion in der SDS-PAAGE (2.2.6) die deutliche Expression eines Proteins mit etwa 33-35 kDa (Abbildung 33). Diese Größe stimmt gut mit der aus der Aminosäurezusammensetzung errechneten Größe von 32.7 kDa für DraSSB überein. Für die präparative Expression des Proteins wurde eine Fermentation im 10 l-Maßstab durchgeführt (30°C, 3h Induktion, vgl. 2.2.7). Die Aufreinigung des DraSSB erfolgte wie unter 2.2.8 angegeben durch Polyethylenimin-Fällung des klaren Lysats gefolgt von affinitätschromatographischer Aufreinigung des Extraktes dieser Fällung über Blueseparose und folgender Ammoniumsulfatfällung (vgl. Abbildung 33).

Die Ausbeute der Aufreinigung aus Zellen der Fermentation im 10 l-Maßstab ergab DraSSB-Proteinmengen von mehr als 100 mg.

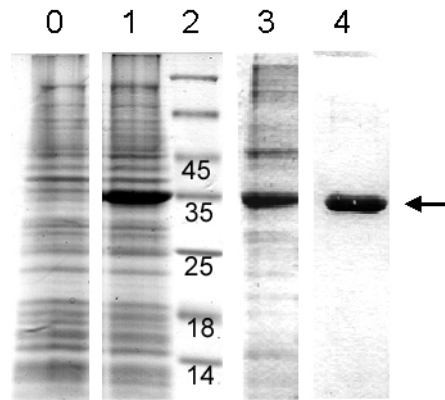


Abbildung 33: Ausschnitte aus SDS-Polyacrylamidgelen (15%, vgl. 2.2.6) der wichtigsten Aufreinigungsschritte von DraSSB: 0:Gesamtzellextrakt vor Induktion, 1:Gesamtzellextrakt 4h nach Induktion, 2:Größenstandard MWM (Angaben in kDa, Fermentas), 3:TGE400-Extrakt des Polymin-P-Pellets, 4:Protein nach Affinitätschromatographie auf Blueseparose. Die DraSSB-Bande ist durch einen Pfeil markiert.

3.2.3 Immunologischer Nachweis von DraSSB im *D.radiodurans* Gesamtzellextrakt

Zur Überprüfung, ob die Größe des rekombinant exprimierten Proteins mit der des in *D.radiodurans* exprimierten DraSSB übereinstimmt, wurde ein *D.radiodurans* Gesamtzellextrakt in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (vgl. 2.2.6) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (vgl. 2.2.10). Dazu wurden 9.5 ml einer *D.radiodurans*-Kultur mit einer Extinktion von $E_{600nm}=2$ abzentrifugiert, die Zellen in 100 µl Auftragspuffer (5%SDS) aufgenommen (vgl. 2.2.6) und für 5 min auf 95°C erhitzt. Von diesem Ansatz wurden unterschiedliche Mengen auf das Gel aufgetragen (5 µl, 10 µl und 15 µl). Als Positiv-Kontrolle wurden aufgereinigtes rekombinantes DraSSB (60 ng) und EcoSSB (10 ng) aufgetragen. Zum Nachweis im Western-Blot wurde als primärer Antikörper ein polyklonales Anti-EcoSSB-Serum aus Kaninchen verwendet. In einem Vorexperiment wurde gezeigt, dass damit auch rekombinantes DraSSB (und TaqSSB) nachgewiesen werden kann (nicht gezeigt). Die Detektion wurde wie unter 2.2.10 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis des Western-Blots nach BCIP/NBT-Färbung zeigt Abbildung 34. Der gefärbte Proteingrößenstandard dient dabei nur zur ungefähren Orientierung, das Laufverhalten des Markers im Gel ist wahrscheinlich durch die kovalente Farbstoffmarkierung verfälscht und entspricht nicht dem Laufverhalten eines ungefärbten Größenstandards (vgl. z.B. Abbildung 33).

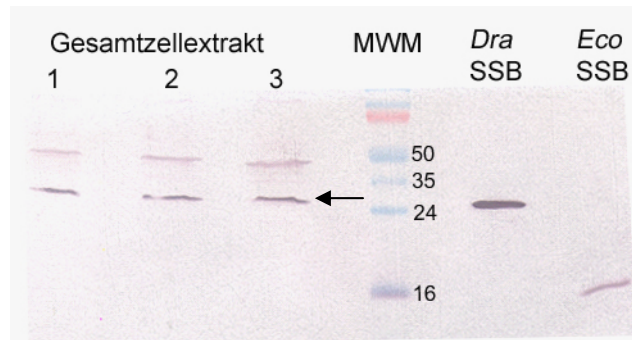


Abbildung 34: Western-Blot-Analyse eines Gesamtzellextraktes aus *D. radiodurans* (5 µl, 10 µl und 15 µl des Zellextraktes, s. Text) mit einem Anti-EcoSSB-Antikörper. Zum Vergleich sind neben dem Größenstandard (Prestained MWM, Größen in kDa) rekombinantes DraSSB (32.7 kDa) und EcoSSB (18.8 kDa) mit aufgetragen worden, die als Positiv-Kontrolle dienen.

In *D. radiodurans* wird also ein Protein mit der gleichen Größe wie das rekombinante DraSSB exprimiert und auch vom Anti-EcoSSB-Antikörper erkannt (Abbildung 34, Pfeil). Daraus kann man schließen, dass die Größe des klonierten DraSSB der des *in vivo* exprimierten Proteins entspricht. Es existiert jedoch noch eine weitere durch den Antikörper erkannte Proteinbande bei etwa 50 kDa, die jedoch schwächer angefärbt wird, als die Hauptbande bei 32 kDa. Die Größe dieser Bande entspricht weder dem eines DraSSB-Dimers noch der Größe eines DraSSBs, das den ursprünglich annotierten aminotermialen Überhang hat (etwa 35 kDa). Vermutlich handelt es sich bei der zweiten Bande um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit einem anderen Protein, das angefärbt wird, weil eine sehr große Proteinmenge auf das Gel aufgetragen wurde.

3.3 Charakterisierung von DraSSB und TaqSSB

3.3.1 Proteinquervernetzungsexperimente

Um Aussagen über den Oligomerisierungsgrad des DraSSB zu treffen wurden Protein-Quervernetzungsexperimente mit Dimethylsuberimidat (DMS) als bifunktionellem Vernetzungsreagens durchgeführt. Dazu wurden 0.1 µg/µl DraSSB mit 3 mg/ml DMS inkubiert und anschließend mit TCA gefällt (vgl. 2.2.9). Als Vergleich dient eine DraSSB-Probe, die nicht mit DMS behandelt wurde. Nach Aufnahme der Pellets in Auftragspuffer und Erhitzen auf 95°C wurden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Größe getrennt (vgl. 2.2.6). Als Positiv-Kontrolle für die Quervernetzung wurde auch 0.1 µg/µl EcoSSB mit DMS inkubiert (Abbildung 35).

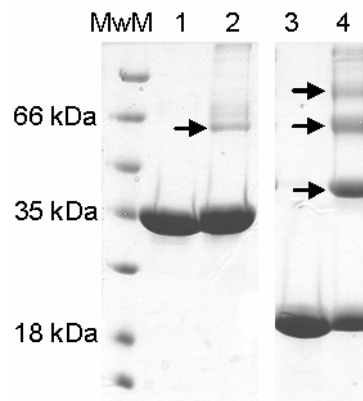


Abbildung 35: Ausschnitte aus SDS-Polyacrylamidgelen (13.5%, vgl. 2.2.6) der mit DMS behandelten Proteine *DraSSB* und *EcoSSB* im Vergleich zu unbehandeltem Protein. 1: *DraSSB* ohne DMS, 2: *DraSSB* mit DMS, 3: *EcoSSB* ohne DMS, 4: *EcoSSB* mit DMS (je 10 µg Protein pro Spur); Größenstandard MWM (Fermentas). Die Oligomerenbanden in Spur 2 und 4 sind durch Pfeile markiert.

Das mit DMS behandelte *EcoSSB* (Abbildung 35, Spur 4) zeigt im Vergleich zum unbehandelten *EcoSSB* (Abbildung 35, Spur 3) deutlich die für das tetramere Protein erwarteten Banden auf Höhe des Monomers (18.8 kDa), des Dimers (37.6 kDa), Trimers (56.4 kDa) und Tetramers (75.5 kDa). Bei der Betrachtung des mit DMS behandelten *DraSSB* (Abbildung 35, Spur 2) ist lediglich das Auftreten einer Dimeren-Bande bei etwa 65 kDa zu beobachten. Zudem ist der Anteil der quervernetzten Dimere im Vergleich zu *EcoSSB* (Abbildung 35, Spur 4) geringer. Das Auftreten des Dimers im Quervernetzungsexperiment deutet darauf hin, dass *DraSSB* in Lösung als Dimer vorliegt, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es auch höhere Oligomere bildet.

3.3.2 Analytische Ultrazentrifugation

Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten

Die Analyse von Proteinen in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten in der analytischen Ultrazentrifuge ermöglicht durch die Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten Aussagen über die Form der sedimentierenden Teilchen in Form des Perrin-Faktors als Quotient des aus dem Experiment ermittelten Reibungskoeffizienten und den theoretischen Reibungskoeffizienten einer Kugel gleicher Masse. Weiterhin können Aussagen über die Homogenität einer Probe getroffen werden, da sich schon kleine Inhomogenitäten durch außergewöhnliche Verbreiterung der sedimentierenden Grenzschicht bemerkbar machen. Sowohl *DraSSB* als auch *TaqSSB* wurden auf diese Weise in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten untersucht (vgl. 2.3.5). Beide Proteine zeigten

jeweils eine sedimentierende Grenzschicht ohne ungewöhnliche Verbreiterung und nur einen symmetrischen Peak in der Verteilung der Sedimentationskoeffizienten ($c(s)$ -Verteilung, vgl. 2.3.5), was auf die Homogenität der verwendeten Proteine hinweist. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht bzw. durch Anpassung einer Lamm'schen Differentialgleichung für eine sedimentierende Spezies wurde der Sedimentationskoeffizient für *Dra*SSB und *Taq*SSB mit dem Programm BPCFit (Kindler, 1997) bestimmt (Tabelle 5).

Die unter der Annahme der Sedimentation monomerer Proteine errechneten Perrin-Faktoren (f/f_0) waren kleiner als 1 und damit nicht sinnvoll, weil die Kugel mit $f/f_0=1$ bereits die am schnellsten sedimentierende Form darstellt. Daher können die Proteine in Lösung nicht als Monomer vorliegen. In Hinblick auf die bei *T.aquaticus* und *D.radiodurans* aufgetretene Genduplikation ist unter der Voraussetzung einer konstanten Anzahl von *OB-folds* im Vergleich zum homotetrameren *Eco*SSB (mit je einem *OB-fold* pro Monomer) eine dimere Form von *Taq*SSB und *Dra*SSB am wahrscheinlichsten. Die ermittelten Sedimentationskoeffizienten schließen höhere Aggregate zwar nicht aus, jedoch hätte bereits ein mit 4 S sedimentierendes *Dra*SSB-Trimer einen für ein gefaltetes Protein ungewöhnlich großen Perrin-Faktor ca. $f/f_0=2$. Neben der Bestimmung der nativen Molmasse durch Sedimentations-Diffusionsgleichgewichts-Experimente (s.u.) geben die Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente bereits gute Hinweise auf die dimere native Form der *Thermus/Deinococcus*-SSBs.

Tabelle 5: Die aus den Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten ermittelten Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w}$ und daraus ohne Berücksichtigung der Hydratation errechneten Perrin-Faktoren für ein dimeres Protein (Programm Sednterp von J.Philo, USA).

Protein	s-Wert ($s_{20,w}$)	Perrin-Faktor (f/f_0) (dimeres Protein)
<i>Dra</i> SSB	4.0($\pm$ 0.1)S	1.5
<i>Taq</i> SSB	4.0($\pm$ 0.1)S	1.4

Für beide Proteine zeigt sich eine deutlich von der Kugelgestalt ($f/f_0=1$) abweichende Form, der Perrin-Faktor beider Moleküle ist ähnlich dem für *Eco*SSB bestimmten Wert von $f/f_0=1.4$ (Williams *et al.*, 1983).

Bestimmung der Molmassen von *Dra*SSB und *Taq*SSB

Zur Bestimmung der nativen Molmasse von Makromolekülen, und somit auch des Oligomerisierungsgrads eines Makromoleküls, eignen sich Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge (vgl. 2.3.5). Diese wurden sowohl mit *Dra*SSB als auch mit *Taq*SSB bei verschiedenen Drehzahlen und Proteinkonzentrationen in 0.3 M NaCl-Standardpuffer durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationsverläufe nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen Sedimentation und Diffusion wurden nach Basislinienkorrektur mit dem Programmpaket BPCFit (Kindler, 1997) unter Annahme einer einzelnen Spezies ausgewertet (vgl. 2.3.5).

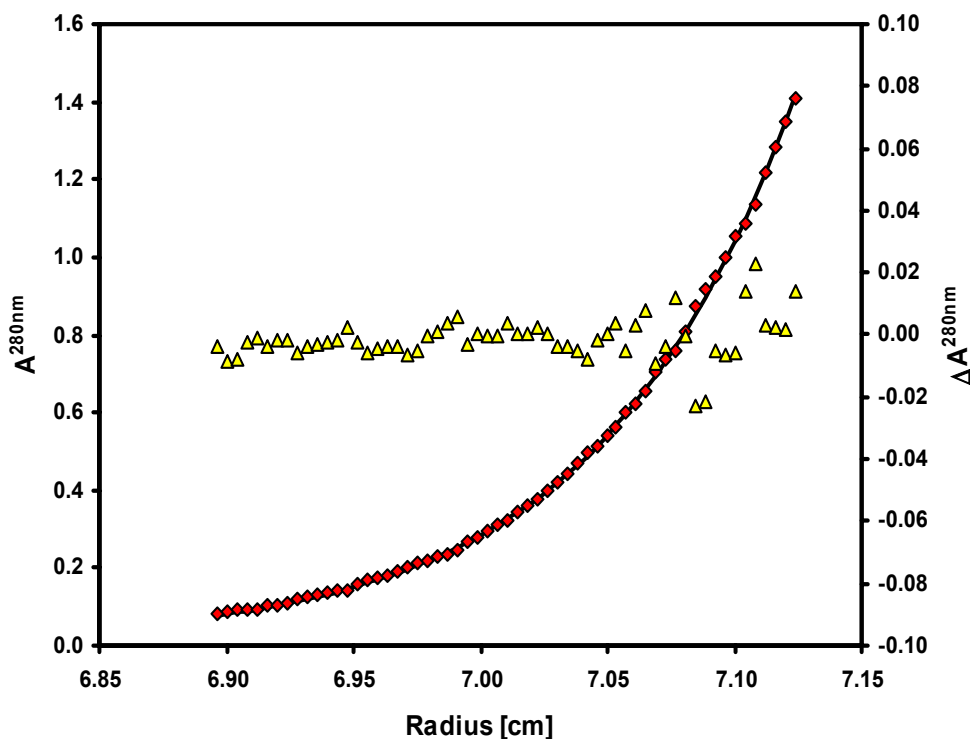


Abbildung 36: Konzentrationsverlauf im Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experiment mit TaqSSB in der analytischen UZ (16000 rpm, 20°C) mit einer Ausgangskonzentration von 5 μM TaqSSB in 0.3 M NaCl-Standardpuffer, dargestellt als Absorption (280nm) als Funktion des Radius. Dargestellt sind die Messwerte (♦) und die theoretische Kurve für eine Spezies mit $61.4 (\pm 2.9) \text{ kg/mol}$ (Linie) mit den Residuen ($\Delta A = A_{\text{gemessen}} - A_{\text{theoretisch}}$) der Anpassung (Δ -Symbole, rechte Y-Achse).

Für TaqSSB konnten dabei alle unter verschiedenen Bedingungen (Drehzahl, Proteinkonzentration) erhaltenen Konzentrationsverläufe mit einem Modell für eine Spezies der Masse $61.4 (\pm 2.9) \text{ kg/mol}$ beschrieben werden (*global-fit*). Exemplarisch für diese Auswertung ist in Abbildung 36 der gemessene Konzentrationsverlauf einer

5 μM *Taq*SSB-Lösung bei 16000 rpm und die bei der Anpassung erhaltene theoretische Kurve dargestellt. Die für *Taq*SSB bestimmte native Molmasse stimmt im Rahmen der Fehler gut mit der eines Dimers überein, für das sich aus der Aminosäurezusammensetzung eine Molmasse von 60.1 kg/mol ergibt.

Im analogen Experiment mit *Dra*SSB konnten alle gemessenen Konzentrationsverläufe nach Einstellung des Gleichgewichts durch ein theoretisches Modell mit einer Spezies der Molmasse von 61.6 (± 3.5) kg/mol beschrieben werden. Der gemessene Konzentrationsverlauf eines solchen Experiments mit 3.1 μM *Dra*SSB bei einer Drehzahl von 16000 rpm sowie der durch *global-fit* angepasste Konzentrationsverlauf ist in Abbildung 37 zu sehen.

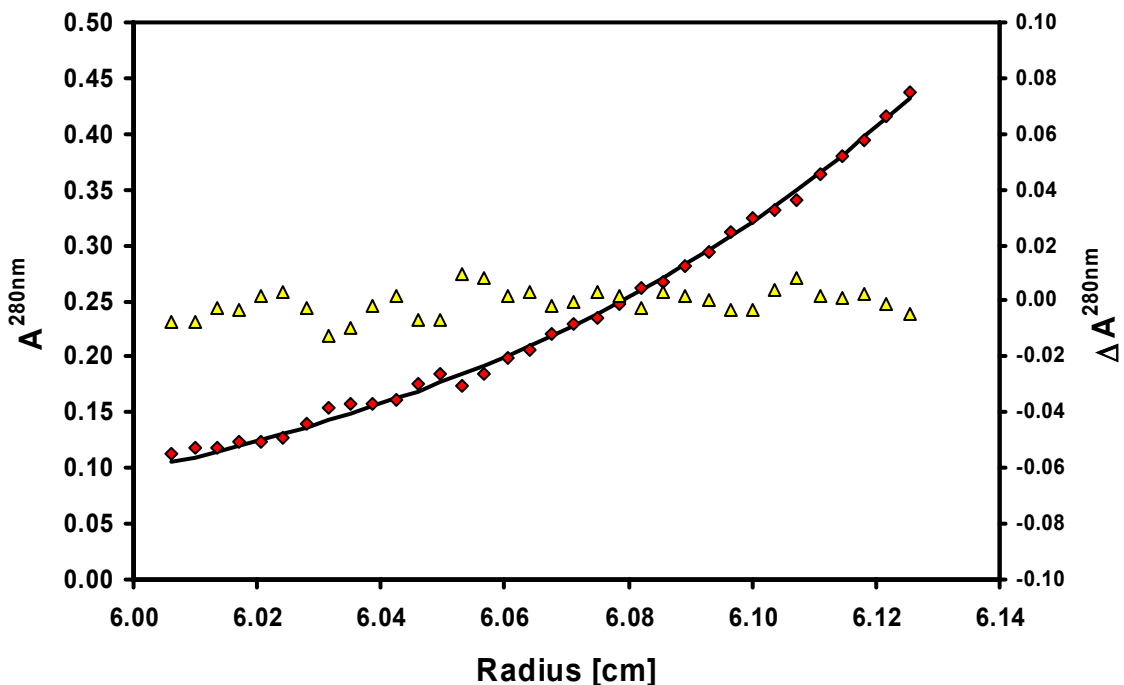


Abbildung 37: Konzentrationsverlauf im Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experiment in der analytischen UZ bei 16000 rpm und 20°C. Ausgangskonzentration 3.1 μM *Dra*SSB-Lösung in 0.3 M NaCl-Standardpuffer. Dargestellt ist die Absorption (280nm) als Funktion des Radius: Messwerte (♦) und theoretischer Konzentrationsverlauf für eine Spezies mit 61.6 (± 3.5) kg/mol (Linie) mit den Residuen ($\Delta A = A_{\text{gemessen}} - A_{\text{theoretisch}}$) der Anpassung (Δ -Symbole, rechte Y-Achse).

Auch die für das *Dra*SSB ermittelte Molmasse entspricht der eines Dimers, für das sich aus der Aminosäurezusammensetzung eine Molmasse von 65.4 kg/mol ergibt.

Untersuchungen zur Proteinstabilität von *DraSSB*

Die Entfaltung eines oligomeren Proteins durch Guanidiniumchlorid kann zur Untersuchung der Stabilität des Proteins ausgenutzt werden (vgl. 2.3.5). Für *DraSSB* wurden dazu Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimente in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Guanidiniumchlorid durchgeführt. Trägt man die aus den Konzentrationsverläufen ermittelten apparenten Molmassen für eine solche Serie von Experimenten gegen die Konzentration des Guanidiniumchlorids auf, so erhält man eine Denaturierungskurve (Abbildung 38).

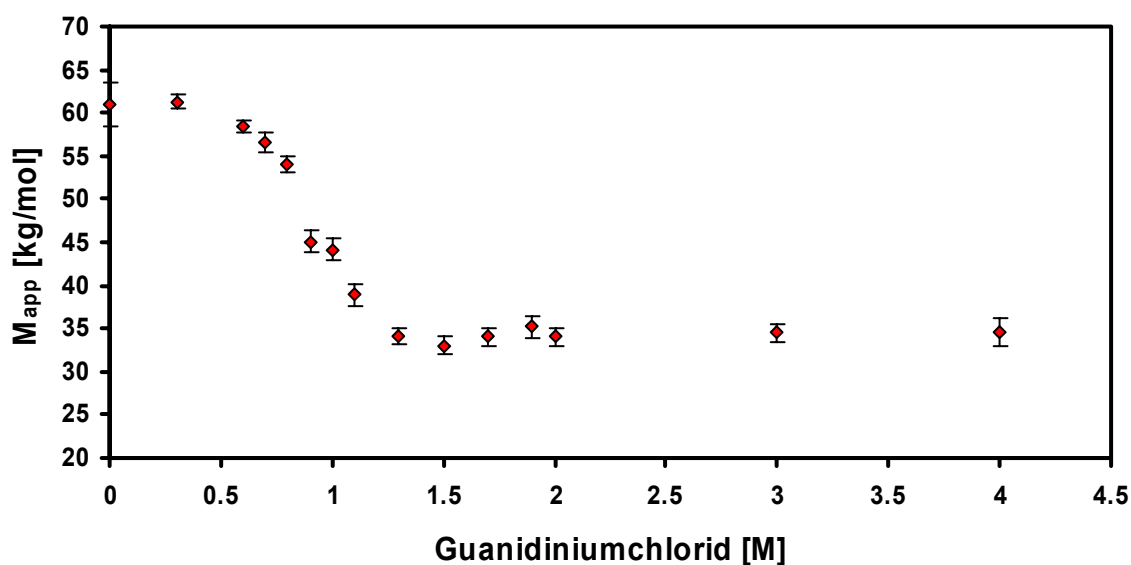


Abbildung 38: Denaturierungskurve von *DraSSB*. Dargestellt sind die aus Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimenten in der analytischen Ultrazentrifuge bei 16000 rpm ermittelten apparenten Molmassen. Eingesetzt wurden 3.1 μ M *DraSSB* in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Guanidiniumchlorid in 0.3M NaCl-Standardpuffer bei 20°C.

Die Denaturierung von *DraSSB* zeigt im Bereich zwischen 0.5 M und 1.5 M Guanidiniumchlorid einen Übergang der apparenten Molmasse von 61($\pm$ 2.5) kg/mol zu 34 ($\pm$ 1) kg/mol (bei [GuaHCl]=2 M). Dies entspricht dem Zerfall von *DraSSB*-Dimeren in Monomere. Für die apparenten Molmassen im Übergangsbereich zwischen Dimer und Monomer wurden unter Annahme eines Alles-oder-Nichts-Überganges zwischen gefaltetem Dimer und ungefaltetem Monomer und der Annahme, dass die apparente Molmasse ein lineares Maß für den Umwandlungsgrad ist, die Assoziationsgleichgewichtskonstanten K_{Ass} der Entfaltung und daraus die Denaturierungsenthalpien $\Delta G^{0,[GuaHCl]}$ bestimmt (vgl. 2.3.5). Die lineare Extrapolation dieser $\Delta G^{0,[GuaHCl]}$ -Werte auf eine Guanidiniumchlorid-

konzentration von 0 M ergab einen Wert von $\Delta G^{0,0} \approx 50\text{-}80 \text{ kJ/mol}$ für die Denaturierung des *DraSSB*s. Das entspricht einer Denaturierungsenthalpie pro Aminosäurerest (*DraSSB*-Dimer) von $\Delta G^{0,0}_{(\text{Rest})} \approx 0.08\text{-}0.13 \text{ kJ/mol}$. Dieser Wert ist deutlich niedriger als der für *EcoSSB* bestimmte Wert von $\Delta G^{0,0} \approx 177 \text{ kJ/mol}$ bzw. $\Delta G^{0,0}_{(\text{Rest})} \approx 0.25 \text{ kJ/mol}$ im Tetramer (Misselwitz *et al.*, 1995) und könnte darauf hindeuten, dass in *DraSSB* nach der Monomerisierung im Bereich von 0.8 M Guanidiniumchlorid noch gefaltete Reststrukturen existieren, deren Anteil an der bestimmten Denaturierungsenthalpie fehlt.

Aus diesem Grund wurden Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente mit *DraSSB* in Anwesenheit von Guanidiniumchlorid durchgeführt. Diese zeigen jedoch neben dem Übergang vom s-Wert des Dimers zu dem des Monomers im bereits in den Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimenten beobachteten Konzentrationsbereich keine weitere Änderung im Sedimentationsverhalten bei höheren Konzentrationen von Guanidiniumchlorid (nicht gezeigt). Damit kann das Vorliegen großer gefalteter Bereiche in *DraSSB* bei Guanidiniumchlorid-Konzentrationen oberhalb des Dimer-Monomer-Übergangs nahezu ausgeschlossen werden.

Die Abwesenheit dieser Reststrukturen legt den Schluss nahe, dass der niedrige Wert für $\Delta G^{0,0}$ aus einer Verletzung des Alles-oder-Nichts Modells resultiert und weist so darauf hin, dass die Entfaltung über mehrere Zustände verläuft.

Titration von poly(dT) mit *DraSSB* in der analytischen Ultrazentrifuge

Um zu überprüfen ob *DraSSB* an einzelsträngige DNA bindet, wurde in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten poly(dT) mit *DraSSB* titriert. Dazu wurde für verschiedene eingesetzte Verhältnisse von Nukleotiden und *DraSSB* der s-Wert der sedimentierenden Spezies bestimmt (vgl. 2.3.5). Bei der Bindung von *DraSSB* an die Einzelstrang-DNA nimmt der Sedimentationskoeffizient des entstehenden Komplexes aus ssDNA und *DraSSB* mit steigendem Besetzungsgrad der DNA zu. Ist die gesamte Nukleinsäure mit SSB besetzt, tritt freies *DraSSB* auf, das mit etwa $s_{20,w} = 4 \text{ S}$ sedimentiert und als zweite Grenzschicht erkennbar ist.

Die mit dem Programm BPCFit (Kindler, 1997) ermittelten Sedimentationskoeffizienten der poly(dT)-haltigen Grenzschicht wurden gegen das eingesetzte molare Verhältnis aufgetragen (Abbildung 39).

Die Zunahme des s-Wertes der poly(dT)-haltigen Grenzschicht mit steigendem molaren Verhältnis kann nur durch Bindung des *DraSSB* an das poly(dT) erklärt werden. Die Sättigung tritt bei einer Stöchiometrie von ca. 50 Nukleotiden pro *DraSSB* ein (Abbildung 39, durch Pfeil markiert). Etwa ab diesem Punkt ist auch eine

zusätzliche Grenzschicht von freiem *Dra*SSB zu beobachten, die mit 4 S sedimentiert.

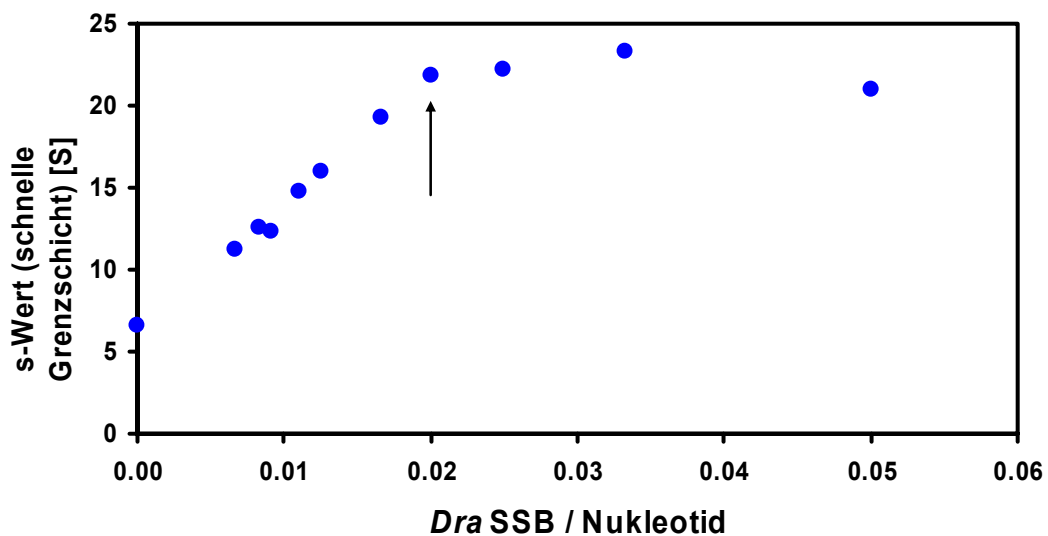


Abbildung 39: Titration von poly(dT) mit *Dra*SSB in der analytischen Ultrazentrifuge (0.3 M NaCl-Standardpuffer bei 20°C). Aufgetragen ist der s-Wert der poly(dT)-haltigen Grenzschicht gegen das eingesetzte molare Verhältnis. Die Daten stammen aus verschiedenen Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten mit einer Konzentration von ca. 25 μ M poly(dT). Zur besseren Illustration wurde am Sättigungspunkt ein Pfeil eingezeichnet. Das Experiment wurde mit Studentengruppen im Kurs „Analytische Ultrazentrifugation 2003“ durchgeführt.

Das durchgeführte Experiment deutet weiterhin darauf hin, dass die Kooperativität der Bindung von *Dra*SSB an poly(dT) nicht sehr hoch ist. Bei sehr hoher Kooperativität würde man bei Unterschuss von *Dra*SSB zwei poly(dT)-haltige Spezies in der Sedimentation erwarten: Zum einen würde gesättigtes poly(dT) mit hochkooperativ gebundenem *Dra*SSB auftreten und daneben freies poly(dT), dass erst bei höheren Stöchiometrien von *Dra*SSB besetzt wird.

3.3.3 Fluoreszenztitrationen

Die Tryptophan-Fluoreszenz von *Dra*SSB und *Taq*SSB wird bei der Bindung an einzelsträngige Nukleinsäuren zu ca. 85 % gelöscht. Daher kann diese Wechselwirkung durch Fluoreszenztitrationen charakterisiert werden. Dazu wurden inverse Titrations durchgeführt, d.h. der Ligand (SSB) wird vorgelegt und mit dem Gitter (Nukleinsäure) titriert (vgl. 2.3.2). Unter der Annahme einer mäßig kooperativen Bindung ($\omega=150$) wie sie für *Eco*SSB beschrieben wurde (Greipel *et al.*, 1987) und der Berücksichtigung der bei der Bindung eines mehrzähligen Liganden an ein lineares Gitter (ssDNA) auftretenden Lückenproblematik, kann mit dem Modell

nach Schwarz und Watanabe (1983) die Bedeckungslänge des SSBs und die Bindungsaffinität ermittelt werden (siehe 2.3.2).

Da für *EcoSSB* schon gezeigt wurde, dass die Anwesenheit von Tween in Fluoreszenztitrationskurven die Stabilität des Proteins in Lösung erhöht (Curth *et al.*, 1991), wurde zunächst der Einfluss des Detergens Tween20 auf die Titrationskurven überprüft. Dabei konnte sowohl für *DraSSB* als auch für *TaqSSB* ohne Tween20 eine Trübung der Lösung durch denaturiertes Protein erkannt werden, die den gemessenen Titrationsverlauf beeinflusst (nicht gezeigt). In Gegenwart von 100 ppm Tween20 zeigte sich keine erkennbare Trübung der Titrationslösungen, eine Erhöhung der Tween20-Konzentration auf 500 ppm hatte keinen weiteren Einfluss (nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurden alle Fluoreszenztitrationskurven in Gegenwart von 100 ppm Tween20 durchgeführt.

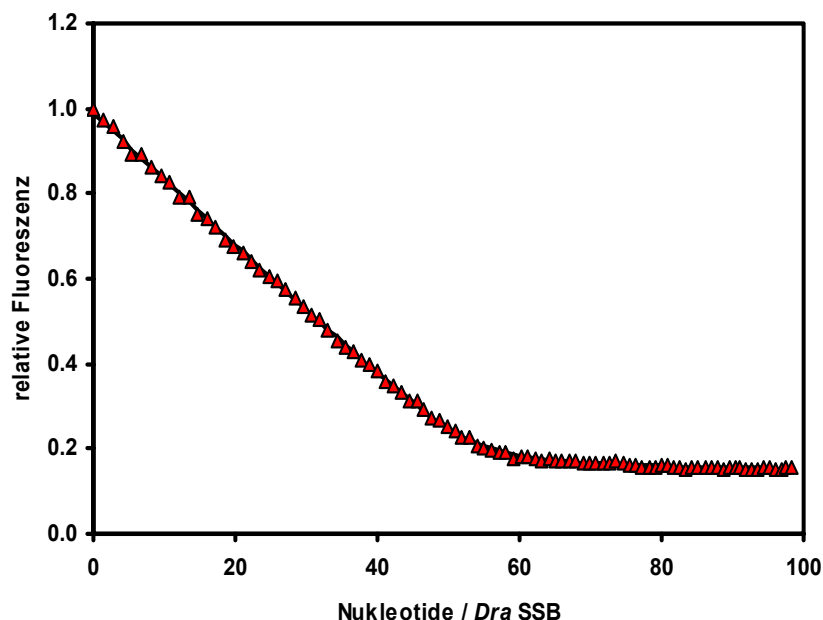


Abbildung 40: Inverse Titration von $0.38 \mu\text{M}$ *DraSSB* mit poly(dT) in 0.3 M NaCl-Standardpuffer (100 ppm Tween20) bei 22°C . Auftragung der relativen Fluoreszenz der Tryptophanreste gegen das molare Verhältnis. ($\blacktriangle$)=Messpunkte, die Linie stellt die theoretische Bindungsisotherme mit $n=53.4 (\pm 0.7) \text{ nt/DraSSB}$ und $\omega \cdot K=1.3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ dar. Die Messwerte wurden mit dem Modell nach Schwarz und Watanabe (1983) unter der Annahme einer moderaten Kooperativität ($\omega=150$) ausgewertet (BPCFit).

Bei der Bindung von *DraSSB* an poly(dT) zeigt sich eine Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz von ca. 85 % (Abbildung 40). Die mit dem Modell von Schwarz und Watanabe (1983) erhaltene Bedeckungslänge liegt bei 53.4 Nukleotiden pro *DraSSB*.

Die Bindungskonstante für *Dra*SSB bzw. *Taq*SSB und poly(dT) ist sehr groß, und somit ist in der Titrationskurve eine fast lineare Abnahme der Fluoreszenz bis zum Äquivalenzpunkt zu beobachten. Für die Affinität kann daher mit $\omega \cdot K_{\text{Ass}} > 10^8 \text{ M}^{-1}$ nur eine untere Grenze angegeben werden.

Um die Affinität verschiedener SSB-Proteine gegenüber Nukleinsäure zu vergleichen, kann als Modells substanz eine Ribonukleinsäure gewählt werden, da hier die Bindung schwach genug ist, um sie messen zu können. Um Aussagen über die unterschiedlichen Affinitäten zu machen, wurden *Dra*SSB und *Taq*SSB bei 0.2 M NaCl und 20 mM KP_i pH 7.4 mit poly(rU) titriert. Für *Eco*SSB liegt die Affinität der poly(rU)-Bindung bei $\omega \cdot K_{\text{Ass(rU)}} = 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Lohman *et al.*, 1986). Die aus den Titrationsen mit *Dra*SSB und *Taq*SSB ermittelten Affinitäten liegen im Bereich von $\omega \cdot K_{\text{Ass(rU)}} = 1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (*Dra*SSB) bzw. $\omega \cdot K_{\text{Ass(rU)}} = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (*Taq*SSB) und befinden sich damit in der gleichen Größenordnung wie die für *Eco*SSB bestimmte Affinität (Daten nicht gezeigt).

Abhängigkeit der DNA-Bindung von der Ionenstärke

Für *Eco*SSB wurden mindestens zwei diskrete Bindungsmodi beschrieben, zum einen der Hochsalzmodus mit 65 nt/SSB und zum anderen der Niedrigsalzmodus mit 35 nt/SSB (Lohman und Overman, 1985). Um zu überprüfen, ob auch *Dra*SSB und *Taq*SSB derartig ausgeprägte Bindungsmodi zeigen, wurden inverse Fluoreszenztitrationsen der beiden Proteine mit poly(dT) unter den entsprechenden Hochsalz- (0.3 M NaCl-Standardpuffer) und Niedrigsalzbedingungen (5 mM NaCl, 5 mM KP_i) durchgeführt. Die Messwerte wurden wie beschrieben mit dem Modell nach Schwarz und Watanabe (1983) unter Annahme einer mäßigen Kooperativität ausgewertet (Tabelle 6). Dabei wurden für eine Salz-Konzentration jeweils mehrere Datensätze gemeinsam ausgewertet (*global-fit*).

Tabelle 6: Für die Bindung von *Dra*SSB bzw. *Taq*SSB an poly(dT) bestimmte Bedeckungslängen bei verschiedenen Ionenstärken (Hochsalz: 0.3M NaCl, 20 mM KP_i pH 7.4; Niedrigsalz: 5 mM NaCl, 5 mM KP_i pH 7.4; beide Puffer enthielten 100 ppm Tween20)

Protein	Bedeckungslänge (Hochsalz) (Nukleotide/SSB)	Bedeckungslänge (Niedrigsalz) (Nukleotide/SSB)
<i>Dra</i> SSB	54.8 ± 1.4	47.2 ± 2
<i>Taq</i> SSB	54.0 ± 2	48.6 ± 1.6

Die Bedeckungslängen von *Dra*SSB und *Taq*SSB sind im Rahmen der Fehlertoleranzen für die jeweilige Ionenstärke gleich. Die Bedeckungslängen beider Proteine in Hoch- und Niedrigsalzpuffer unterscheiden sich um etwa 7 nt/SSB. Für *Eco*SSB wurde hingegen im Hochsalz ein Bindungsmodus mit einer Bedeckungslänge von 65 und im Niedrigsalz von 35 Nukleotiden pro SSB gefunden (Lohman und Overman, 1985). Sowohl *Dra*SSB als auch *Taq*SSB zeigen unter diesen Salzbedingungen also keine deutlich unterschiedlichen Bindungsmodi.

3.3.4 Bindungskinetik an poly(dT)

Wie schon bei den Fluoreszenztitrationen beschrieben wurde, wird durch Bindung der SSB-Moleküle an die ssDNA die Tryptophan-Fluoreszenz zu etwa 85% gelöscht. Die zeitliche Änderung dieser Fluoreszenzlöschung während der Reaktion kann zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten ausgenutzt werden. Da die Reaktion sehr schnell ist, bietet sich das schnelle Mischverfahren eines Fluoreszenz-*Stopped-Flow* als experimentelle Methode an (vgl. 2.3.3). Für die Messung wurden in einer solchen *Stopped-Flow*-Apparatur jeweils die Lösung des entsprechenden SSB-Proteins und eine poly(dT)-Lösung miteinander gemischt, so dass ein Verhältnis von $n=55$ nt/SSB daraus resultierte (Sättigung, vgl. 3.3.3). Als Signal wurde die Fluoreszenzänderung als Funktion der Zeit verfolgt. Die Experimente wurden unter Hochsalzbedingungen bei 20°C mit einer Konzentrationsreihe (12 nM-0.8 μ M SSB) durchgeführt und die Einzelmessungen bei einer Konzentration akkumuliert. Die Daten konnten mit einem Modell für eine einfache bimolekulare Assoziation nicht hinreichend beschrieben werden, daher wurde das für *Eco*SSB beschriebene Bindungsmodell (Urbanke und Schaper, 1990) für die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten verwendet. Die Auswertung erfolgte durch simultane Anpassung der theoretischen Kurven des Modells an alle Messdaten (*global-fit*, zum Modell vgl. auch 2.3.3). Abbildung 41 zeigt die Messdaten und die mit dem Programmpaket BPCFit (Kindler, 1997) erhaltenen theoretischen Kurven der Bindung von *Dra*SSB an poly(dT).

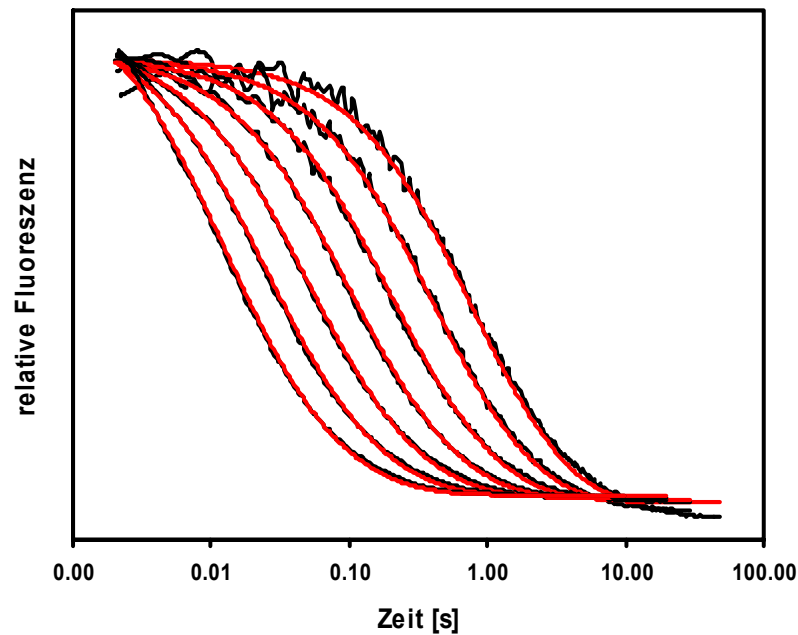


Abbildung 41: Kinetik der Fluoreszenzlöschung bei der Bindung von DraSSB an poly(dT). Die schwarzen Kurven stellen die akkumulierten Messwerte unterschiedlicher Konzentrationen bei gleichem eingesetzten Verhältnis ($n=55$ nt/SSB) dar. Die roten Linien sind die theoretischen Kurven für eine Bindung nach dem Modell von Urbanke und Schaper (1990) mit den Parametern $\omega=150$, $k_{12}=2.1(\pm 0.3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Amplituden der Kurven wurden zur besseren Darstellbarkeit normiert. [DraSSB]: ganz links $0.8 \mu\text{M}$, ganz rechts 12.5 nM , Verdünnungen jeweils um den Faktor 2. ($\lambda_{\text{Exc}}=295 \text{ nm}$, Emissionsfilter WG320, Puffer 0.3 M NaCl , 20 mM KP_i pH 7.4, 100 ppm Tween20 , 20°C)

Die Assoziation von DraSSB und poly(dT) verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{12}=2.1(\pm 0.3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nahezu diffusionskontrolliert. Für TaqSSB und poly(dT) ergab sich mit $k_{12}=2.2(\pm 0.4) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine fast identische Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (Daten nicht gezeigt). Beide Werte stimmen gut mit der für die Bindung von EcoSSB an poly(dT) bestimmten Assoziationsgleichgewichtskonstanten von $k_{12}=2.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ überein (Urbanke und Schaper, 1990).

3.3.5 DNA-Schmelzexperimente

Der Einfluss von DraSSB und TaqSSB auf das Schmelzverhalten doppelsträngiger DNA wurde in Schmelzexperimenten mit poly(dA·dT) untersucht. Dazu wurden jeweils $38 \mu\text{M}$ poly(dA·dT) mit einem Überschuss der SSB Proteine ($n=11$ nt/SSB) gemischt und die Absorptionsänderung bei $\lambda=260 \text{ nm}$ wurde während der Temperaturänderung verfolgt (vgl. 2.3.1). Während poly(dA·dT) bei der verwendeten

Ionenstärke (75 mM NaCl, 20 mM KPi) etwa bei $T_m=58^\circ\text{C}$ schmilzt, wird der Schmelzpunkt in Anwesenheit der SSB-Proteine deutlich gesenkt (Abbildung 42).

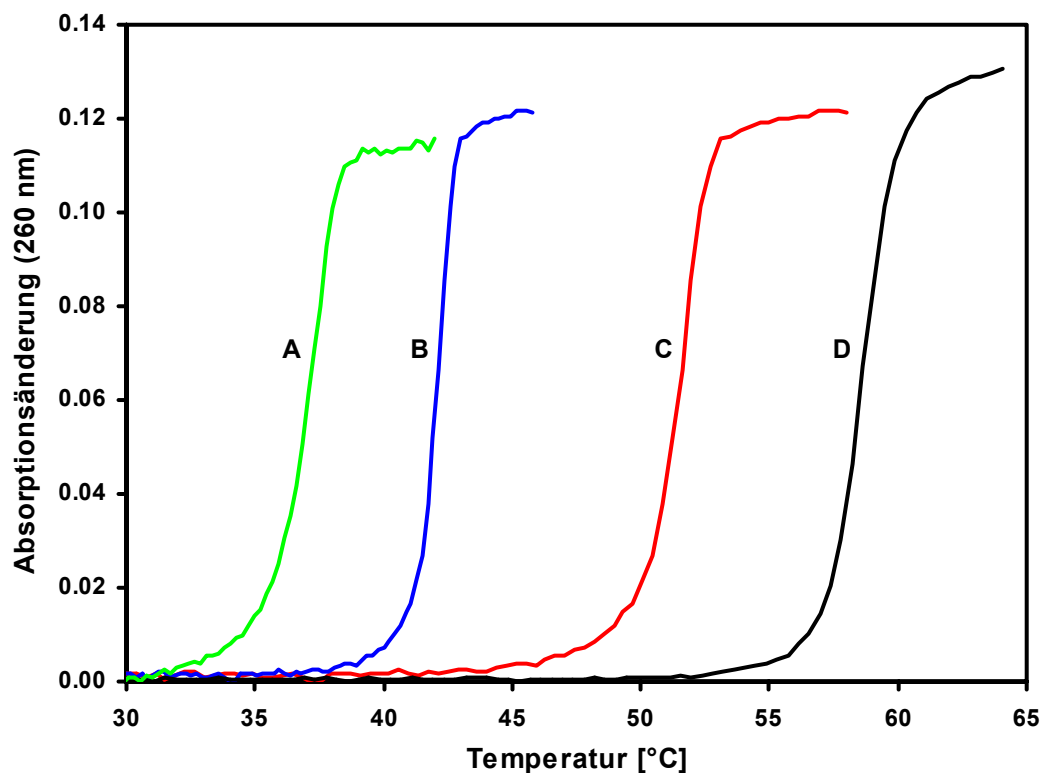


Abbildung 42: DNA-Schmelzexperimente: 38 μM poly(dA·dT) alleine (—, D) und in Anwesenheit von EcoSSB (—, A), DraSSB (—, B) und TaqSSB (—, C). Eingesetzt wurden jeweils 11,5 nt/SSB in 75 mM NaCl, 20 mM KPi pH 7,4 bei einer Heizrate von 20 K/h. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der Aufheizphase und den Kurven der Abkühlphase, dargestellt sind die gemittelten Daten einer Aufheiz- und Abkühlphase.

DraSSB und TaqSSB senken bei gleichem eingesetzten molaren Verhältnis den Schmelzpunkt von poly(dA·dT) auf ca. 42°C bzw. 52°C ab. Eine noch stärkere Erniedrigung des Schmelzpunktes bewirkt EcoSSB (36°C). Bei den Schmelzkurven mit DraSSB konnte wegen der Denaturierung des Proteins nur bis maximal 50°C erhitzt werden. Der Unterschied zwischen den beiden SSB-Proteinen der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe in der Schmelzpunktabsenkung von poly(dA·dT) ist im Vergleich zur hohen Homologie der beiden Proteine unerwartet groß.

3.3.6 Komplementationsexperiment mit DraSSB

In einem Komplementationsexperiment wurde überprüft, ob DraSSB EcoSSB *in vivo* ersetzen kann. Für dieses Experiment wird ein *E. coli*-Stamm benötigt, dessen chromosomales *ssb*-Gen deletiert ist. Da EcoSSB für die Zellen essentiell ist, können

sie nur überleben, wenn ein funktionsfähiges SSB auf einem Helfer-Plasmid in der Zelle vorliegt. Ein solcher Stamm (*E.coli* RDP268) mit zugehörigem Helferplasmid (pACYCSSB) wurde bereits beschrieben (Porter *et al.*, 1990) und wird im Komplementationsexperiment mit *Dra*SSB verwendet.

Für das Experiment musste zunächst das Gen für *Dra*SSB hinter einen Promotor kloniert werden, der in RDP268 nicht reprimiert wird. Dazu wurde das *Drassb*-Gen mittels PCR amplifiziert (Primer: *Dra*SSBEcoRI-1+2, vgl.2.1.4) und über die *Eco*RI-Schnittstellen in den Vektor pSF1 kloniert, dessen *Eco*ssb-Gen durch die *Eco*RI-Spaltung entfernt wurde. Die Sequenz des so erhaltenen Plasmids pSF1-*Dra*SSB wurde anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Expression des *ssb*-Gens in pSF1 steht unter der Kontrolle des λ -Promotors. Da dieser in RDP268 nicht reprimiert wird, sollte das SSB-Protein konstitutiv exprimiert werden. Um zu überprüfen, ob das *Drassb*-Gen in *E.coli* RDP268 exprimiert wird, wurden Gesamtzellextrakte des transformierten Stamms auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Größe getrennt und im Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen (vgl. 2.2.10). Die immunologische Detektion mit einem Anti-*Eco*SSB-Antikörper zeigte sowohl eine Expression des *Eco*SSBs (18 kDa) als auch des *Dra*SSBs (32 kDa), die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe gut unterscheiden lassen (nicht gezeigt).

Im Fall einer Komplementation durch *Dra*SSB wird die Verdrängung des *Eco*SSBs aus den Zellen durch den Wegfall des Selektionsdrucks auf pACYCSSB ermöglicht, da in Abwesenheit von Chloramphenicol inkubiert wird. Die Kultur wurde wiederholt in Medien mit Ampicillin (pSF1-*Dra*SSB trägt Ampicillin-Resistenz) und Kanamycin (RDP268 trägt Kanamycin-Resistenz) überimpft (vgl. 2.2.13), und anschließend wurde ein Aliquot der Kultur auf eine LB-Agar-Platte (Kanamycin+Ampicillin) ausgestrichen. 40 der erhaltenen Klone wurden einzeln auf eine LB-Agar-Platte (Kanamycin+Ampicillin) und auf eine LB-Agar-Platte (Kanamycin, Chloramphenicol, Ampicillin) übertragen. Von den so übertragenen Klonen konnten nur zwei auf der Platte mit allen drei Antibiotika wachsen. Diese beiden Klone trugen offensichtlich noch eine Resistenz gegen Chloramphenicol, vermutlich auf dem nicht verdrängten pACYCSSB-Plasmid. Die anderen 38 Klone konnten nicht auf Chloramphenicol wachsen, was die Abwesenheit von pACYCSSB nachweist. Zur weiteren Kontrolle, ob diese Klone nicht dennoch *Eco*SSB exprimieren, wurden daraus LB-Kulturen angezogen und die Gesamtzellextrakte auf einem Tricin-Gel (vgl. 2.2.6) nach Größe getrennt und im Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Die

immunologische Detektion erfolgte mit einem Anti-*EcoSSB*-Antikörper. Als Positiv-Kontrolle für die *EcoSSB*-Expression dient in diesem Fall ein Gesamtzellextrakt von RDP268(pACYCSSB).

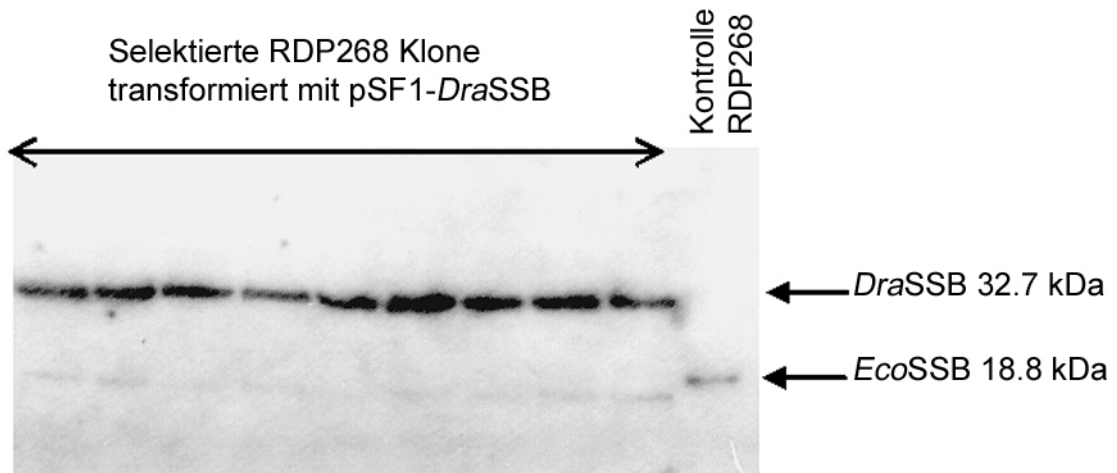


Abbildung 43: Western-Blot von Gesamtzellextrakten der selektierten Klone von RDP268(pSF1-*DraSSB*), die nach mehrfachem Überimpfen kein Wachstum mehr auf Chloramphenicol-Platten zeigten. (1.Ak.: Kaninchen-Anti-*EcoSSB*, Röntgenfilm nach Inkubation mit CDPStar). Rechts: RDP268(pACYCSSB) als Kontrolle für die *EcoSSB*-Expression. Im Unterschied zu den selektierten Klonen wurde hier nur 1/10 der Zellmenge aufgetragen.

Die Western-Blot-Analyse (Abbildung 43) zeigt deutlich die in RDP268(pSF1-*DraSSB*) vorhandene Expression von *DraSSB* (oberer Pfeil, 32.7 kDa). Auf Höhe des *EcoSSBs* (Kontrolle, unterer Pfeil, 18.8 kDa) ist in den Zellextrakten der transformierten Stämme trotz Auftrag einer 10-fach höheren Zellmenge keine mit dem Anti-*EcoSSB*-Antikörper nachweisbare Bande zu erkennen. Dies zeigt die Abwesenheit von *EcoSSB* in diesen Klonen. In den Zellextrakten dieser Klone ist aber eine weitere Bande (kleiner als *EcoSSB*) mit dem Antikörper nachweisbar. Das ist wahrscheinlich auf eine schwache Kreuzreaktivität des Antikörpers zurückzuführen, die aufgrund der großen aufgetragenen Proteinmenge sichtbar wird. Da die Affinität des Anti-*EcoSSB*-Antikörpers zu *EcoSSB* höher ist als zu *DraSSB*, kann gefolgert werden, dass kein *EcoSSB* in RDP268(pSF1-*DraSSB*) exprimiert wird. Somit muss das *DraSSB* in der Lage sein die Funktionen des *EcoSSB in vivo* zu übernehmen, da die Zellen in Abwesenheit eines SSB-Proteins nicht überleben könnten (Porter *et al.*, 1990).

3.3.7 Wechselwirkung des C-Terminus von *DraSSB* mit χ

Da das SSB aus *D.radiodurans* offensichtlich in der Lage ist *EcoSSB in vivo* zu ersetzen (vgl. 3.3.6) ist es wahrscheinlich, dass auch die Wechselwirkungen

zwischen *EcoSSB* und anderen Proteinen (vgl. 1.3.2) von *DraSSB* aufrechterhalten werden können. Diese These wird zudem auch durch die große Homologie im C-terminalen Bereich der beiden Proteine unterstützt. Für diesen Bereich der letzten 10 Aminosäuren wurde bei *EcoSSB* z.B. die Interaktion mit der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III gezeigt (vgl. 3.1). Um die funktionelle Interaktion des *DraSSB*s mit dem χ -Protein aus *E.coli* zu untersuchen wurden Bindungsstudien mit den Proteinen durchgeführt. Da eine Interaktion zweier reagierender Spezies zu einem Komplex führt, dessen Masse größer ist als die der Einzelkomponenten, bieten sich für diese Untersuchungen Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge an (vgl. 2.3.5 und 3.1.1). Die $c(s)$ -Verteilungen von Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten mit *DraSSB* in An- und Abwesenheit von χ sind in Abbildung 44 verglichen.

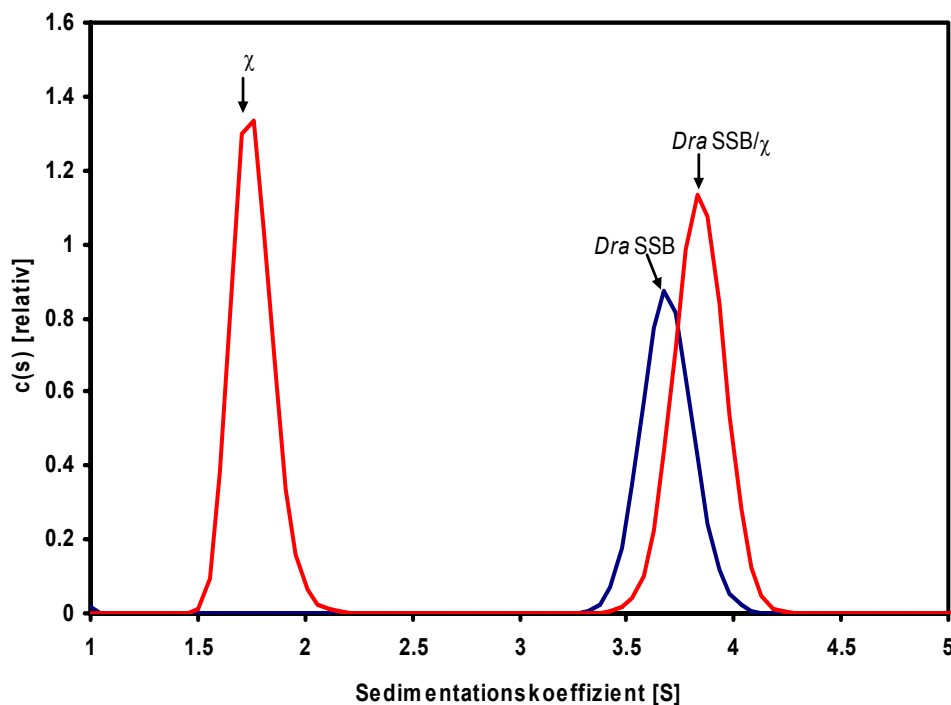


Abbildung 44: $c(s)$ -Verteilungen aus Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten in der analytischen Ultrazentrifuge. Gezeigt sind die $c(s)$ -Verteilungen der Sedimentation von $3\ \mu\text{M}$ *DraSSB* (—), und $3\ \mu\text{M}$ *DraSSB* in Gegenwart von $12\ \mu\text{M}$ χ (—), in $0.3\ \text{M}$ NaCl-Standardpuffer (Beckmann XL-A, Rotor An-50Ti, 50000rpm, 20°C , Ausgewertet mit Sedfit, vgl. 2.3.5).

Der Peak der schnellen Grenzsicht (*DraSSB*) wird in Gegenwart von χ von etwa 3.6 S auf etwa 3.8 S verschoben. Diese Verschiebung und die Vergrößerung der Fläche unter dem Peak ist nur durch eine Massenzunahme der schneller sedimentierenden Spezies zu erklären, die durch eine Interaktion zwischen χ und *DraSSB* hervorgerufen wird. Ein unter gleichen Bedingungen durchgeführtes

Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit *Taq*SSB in An- und Abwesenheit von χ zeigte ein ähnliches Ergebnis, auch hier konnte eine Verschiebung des Peaks und eine Zunahme der Fläche unter dem Peak der schnell sedimentierenden Spezies beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Bindung von χ durch die speziesfremden SSB-Proteine aus *Deinococcus* und *Thermus* zeigt ein speziesübergreifendes Bindungsmotiv der SSB-Proteine.

3.3.8 Proteinkristallisation

Da die SSBs der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe eine neue strukturelle Gruppe von dimeren SSBs innerhalb der bakteriellen SSB-Proteine bilden, ist die Auswirkung der Genduplikation auf ihre Struktur im Vergleich zur bereits bekannten *Eco*SSB-Struktur (Raghunathan *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1997) von besonderem Interesse.

Um die Struktur von *Taq*SSB und *Dra*SSB durch Röntgenstrukturanalyse bestimmen zu können, werden Kristalle der jeweiligen Proteine benötigt. Sehr hoch konzentrierte Proteinlösungen beider SSBs wurden daher in *Screenings* für die Proteinkristallisation eingesetzt (vgl. 2.3.6). Diese hohen Konzentrationen konnten durch Dialyse der Protein-Stammlösungen gegen einen Puffer mit 0.5 M NaCl, 50 mM Tris pH 7.5 und 10% (w/v) Glycerin erhalten werden. Die nach der Dialyse bestimmte Proteinkonzentration lag dabei zwischen 7 mg/ml und 15 mg/ml.

Beide Proteine wurden unter zahlreichen Bedingungen sowohl im *sitting-drop* als auch im *hanging-drop*-Verfahren eingesetzt (vgl. 2.3.6). Dabei wurde *Dra*SSB unter allen getesteten Bedingungen bei 4°C inkubiert, während die *Taq*SSB-Ansätze bei 20°C inkubiert wurden. Die Ansätze mit den einzelnen Kristallisationsbedingungen wurden in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop untersucht und die (eventuelle) Kristallbildung bewertet. Bedingungen die Kristallbildung zeigten, wurden für feiner abgestufte *Screenings* verwendet.

Sowohl *Dra*SSB als auch *Taq*SSB zeigten die Bildung von Kristallen in der Anwesenheit geringer Konzentrationen an Polyethylenglykolen kleiner bis mittlerer Molmasse (PEG2000-PEG8000) und bei pH-Werten, die meist in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Proteine lagen. Während *Dra*SSB hauptsächlich sehr feine nadelförmige Kristallen bildete, die für die Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet sind, zeigte *Taq*SSB unter einigen Bedingungen quaderförmiges Kristallwachstum mit relativ großen Kristallen (vgl. Abbildung 45).

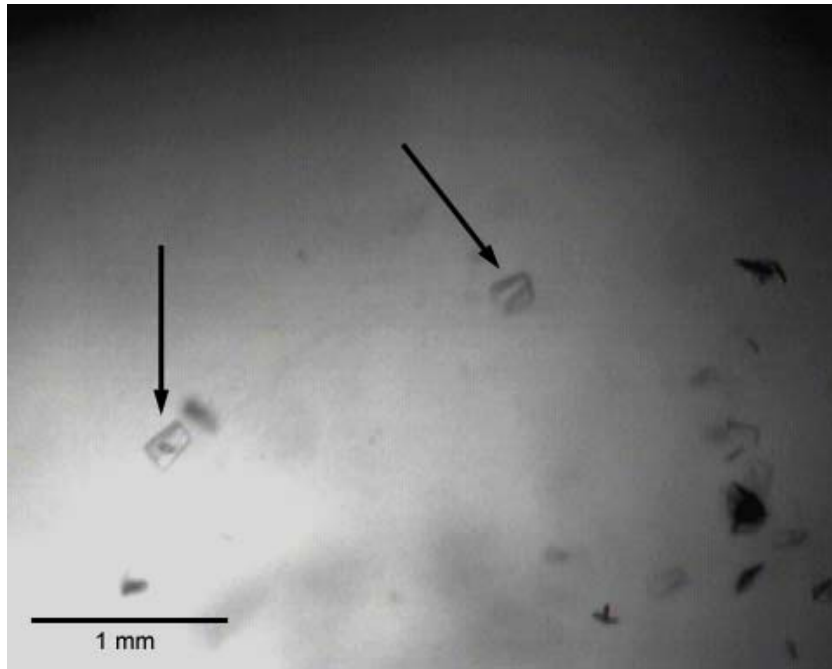


Abbildung 45: Lichtmikroskopische Aufnahme von TaqSSB-Kristallen. Die quaderförmigen TaqSSB-Kristalle (durch Pfeile markiert) sind in der längsten Ausdehnung etwa 0.2 mm lang (Bedingungen: 4% (w/v) PEG8000, 50 mM HEPES pH 6.6, 20°C, Endkonzentration 4mg/ml TaqSSB).

Die gezüchteten TaqSSB-Kristalle sind bereits groß genug um in ersten Streuexperimenten verwendet werden zu können. Eine weitere Optimierung der Kristallisationsbedingungen ist jedoch notwendig, da derzeit nur einige wenige Kristalle in verwendbarer Größe zur Verfügung stehen und die *Screenings* zur Wahl des *Cryo-Protectants* zum Einfrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff noch nicht beendet sind. Zudem ergeben größere Kristalle meist auch bessere Daten in den Streuexperimenten, weshalb weiterhin versucht wird die Kristallgröße zu optimieren.

4 Diskussion

4.1 Wechselwirkung zwischen *EcoSSB* und der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III

Die Interaktion von *EcoSSB* mit der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III erfolgt über die letzten Aminosäuren des C-Terminus von *EcoSSB*. Dies wurde sowohl durch Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge (vgl. 3.1.1) als auch durch Oberflächenplasmonresonanz-Experimente mit dem Biacore-Gerät (vgl. 3.1.2) gezeigt.

Der s-Wert von Wildtyp-*EcoSSB* nimmt in Anwesenheit von χ in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten deutlich zu und zeigt somit eine Interaktion der beiden Proteine an. Auch im SPR-Experiment ist eine deutliche Zunahme des RU-Signals bei Bindung von χ an den *EcoSSB*-Chip beobachtet worden. Dagegen zeigten die Experimente mit der carboxyterminal verkürzten Mutante *EcoSSB* Q152* weder in der analytischen Ultrazentrifuge noch in SPR-Experimenten eine Bindung von χ , was auf die essentielle Funktion dieses C-terminalen Bereichs für die Protein-Protein-Interaktion hindeutet. Die im SPR-Experiment mit der Mutante *EcoSSB* P176S beobachtete drastische Reduzierung der Bindung von χ schränkt den Bereich der Bindung auf die letzten Aminosäuren des C-Terminus von *EcoSSB* ein. Für diesen Bereich mit dem Consensus-Motiv DDDIPF wurden auch schon andere Wechselwirkungen beschrieben wie z.B. die Wechselwirkung von *EcoSSB* mit der Exonuklease I (Genschel *et al.*, 2000).

Die Interaktion zwischen *EcoSSB* und χ ist unter Hochsalzbedingungen (0.3 M NaCl) unabhängig von der Anwesenheit einzelsträngiger DNA. Die aus den Titrationen in der analytischen Ultrazentrifuge für die Bindung von χ an *EcoSSB* bestimmten Assoziationsgleichgewichtskonstanten in An- und Abwesenheit von ssDNA (beide: $K_{\text{Ass}}=4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) stimmen gut mit den in SPR-Experimenten ermittelten Daten überein, in denen Assoziationsgleichgewichtskonstanten von $K_{\text{Ass}}=3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (ohne ssDNA) und $K_{\text{Ass}}=4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (mit ssDNA) erhalten wurden. Im Gegensatz dazu sind die aus den SPR-Experimenten ermittelten Stöchiometrien uneinheitlich. Während sie in Abwesenheit von ssDNA bei $n=2.2 \chi/\text{EcoSSB}$ liegt, ist die Stöchiometrie in Anwesenheit von ssDNA mit $n=4.4 \chi/\text{EcoSSB}$ doppelt so groß. Auch Kelman *et al.* (1998) beobachteten in SPR-Experimenten eine niedrigere Stöchiometrie in Abwesenheit von ssDNA ($n=2.2 \chi/\text{SSB}$) als in Anwesenheit von ssDNA ($n \sim 5 \chi/\text{SSB}$). Dieser offensichtliche Unterschied liegt vermutlich an der kovalenten

Kopplung des *Eco*SSBs an den SPR-Chip und der damit verbundenen möglichen Reduzierung von zugänglichen Bindungsstellen für χ . Im SPR-Experiment in Anwesenheit von ssDNA, in dem das SSB über seinen „natürlichen“ Liganden (ssDNA, über Biotin am SA-Chip gebunden) an den Chip gekoppelt wird, liegt die Stöchiometrie der Bindung etwa im Bereich von $n=4 \chi/\text{SSB}$, und gleicht somit der im homophasischen System der analytischen Ultrazentrifuge ermittelten Stöchiometrie (vgl. 3.1.1).

Im Gegensatz zu der im Hochsalzmodus beobachteten Unabhängigkeit der Bindung von der Anwesenheit von ssDNA zeigt sich bei der Bindung von χ an *Eco*SSB unter Niedrigsalzbedingungen (5 mM NaCl) ein deutlicher Einfluss der einzelsträngigen DNA. Während die Titration in der analytischen Ultrazentrifuge in Abwesenheit von ssDNA eine Assoziationsgleichgewichtskonstante von $K_{\text{ass}}=4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ lieferte, ist die in Anwesenheit von poly(dT) bestimmte Bindungskonstante mit $K_{\text{Ass}}=7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ in etwa 20-fach größer.

Die Experimente bei niedrigen Ionenstärken konnten mit dem SPR-Verfahren nicht zufrieden stellend durchgeführt werden, da die Messungen nicht auswertbare Daten ergaben (vgl. 3.1.2). Diese Effekte werden vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen (Carboxy-methyl-)Dextranmolekülen ausgelöst, deren Einfluss mit sinkender Ionenstärke wächst. Höchstwahrscheinlich sind diese ionischen Abstoßungseffekte auch der Grund dafür, dass das kovalent an das Dextran gekoppelte SSB keine (dT)₆₅-Bindung zeigt. Aus diesem Grund musste auf einen SA-Chip zur Kopplung von biotinyliertem (dT)₆₅ ausgewichen werden, um die Interaktion von χ und *Eco*SSB in Gegenwart von ssDNA zu untersuchen. Diese unspezifischen Wechselwirkungen mit der Matrix und die Reduzierung oder Denaturierung von Bindungsstellen durch kovalente Kopplung auf dem Chip sind generelle Probleme einer heterophasischen Methode wie der SPR-Technik.

Die ohne jegliche Kopplung auskommende Untersuchung der Interaktion in der analytischen Ultrazentrifuge stellt dagegen ein homophasisches System unter eindeutig beschriebenen physikalischen Bedingungen dar. Die in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführten Titrations mit nachfolgender Anpassung der Summe zweier Gaußfunktionen an die gemessenen *Scans* hat sich dabei als eine praktikable Methode zur Bestimmung der freien und gebundenen Ligandenkonzentrationen herausgestellt, die es ermöglicht die Bindungskonstante und die Stöchiometrie zu berechnen. Als Voraussetzung gilt hier aber, dass die untersuchte Reaktion sehr schnell im Vergleich zur Sedimentationsgeschwindigkeit sein muss. Zudem müssen

sich gebildetes Produkt und freier Ligand deutlich im Sedimentationskoeffizienten unterscheiden, um die gemessenen Daten verlässlich durch die Summe zweier Gaußfunktionen beschreiben zu können. Ist dies nicht der Fall, muss die Auswertung mit Hilfe der Anpassung der Lamm'schen Differentialgleichungen unter der Annahme zweier sedimentierender Spezies durchgeführt werden.

In den durchgeführten DNA-Schmelzexperimenten war zu beobachten, dass *EcoSSB* in Anwesenheit von χ stärker an poly(dA·dT) bindet (vgl. 3.1.3). Während die Anwesenheit von *EcoSSB* den Schmelzpunkt von poly(dA·dT) von etwa 59°C auf 42°C absenkt, bewirkt die zusätzliche Anwesenheit von χ im gleichen Experiment eine weitere Absenkung des Schmelzpunktes auf etwa 35°C. Das analoge Experiment mit der carboxyterminal verkürzten Mutante *EcoSSB* Q152* zeigt eine Erniedrigung des Schmelzpunktes von poly(dA·dT) auf ca. 27°C. Die Anwesenheit von χ hat jedoch keinen weiteren Einfluss auf das Schmelzverhalten. Eine Interaktion des χ -Proteins mit ssDNA konnte in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten nicht nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1). Die Beobachtung, dass χ nicht an einzelsträngige DNA bindet, stimmt mit den Ergebnissen von Kelman *et al.* (1998) und Glover und McHenry (1998) überein. Die Schmelzexperimente bestätigen dabei die zuvor in analytischer Ultrazentrifugation und SPR-Experimenten erhaltenen Ergebnisse, dass der C-terminale Bereich von SSB für die Wechselwirkung notwendig ist.

Offensichtlich haben *EcoSSB*-wt und χ gemeinsam in etwa den gleichen Effekt auf den Schmelzpunkt wie *EcoSSB* Q152* alleine. Der stärker Doppelstrang-DNA destabilisierende Effekt von *EcoSSB* Q152* wurde auf die Abwesenheit elektrostatischer Abstoßungen zwischen der DNA und dem negativ geladenen Carboxyterminalen Bereich zurückgeführt (Curth *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang könnte die Bindung von χ an den SSB-Carboxyterminus einen abschirmenden Effekt auf diese Ladungen haben und somit die Abstoßung zwischen den negativen Ladungen reduzieren. Diese verringerte Abstoßung resultiert in einer höheren Affinität des *EcoSSB* für ssDNA in Anwesenheit von χ und ermöglicht damit eine stärkere Destabilisierung des Doppelstrangs. Eine weitere Erklärung für diesen Effekt könnte die Inhibition der ssDNA Bindung durch den an die DNA-Bindungsstelle des SSBs gebundenen C-terminalen Bereich darstellen. Der C-terminale Bereich gleicht aufgrund seiner negativen Ladungen in gewisser Hinsicht der DNA und könnte durchaus als intramolekularer kompetitiver Inhibitor die Bindung von ssDNA

beeinflussen. Die Bindung von χ am C-terminalen Bereich würde diese Inhibition blockieren und die Bindung von ssDNA erleichtern.

Die erhöhte Affinität von *EcoSSB* und ssDNA in Anwesenheit von χ , steht im direkten Widerspruch zu der These, dass die *EcoSSB*- χ -Interaktion die Dissoziation des SSBs von der Einzelstrang-DNA begünstigt (Kelman *et al.*, 1998). Vielmehr sorgt die Interaktion zwischen χ und *EcoSSB* dafür, dass das SSB Protein stärker an die ssDNA gebunden wird. Dieser Effekt ist aus folgenden Gründen sinnvoll: Durch das Voranschreiten der DNA-Polymerase III auf dem *lagging-strand* werden dem der Polymerase nächstgelegenen SSB-Protein mehr und mehr gebundene Nukleotide entzogen. Da die Bindungsaffinität des *EcoSSB* mit kleiner werdender Länge des gebundenen Oligonukleotids drastisch sinkt (Lohman und Bujalowski, 1990), kann diese Verringerung der Affinität eine vorzeitige Dissoziation von SSB zur Folge haben. Freie einzelsträngige DNA kann sich jedoch schon innerhalb von Millisekunden in *Hairpins* falten (Riesner und Römer, 1973), die das Voranschreiten der Polymerase inhibieren können (Reckmann *et al.*, 1985). Eine durch die Interaktion mit der χ -Untereinheit der Polymerase vermittelte Erhöhung der Affinität von SSB zu ssDNA hätte den Effekt, dass das SSB solange gebunden bleibt, bis die voranschreitende Polymerase nur noch wenige Nukleotide vom nächsten SSB-Protein entfernt ist und somit die Ausbildung inhibierender Sekundärstrukturen verhindert würde. Die Interaktion zwischen SSB und χ sorgt somit für eine indirekte Erhöhung der Prozessivität der DNA-Polymerase am *lagging-strand*. Das stimmt gut mit den Resultaten von Kelman *et al.* (1998) überein, die beobachteten, dass die Prozessivität der DNA-Polymerase III in Abwesenheit von SSB erniedrigt ist. Umgekehrt bewirkt die in den Experimenten in der analytischen Ultrazentrifuge gezeigte Erhöhung der Affinität zwischen *EcoSSB* und χ durch Anwesenheit von ssDNA dafür, dass die χ -Untereinheit bevorzugt an SSB-Proteine bindet, die an einzelsträngige DNA gebunden sind. Somit bleibt die Polymerase am *lagging-strand* über die χ -Untereinheit ständig in Kontakt mit den SSB-Proteinen auf der ssDNA. Da sich sowohl *EcoSSB*, ssDNA und auch die χ -Untereinheit in einem gemeinsamen Komplex befinden, muss eine Erhöhung der Affinität von χ zu *EcoSSB* zwangsläufig auch zu einer Erhöhung der Affinität von *EcoSSB* zu ssDNA führen, wie die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen.

4.2 Die SSB-Proteine aus *T.aquaticus* und *D.radiodurans*

Die Gene für die SSB-Proteine aus *Deinococcus radiodurans* und *Thermus aquaticus* wurden kloniert, sequenziert und im pET-Expressionssystem erfolgreich exprimiert. Dabei konnte die in den Datenbanken annotierte Sequenz für *Taq*SSB bestätigt werden, während die für *Dra*SSB ermittelte Sequenz von der in der TIGR-Datenbank hinterlegten Sequenz (DR099) abwich. Die ursprünglich annotierte Sequenz enthielt im Gegensatz zu den Sequenzen der SSBs aus *Thermus* keine verdoppelte ssDNA-Bindungsdomäne und keinen konservierten C-terminalen Bereich. Die neue Sequenz des *Dra*SSB-Gens wurde an die EMBL-Datenbank übermittelt (EMBL DRA564860). Die aus dieser DNA-Sequenz übersetzte *Dra*SSB-Proteinsequenz ist im Gegensatz zur ursprünglichen Annotation homolog zu den SSBs aus *Thermus* sp. (vgl. 3.2.2). Damit erweisen sich Spekulationen über eventuelle *Frameshifts* bei der Transkription oder Translation (Lipton *et al.*, 2002), die zur Expression eines funktionellen SSB-Protein führen können, als falsch. Die neue *Dra*SSB-Sequenz wird auch durch Eggington *et al.* (2004) bestätigt.

Die Proteine *Dra*SSB und *Taq*SSB konnten nach Expression mit dem pET-System in *E.coli* und der folgenden Aufreinigung mit einer Reinheit von mehr als 95% erhalten werden. Die Größen der rekombinanten Proteine entsprechen den aus der Aminosäurezusammensetzung errechneten Größen (*Dra*SSB 32.7 kDa und *Taq*SSB 30 kDa). Durch immunologische Detektion mit einem *Eco*SSB-Antikörper konnte gezeigt werden, dass das rekombinante *Dra*SSB die gleiche Größe besitzt wie ein im Gesamtzellextrakt von *D.radiodurans* nachgewiesenes Protein (vgl. 3.2.3).

Sowohl *Dra*SSB als auch *Taq*SSB liegen in Lösung als Dimer vor, wie die Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge eindeutig zeigen konnten. Dieser Befund steht im Einklang mit den in Proteinquervernetzungsexperimenten (vgl. 3.3.1) auftretenden Dimer-Banden und den Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten (vgl. 3.3.2), anhand derer eine monomere Form von *Taq*SSB und *Dra*SSB aufgrund der Größe der Sedimentationskoeffizienten ausgeschlossen werden konnte. Die dimere Form von *Taq*SSB und *Dra*SSB wurde kürzlich bestätigt (Dabrowski *et al.*, 2002a; Eggington *et al.*, 2004).

Beide Proteine sedimentieren mit einem Sedimentationskoeffizienten von $s_{20,w}=4$ S. Die aus den Sedimentationskoeffizienten und der Molmasse ermittelten Perrin-Faktoren von $f/f_0=1.5$ (*Dra*SSB) bzw. $f/f_0=1.4$ (*Taq*SSB) weisen auf eine deutlich von

der Kugelform abweichende Gestalt der beiden Proteine hin, die wie bei *EcoSSB* vermutlich durch das Vorhandensein der ungefalteten C-terminalen Bereiche verursacht wird, die aus dem globulären Protein-Core herausragen (Williams *et al.*, 1983).

Die in dieser Arbeit beschriebenen SSBs aus der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe stellen eine völlig neue Strukturklasse der SSB-Proteine dar. Die gezeigte Homologie zwischen *DraSSB* und den kürzlich beschriebenen SSBs aus *T.aquaticus* und *T.thermophilus* (Dabrowski *et al.*, 2002b) zeigt eine Konservierung der SSBs aus dieser phylogenetischen Gruppe. Dabei trägt ein dimeres SSB aus *Thermus/Deinococcus* durch die Verdoppelung der *OB-folds* gleich viele ssDNA-Bindungsstellen wie ein tetrameres SSB aus anderen Prokaryoten. Die Duplikation muss für die Organismen dieser Gruppe in der Evolution offensichtlich von Vorteil gewesen sein. Ein Grund dafür könnte die durch Genduplikation geschaffene Möglichkeit sein, dass die *OB-folds* in den *Thermus/Deinococcus*-SSBs unterschiedlich evolvieren und damit unterschiedliche Eigenschaften entwickeln könnten (Bernstein *et al.*, 2004).

Eine quantitative Aussage über die Denaturierungsenthalpie von *DraSSB* war aus den Denaturierungsexperimenten mit Guanidiniumchlorid in der analytischen Ultrazentrifuge nicht zu erhalten. Die Hauptursache dafür liegt wahrscheinlich darin, dass die Annahme eines Alles-oder-Nichts-Modells ($\text{Dimer}_{\text{gefaltet}} \rightleftharpoons \text{Monomer}_{\text{ungefaltet}}$) wegen des Auftretens von Zwischenzuständen nicht gerechtfertigt ist. Ein Grund könnte die nicht vollständige Denaturierung des *DraSSBs* nach dem Übergang zum Monomer sein. Das würde bedeuten, dass das Monomer noch eine Reststruktur besitzt, deren Denaturierungsenthalpie nicht mitbestimmt wurde. Dass Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente von *DraSSB* bei höheren Guanidiniumchlorid-Konzentrationen nach dem Übergang zum Monomer keine Änderung im s-Wert mehr zeigen, macht dies zwar unwahrscheinlich, schließt Reststrukturen jedoch nicht völlig aus. Eine Möglichkeit die Denaturierung eventueller Reststrukturen zu untersuchen wäre der Vergleich von Circular dichroismus-Spektren des *DraSSB* bei unterschiedlichen Guanidiniumchlorid-Konzentrationen.

Die Bindung von *DraSSB* an Einzelstrang-DNA konnte sowohl in Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten in der analytischen Ultrazentrifuge (vgl. 3.3.2) als auch in Fluoreszenztitrationen gezeigt werden (vgl. 3.3.3). Wie aus den

Experimenten in der analytischen Ultrazentrifuge hervorgeht, kann dabei die Kooperativität der Bindung von *Dra*SSB an poly(dT) in Hochsalzpuffer nicht sehr hoch sein. Die in der analytischen Ultrazentrifugation ermittelte Bedeckungslänge von ca. 50 nt/*Dra*SSB wurde in Fluoreszenztitrationen sowohl für *Dra*SSB als auch für *Taq*SSB näher untersucht. Beide Proteine binden poly(dT) mit sehr hoher Affinität ($\omega \cdot K_{\text{Ass}} > 10^8 \text{ M}^{-1}$) und zeigen im Hochsalz eine Bedeckungslänge von $n_{\text{Hochsalz}} = 55 \text{ nt/SSB}$ und eine nur leicht verringerte Bedeckungslänge von $n_{\text{Niedrigsalz}} = 47 \text{ nt/SSB}$ bei niedrigen Ionenstärken. Die im Hochsalz bestimmte Bedeckungslänge ist mit 55 nt/SSB deutlich niedriger als die des *Eco*SSB mit 65 nt/SSB (Lohman und Overman, 1985). Eine mögliche Begründung für diesen Unterschied könnte in der Genduplikation liegen, die zur Bildung eines SSB-Monomers mit zwei *OB-folds* geführt hat. Dabei können Kontakte, die im Homotetramer vorhanden sind, bei den SSBs aus *Thermus/Deinococcus* verloren gegangen sein und somit eine Verringerung der Bindungsplatzgröße bewirken. Für *Dra*SSB wurde bereits beschrieben, dass einige aromatische Aminosäuren in den *OB-folds* im Vergleich zu *Eco*SSB fehlen (Bernstein *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *Eco*SSB, das mit $n_{\text{Hochsalz}} = 65 \text{ nt/SSB}$ und $n_{\text{Niedrigsalz}} = 35 \text{ nt/SSB}$ abhängig von der Salzkonzentration zwei deutlich unterschiedliche Bindungsmodi zeigt (Lohman und Overman, 1985), scheinen die SSBs aus *Thermus/Deinococcus* bei diesen Ionenstärken keine deutlich unterschiedlichen Bindungsmodi zu zeigen.

Die von Dabrowski *et al.* (2002a) für *Taq*SSB und *Tth*SSB aus Fluoreszenz-Titrationsexperimenten mit (dT)₇₅ ermittelten Bedeckungslängen von $n_{0.1 \text{ M NaCl}} = 34 \text{ nt/SSB}$ und $n_{2 \text{ mM NaCl}} = 24$ spiegeln die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen nicht wieder. In den Experimenten dieser Autoren ist jedoch die bestimmte Bindungsplatzgröße durch die Wahl des (dT)₇₅-Oligonukleotids bereits in ihren Grenzen vorgegeben, da an ein (dT)₇₅-Oligonukleotid entweder ein ($n=75$), zwei ($n=37$) oder drei ($n=25$) SSBs binden könnten. Eine Erklärung für die Abweichung der durch Dabrowski *et al.* (2002a) beschriebenen Bedeckungslängen von den in dieser Arbeit erhaltenen Werten könnte neben den Unterschieden in der Ionenstärke auch die Abwesenheit eines Detergens in den Fluoreszenztitrationen sein. Die Abwesenheit eines Detergens könnte insbesondere in Kombination mit der Verwendung des (dT)₇₅-Oligonukleotids einen deutlichen Einfluss auf die bestimmte Bedeckungslänge besitzen (vgl. 3.3.3 und Curth *et al.* (1991)). Bei genauerer Betrachtung der von Dabrowski *et al.* (2002a) dargestellten Titrationen ergibt sich ein Bedeckungslänge von $n_{0.1 \text{ M NaCl}} > 45 \text{ nt/SSB}$, die in klarem Widerspruch zu der im

Text derselben Veröffentlichung genannten Bedeckungslänge von $n_{0,1\text{ M NaCl}}=34\text{ nt/SSB}$ steht. Die Autoren geben auch keine Hinweise auf das bei der Auswertung verwendete Modell. Daher muss man davon ausgehen dass hier ermittelten Bedeckungslängen für *Taq*SSB bzw. *Dra*SSB eine sicherere Grundlage besitzen als die von Dabrowski *et al.* (2002a) publizierten.

Die mit Hilfe von Fluoreszenz-*Stopped-Flow*-Experimenten ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation von *Dra*SSB bzw. *Taq*SSB und poly(dT) zeigen, dass die Reaktion nahezu diffusionskontrolliert abläuft (vgl. 3.3.4). Die Änderung der Fluoreszenz bei der Reaktion lässt sich mit dem für *Eco*SSB beschriebenen Bindungsmodell nach Urbanke und Schaper (1990) gut beschreiben. Das impliziert auch für *Taq*SSB und *Dra*SSB, dass die initiale Bindung des Proteins an die ssDNA über einzelne Untereinheiten (oder einzelne *OB-folds*) erfolgen kann. Die bestimmten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten sind in den Fehlergrenzen identisch und liegen im Bereich von $k_{12}=2\cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit stimmen die für die *Thermus/Deinococcus*-SSBs ermittelten Konstanten gut mit den für *Eco*SSB beschriebenen Werten überein (Urbanke und Schaper, 1990) und es zeigt sich auch hier die große Ähnlichkeit zwischen den beiden SSBs aus extremophilen Organismen und dem Prototyp bakterieller homotetramerer SSBs.

Die DNA-Schmelzexperimente zeigen sowohl für *Dra*SSB als auch für *Taq*SSB eine Doppelstrang-destabilisierende Wirkung (vgl. 3.3.5). Während der Schmelzpunkt von poly(dA·dT) durch die Anwesenheit eines Überschusses *Eco*SSB von 59°C auf 36°C gesenkt wird, bewirkt *Dra*SSB bei gleichem molaren Verhältnis eine Senkung des Schmelzpunktes auf 42°C. Der Schmelzpunkt von poly(dA·dT) wird durch die Gegenwart des dem *Dra*SSB sehr ähnlichen *Taq*SSB nur auf ca. 52°C gesenkt. Angesichts der in den Fluoreszenztitrationen bestimmten sehr ähnlichen Bindungskonstanten für die Bindung von *Dra*SSB und *Taq*SSB an poly(rU) (vgl. 3.3.3), ist dieser große Unterschied im Einfluss auf das Schmelzverhalten unerwartet. Eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Verhalten in Schmelzexperimenten mit poly(dA·dT) könnte eine unterschiedliche Affinität der beiden Proteine zu diesem Polynukleotid sein.

Die in den biophysikalischen Charakterisierungen gezeigte Ähnlichkeit des *Dra*SSBs zu *Eco*SSB führte zu der Fragestellung, ob das SSB aus *D. radiodurans* in der Lage ist, *Eco*SSB *in vivo* zu ersetzen. Für eine erfolgreiche Komplementation ist aber nicht nur die Bindung von Einzelstrang-DNA nötig, sondern auch die Interaktionen des

*Dra*SSB mit anderen Proteinen wie z.B. der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III. Einige dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen werden über den in allen bakteriellen Spezies konservierten C-Terminus des SSBs vermittelt (vgl. 1.3.2). Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge weisen auf eine Komplexbildung von *Dra*SSB und χ hin (vgl. 3.3.7), da hierbei Spezies mit höheren s-Werten als die der Einzelkomponenten auftreten. Die Komplementationsexperimente zeigen, dass die Funktion von *Eco*SSB auch *in vivo* durch *Dra*SSB übernommen werden kann, da *E.coli* Zellen in Anwesenheit des *Dra*SSB auch ohne *Eco*SSB überleben können (vgl. 3.3.6). Dieses Ergebnis bestätigt damit die *in vitro* charakterisierte biophysikalische Ähnlichkeit des strukturell neuartigen extremophilen SSBs zum SSB-Prototyp.

Die Ergebnisse der Kristallisationsversuche von *Taq*SSB sind viel versprechend. Durch geeignete feiner abgestufte *Screenings* soll die Kristallgröße weiter optimiert werden. Geeignete Kristalle können dann dazu verwendet werden mit Hilfe von Röntgenstrukturanalyse die räumliche Struktur des *Taq*SSBs zu bestimmen. Aufgrund der hohen Homologie zu *Eco*SSB könnte die Röntgenstrukturanalyse eventuell mit Hilfe von *molecular replacement* unter Verwendung der bereits gelösten Struktur von *Eco*SSB durchgeführt werden. Da die bisher veröffentlichten Kristallstrukturen von homotetrameren SSBs (Raghunathan *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 2000; Saikrishnan *et al.*, 2003) keine Information über die Struktur des hochkonservierten C-terminalen Bereichs liefern konnten, bleibt die Frage nach der Struktur dieses für Protein-Protein-Interaktionen wichtigen Bereiches weiterhin offen. Vielleicht kann die Kristallstruktur des dimeren *Taq*SSBs mit nur zwei C-Termini diese Fragen beantworten.

Da kürzlich die Kristallstruktur des SSB aus *D.radiodurans* veröffentlicht wurde (Bernstein *et al.*, 2004), wird die Optimierung für die Kristallisation von *Dra*SSB nicht weitergeführt. Die veröffentlichte Struktur zeigt eine große Ähnlichkeit zur Struktur von *Eco*SSB.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Wechselwirkung von *EcoSSB* mit der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III konnte eine funktionelle Modulation der Interaktion der beiden Proteine durch die Anwesenheit von einzelsträngiger DNA gezeigt werden, die in ihrer Konsequenz eine Erhöhung der Prozessivität der DNA-Replikation auf dem *lagging-strand* zur Folge hat. Dieser positive Effekt auf die Replikation begründet sich in zwei Punkten: Zum einen bindet *EcoSSB* durch die Interaktion mit χ stärker an die ssDNA wodurch ein vorzeitiges Dissoziieren des Proteins verhindert werden kann. Zum anderen bewirkt die Bindung von *EcoSSB* an ssDNA eine Erhöhung der Affinität von *EcoSSB* zur χ -Untereinheit, die dafür sorgt, dass χ nur mit SSB-Proteinen in Kontakt steht, die auch tatsächlich an ssDNA gebunden sind. Die Verringerung der Affinität zu χ bei der Dissoziation des SSBs von der ssDNA ermöglicht ein „Umschalten“ auf das auf dem ssDNA-Strang nächstgelegene SSB-Protein. Die beschriebene Wechselwirkung konnte auf den C-Terminus des SSB eingegrenzt werden, für den auch schon andere Wechselwirkungen in der Literatur beschrieben sind. Da die Struktur des C-Terminus von *EcoSSB* noch nicht aufgeklärt werden konnte, sollte dies eines der vorrangigen Ziele der weiteren Arbeiten auf diesem Gebiet sein. Dafür könnte auch die Kristallisation von *EcoSSB* im Komplex mit Interaktionspartnern hilfreich sein. Da auch für die Primase eine Interaktion mit *EcoSSB* gezeigt wurde (Yuzhakov *et al.*, 1999), könnte auch die genauere Untersuchung dieser Wechselwirkung die Rolle des SSB im Gesamtkontext der Replikation des *lagging-strands* weiter definieren.

Die Gene der SSB-Proteine aus *Thermus aquaticus* und *Deinococcus radiodurans* konnten erfolgreich amplifiziert, kloniert und in *E.coli* exprimiert werden. Während die Sequenz des SSBs aus *T.aquaticus* bestätigt wurde, zeigte sich bei der Sequenzierung des *DraSSB*-Gens eine Abweichung von der ursprünglich annotierten Sequenz, die an die EMBL-Datenbank übermittelt wurde (EMBL DRA564860). Beide Proteine konnten mit einer Reinheit von mehr als 95% erhalten werden. Die Größe des rekombinant exprimierten *DraSSBs* entspricht dabei der des *in vivo* vorkommenden Proteins, wie durch immunologische Detektion im *D.radiodurans*-Gesamtzellextrakt bestätigt werden konnte. Im Gegensatz zu den bisher bekannten prokaryotischen homotetrameren SSBs handelt es sich bei den SSBs aus *Thermus* und *Deinococcus* um Dimere mit je zwei Oligonukleotid-bindenden Bereichen (*OB-folds*) im Monomer, die vermutlich durch Genduplikation entstanden sind. Diese dimere Form konnte mit Hilfe von analytischer

Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Die Bindung von einzelsträngiger DNA wurde sowohl in der analytischen Ultrazentrifuge, in statischen Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Bedeckungslänge als auch mit Hilfe von *Stopped-Flow*-Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter untersucht. Dabei zeigen beide SSBs eine nahezu diffusionskontrollierte Assoziation und eine starke Bindung ($K_{\text{Ass}} > 10^8 \text{M}^{-1}$) an poly(dT) mit fast identischen Bedeckungslängen im Hochsalz (55 nt/SSB) und bei niedrigen Ionenstärken (47 nt/SSB). Während die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ähnlich der des *EcoSSBs* ist, zeigen die *Thermus/Deinococcus*-SSBs im Gegensatz zu *EcoSSB* keine deutlich unterschiedlichen salzabhängigen Bedeckungslängen bei der Bindung an ssDNA. Beide SSBs bewirken in DNA-Schmelzexperimenten eine Destabilisierung des Doppelstrangs. Allerdings senkt *DraSSB* den Schmelzpunkt der dsDNA deutlich mehr ab als *TaqSSB*, was aufgrund der Homologie der beiden Proteine eigentlich nicht zu erwarten gewesen wäre. Das liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Affinität der Proteine zu poly(dA·dT). Es bedarf weiterer Untersuchungen um die Nukleotidspezifitäten der beiden Proteine genauer zu charakterisieren.

Für SSB aus *D.radiodurans* konnte gezeigt werden, dass es *EcoSSB in vivo* ersetzen kann und auch Wechselwirkungen mit dem χ -Protein aus *E.coli* eingehen kann. Beide Befunde zeugen von der funktionellen Ähnlichkeit zwischen *Deinococcus*-SSBs und *EcoSSB*. Im Hinblick auf die erfolgreiche Komplementation des *EcoSSBs* durch *DraSSB* wäre für weitere Untersuchungen interessant, ob auch ein SSB aus einem thermophilen Organismus wie *T.aquaticus* *EcoSSB in vivo* ersetzen kann. Für die weiteren Arbeiten auf diesem Gebiet kommen neben der ausstehenden Röntgenstrukturanalyse des *TaqSSB* auch genauere Untersuchung von *DraSSB* und *TaqSSB* hinsichtlich der Abhängigkeit der Bindungsplatzgröße von Ionenstärke und der Temperatur in Frage.

6 Anhang

6.1 Vergleich der DNA-Sequenzen DR099 und DRA564860

Dargestellt ist die an die EMBL-Datenbank übermittelte neue Sequenz des *Drassb*-Gens (DRA564860) die in dieser Arbeit ermittelt wurde. Die in DR099 nicht enthaltenen Basen an den Positionen 278 und 506 sind gelb hinterlegt.

```

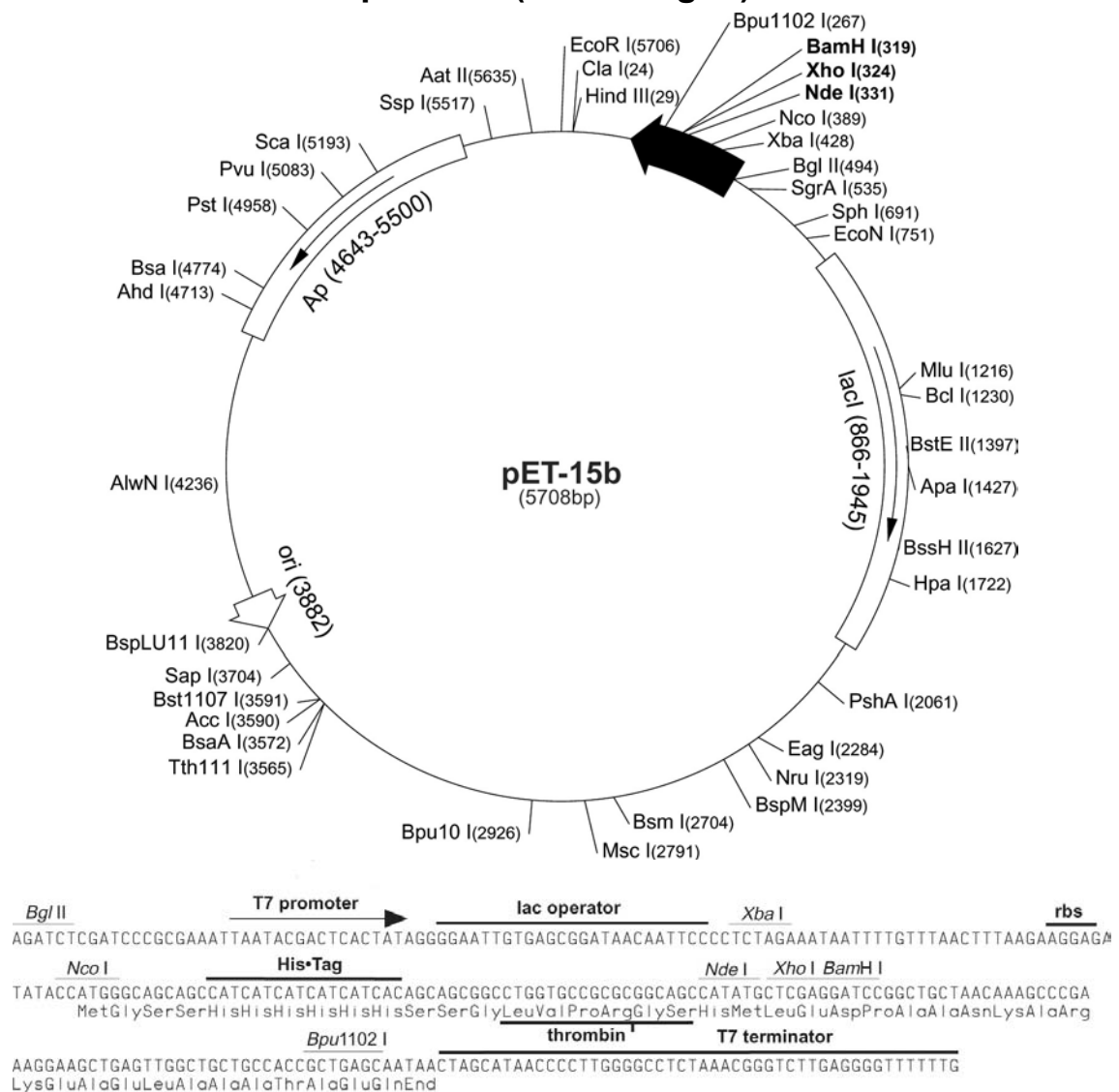
ATGGCCCAG GCATGAACCA CGTCTACCTG ATCGGCGCAC TCGCCCGTGA TCCCGAACTT CGCTACACCG      70
GCAACGGCAT GGCCGTTTTT GAAGCCACCG TCGCAGGCGA AGACCGAGTG ATCGGCAATG ATGGCCGTGA      140
ACGCAATCTG CCCTGGTACC ACCGCGTGTC GATTCTGGGC AAGCCCGCCG AATGGCAGGC CGAGCGCAAC      210
CTCAAGGGCG GCGACGCCGT GGTGGTTGAA GGTACCCTGG AATACCGTCA GTGGGAAGCG CCCGAAGCG      280
GCAAACGCAG CGCAGTCAAC GTCAAAGCCC TCCGCATGGA ACAGCTCGGC ACCCAGCCCG AACTGATTCA      350
GGACGCTGGC GCGGCGGTGC GCATGAGCGG CGCATGAAT GAAGTCCTGG TCCTCGGCAA CGTGACCCGT      420
GACCCCGAGA TTCGCTACAC CCCTGCGGGT GACGCTGTGC TGAGCCTGTC GATTGCGGTC AACGAGAACT      490
ACCAGGACCG TCAGGCGCCAG CGCCAGGAAA AGGTTCACTA TATCGACGCC ACGCTCTGGC GCGACCTCGC      560
CGAGAACATG AAGGAGCTCC GTAAGGGCGA CCCGGTCATG ATCATGGGCA GGCTCGTCAA CGAGGGCTGG      630
ACCGATAAAG ACGGCAACAA GCGCAACAGC ACAAGAGTAG AGGCGACGCG AGTCGAAGCC CTTGCCCGAG      700
GCGCAGGCAA TGCCAATTCG GGCTACGCCG CAGCCACCCC TGCCGCACCT CGCACGCAGA CCGCGAGCAG      770
TGCCGCACGC CCGACGTCTG GCGGCTACCA GAGCCAGCCC AGCCGCGCGG CGAACACGGG GAGCCGTTTCG      840
GGGGGCCTAG ATATTGATCA AGGTCTCGAC GATTTTCCGC CGGAAGAAGA CGACCTGCCC TTTTAA      906

```

6.2 Aminosäuresequenzen der Proteine

Protein (ExPASy-ID)	1	60
<i>EcoSSB</i> (ssb_ecoli)	ASRGVNKVIILVGNLGQDPEVRYMPNGGAVANITLATSESWRDKATGEMKEQTEWHRVVLFGKLAEVASEYLRKGSQVYIEGQLRTRKWTQSGQDRYTTEVVNVGGTMQMLGGRQGGGAPAGGNIGGGQPQGGWGQPQQPQGGNQFSGGAQSRPQQSAPAAPSNEPPMDFDDDI PF	
<i>DraSSB</i> (ssb_deira)	MARGMNHVYLIGALARDPELRYTGNGMAVFEATVAGEDRVIGNDGRERNLPWYHRVSILGKPAEWQAERNLKGGDAVVVEGTLEYRQWEAPEGGKRSVNVKALRMEQLGTQPELIQDAGGGVRMSGAMNEVLVLGNVTRDPEIRYTPAGDAVL SLSIAVNENYQDRQGQRQEKVHYIDA TLWRDLAENMKELRKGD PVMIMGRLVNEGWTDKDGNKRNSTRVEATRVEALARGAGNANS GYAAATPAAPRTQTASSAARPTSGGYQSQPSRAANTGSRSGGLDIDQGLDDFPPEEDDLP F	
<i>TaqSSB</i> (ssb_theaq)	MARGLNQVFLIGTLTARPDMRYTPGGLAILDLNLAGQDAFTDESGQEREVPWYHRVRLLG RQAEMWGD LLEKGQLIFVEGRLEYRQWEKDGEKKSEVQVRAEFIDPLEGRGRETLEDARG QPRLRRALNQVILMGNLTRDPDLRYTPQGTAVVRLGLAVNERRRGQEEERTHFLEVQAWR ELAEWASELRKGDGLLVIGRLVNDSWTSSSGERRFQTRVEALRLERPTRGPAQAGGSRPP TVQTGGVDIDEGLEDFFPEEDLPF	

6.3 Plasmidkarte von pET-15b (Fa. Novagen)

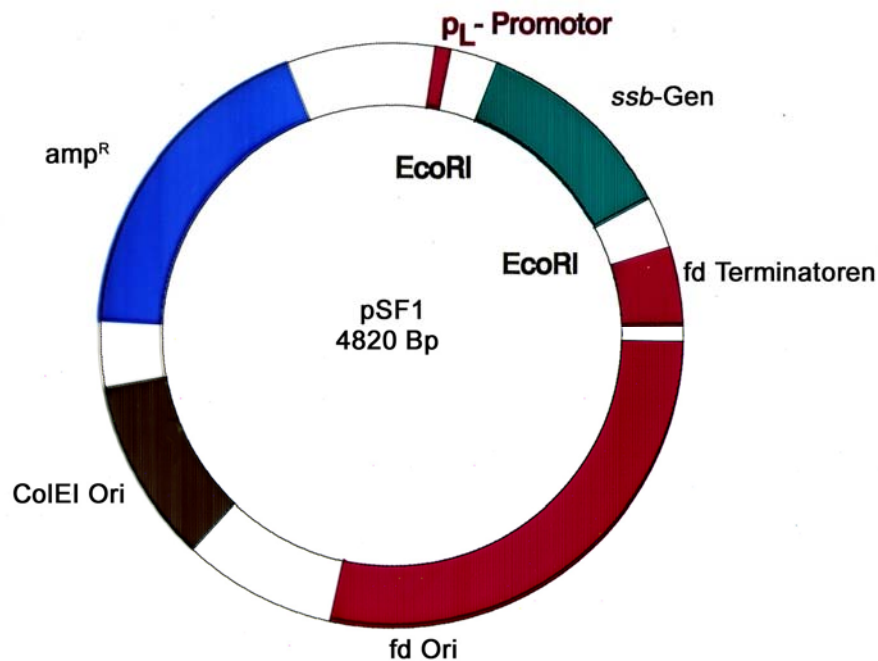


Oben: Plasmidkarte von pET-15b (Novagen). Die Klonierungs- und Expressionsregion ist als schwarzer Pfeil dargestellt. Die Nummerierung erfolgt auf Grundlage von pBR322. Die gezeigten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen kommen im Plasmid nur einmal vor.

Unten: Multiple Cloning Site und T7-Expressionsregion. Die Gene für TaqSSB und DraSSB wurden über NcoI und BamHI in den pET-Vektor kloniert und ergaben die Plasmide pET-DraSSB und pET-TaqSSB.

(Quelle: <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/NDIS/69661-000.pdf>)

6.4 Plasmidkarte von pSF1



Das pSF1-Plasmid ist ein pBR322-Derivat und trägt das *Eco*ssb-Gen unter Kontrolle des P_L -Promotors (modifiziertes Bild von C.Urbanke).

Für die Komplementationsversuche wurde das Plasmid mit *Eco*RI geschnitten und das *Eco*ssb-Gen entfernt. Das mit *Eco*RI-Überhängen amplifizierte *Dra*ssb-Gen wurde in den Plasmid-Rahmen ligiert und ergab so das Plasmid pSF1-*Dra*SSB.

7 Literatur

- Alberts, B. M. und L. Frey (1970). "T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA." Nature **227**(265): 1313-8.
- Anderson, A. W., H. C. Nordan, R. F. Cain, G. Parrish und D. Duggan (1956). "Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radioation." Food Technology **10**: 575-78.
- Arai, N., L. Polder, K. Akai und A. Kornberg (1981). "Replication of phi X174 DNA with purified enzymes. II. Multiplication of the duplex form by coupling of continuous and discontinuous synthetic pathways." J Biol Chem **256**(10): 5239-46.
- Bandyopadhyay, P. K. und C. W. Wu (1978). "Fluorescence and chemical studies on the interaction of *Escherichia coli* DNA-binding protein with single-stranded DNA." Biochemistry **17**(19): 4078-85.
- Barat, M. und B. Mignotte (1981). "A DNA binding protein from *Xenopus laevis* oocyte mitochondria." Chromosoma **82**(4): 583-93.
- Battista, J. R. (1997). "Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*." Annu Rev Microbiol **51**: 203-24.
- Battista, J. R., M. M. Cox, M. J. Daly, I. Narumi, M. Radman, S. Sommer, A. Minsky, A. K. Sharma und J. Englander (2003). "The Structure of *D. radiodurans*." Science **302**(5645): 567-568.
- Bayer, I., A. Fliess, J. Greipel, C. Urbanke und G. Maass (1989). "Modulation of the affinity of the single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli* (*E. coli* SSB) to poly(dT) by site-directed mutagenesis." Eur J Biochem **179**(2): 399-404.
- Bernstein, D. A., J. M. Eggington, M. P. Killoran, A. M. Misic, M. M. Cox und J. L. Keck (2004). "Crystal structure of the *Deinococcus radiodurans* single-stranded DNA-binding protein suggests a mechanism for coping with DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8575-80.
- Bobst, E. V., A. M. Bobst, F. W. Perrino, R. R. Meyer und D. C. Rein (1985). "Variability in the nucleic acid binding site size and the amount of single-stranded DNA-binding protein in *Escherichia coli*." FEBS Letters **181**(1): 133-137.
- Bochkareva, E., S. Korolev, S. P. Lees-Miller und A. Bochkarev (2002). "Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA." Embo J **21**(7): 1855-63.
- Bujalowski, W. und T. M. Lohman (1987). "A general method of analysis of ligand-macromolecule equilibria using a spectroscopic signal from the ligand to monitor binding. Application to *Escherichia coli* single-strand binding protein-nucleic acid interactions." Biochemistry **26**(11): 3099-106.
- Bujalowski, W. und T. M. Lohman (1989a). "Negative co-operativity in *Escherichia coli* single strand binding protein-oligonucleotide interactions. I. Evidence and a quantitative model." Journal of Molecular Biology **207**: 249-268.
- Bujalowski, W. und T. M. Lohman (1989b). "Negative co-operativity in *Escherichia coli* single strand binding protein-oligonucleotide interactions. II. Salt, temperature and oligonucleotide length effects." Journal of Molecular Biology **207**: 269-288.
- Carlini, L., U. Curth, B. Kindler, C. Urbanke und R. D. Porter (1998). "Identification of amino acids stabilizing the tetramerization of the single stranded DNA binding protein from *Escherichia coli*." FEBS Lett **430**(3): 197-200.

- Chase, J. W., J. J. L'Italien, J. B. Murphy, E. K. Spicer und K. R. Williams (1984). "Characterization of the *E. coli* ssb113 mutant single-stranded DNA binding protein. Cloning of the gene, DNA and protein sequence analysis, HPLC, peptide mapping and DNA binding studies." Journal of Biological Chemistry **259**: 805-814.
- Chen, J., D. L. Smith und M. A. Griep (1998). "The role of the 6 lysines and the terminal amine of *Escherichia coli* single-strand binding protein in its binding of single-stranded DNA." Protein Sci **7**(8): 1781-8.
- Chilkoti, A. und P. Stayton (1995). "Molecular Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics." J. Am. Chem. Soc. **117**(43): 10622-10628.
- Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Curth, U., I. Bayer, J. Greipel, F. Mayer, C. Urbanke und G. Maass (1991). "Amino acid 55 plays a central role in tetramerization and function of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein." Eur J Biochem **196**(1): 87-93.
- Curth, U., J. Genschel, C. Urbanke und J. Greipel (1996). "In vitro and in vivo function of the C-terminus of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein." Nucleic Acids Res **24**(14): 2706-11.
- Curth, U., J. Greipel, C. Urbanke und G. Maass (1993). "Multiple binding modes of the single-stranded DNA binding protein from *Escherichia coli* as detected by tryptophan fluorescence and site-directed mutagenesis." Biochemistry **32**(10): 2585-91.
- Curth, U., C. Urbanke, J. Greipel, H. Gerberding, V. Tiranti und M. Zeviani (1994). "Single-stranded-DNA-binding proteins from human mitochondria and *Escherichia coli* have analogous physicochemical properties." European Journal of Biochemistry **221**: 435-443.
- Dabrowski, S., M. Olszewski, R. Piatek, A. Brillowska-Dabrowska, G. Konopa und J. Kur (2002a). "Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* - new arrangement of binding domains." Microbiology **148**(Pt 10): 3307-15.
- Dabrowski, S., M. Olszewski, R. Piatek und J. Kur (2002b). "Novel thermostable ssDNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *T. aquaticus*-expression and purification." Protein Expr Purif **26**(1): 131-8.
- Davey, M. J. und M. O'Donnell (2000). "Mechanisms of DNA replication." Current Opinion in Chemical Biology **4**(5): 581-586.
- Davies, G. E. und G. R. Stark (1970). "Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(3): 651-6.
- De Vries, J., J. Genschel, C. Urbanke, H. Thole und W. Wackernagel (1994). "The single-stranded-DNA-binding proteins (SSB) of *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*." Eur J Biochem **224**(2): 613-22.
- de Vries, J. und W. Wackernagel (1994). "Cloning and sequencing of the *Proteus mirabilis* gene for a single-stranded DNA-binding protein (SSB) and complementation of *Escherichia coli* ssb point and deletion mutations." Microbiology **140** (Pt 4): 889-95.
- Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olsen und R. V. Swanson (1998). "The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*." Nature **392**(6674): 353-8.
- Durchschlag, H. und R. Jaenicke (1982). "Partial specific volume changes of proteins densimetric studies." Biochem Biophys Res Commun **108**(3): 1074-9.

- Dutta, A. und B. Stillman (1992). "cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication." Embo J **11**(6): 2189-99.
- Eggington, J. M., N. Haruta, E. A. Wood und M. M. Cox (2004). "The single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*." BMC Microbiol **4**(1): 2.
- Fay, P. J., K. O. Johanson, C. S. McHenry und R. A. Bambara (1981). "Size classes of products synthesized processively by DNA polymerase III and DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*." J Biol Chem **256**(2): 976-83.
- Gao, G., B. Tian, L. Liu, D. Sheng, B. Shen und Y. Hua (2003). "Expression of *Deinococcus radiodurans* Pprl enhances the radioresistance of *Escherichia coli*." DNA Repair (Amst) **2**(12): 1419-27.
- Garcia-Maya, M. M. und K. W. Buck (1997). "Novel single-stranded DNA binding proteins from tobacco." Plant Physiology and Biochemistry **35**(9): 719-728.
- Genschel, J. (1995). Untersuchungen zur Funktion bakterieller Einzelstrang-DNA bindender Proteine. Dissertation, Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Hannover: 132 Seiten.
- Genschel, J., U. Curth und C. Urbanke (2000). "Interaction of *E. coli* single-stranded DNA binding protein (SSB) with exonuclease I. The carboxy-terminus of SSB is the recognition site for the nuclease." Biol Chem **381**(3): 183-92.
- Genschel, J., L. Litz, H. Thole, U. Roemling und C. Urbanke (1996). "Isolation, sequencing and overproduction of the single-stranded DNA binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* PAO." Gene **182**(1-2): 137-43.
- Glover, B. P. und C. S. McHenry (1998). "The chi psi subunits of DNA polymerase III holoenzyme bind to single-stranded DNA-binding protein (SSB) and facilitate replication of an SSB-coated template." J Biol Chem **273**(36): 23476-84.
- Glover, B. P. und C. S. McHenry (2001). "The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases." Cell **105**(7): 925-34.
- Gralén, N. und G. Lagermalm (1952). "A contribution to the knowledge of some physico-chemical properties of polystyrene." J. Phys. Chem. **56**: 514-523.
- Greipel, J., G. Maass und F. Mayer (1987). "Complexes of the single-stranded DNA-binding protein from *Escherichia coli* (EcoSSB) with poly(dT). An investigation of their structure and internal dynamics by means of electron microscopy and NMR." Biophys Chem **26**(2-3): 149-61.
- Greipel, J., C. Urbanke und G. Maass (1989). The single-stranded DNA binding protein of *Escherichia coli*. Physicochemical properties and biological functions. Protein-Nucleic Acid Interaction. W. Saenger und U. Heinemann. London, Macmillan: 61-86.
- Gulbis, J. M., S. L. Kazmirski, J. Finkelstein, Z. Kelman, M. O'Donnell und J. Kuriyan (2004). "Crystal structure of the chi:psi sub-assembly of the *Escherichia coli* DNA polymerase clamp-loader complex." Eur J Biochem **271**(2): 439-49.
- Hagemann, K. (2004). Einzelstrang DNA-bindende Proteine aus *Arabidopsis thaliana*: Identifizierung, Expression und Charakterisierung. Dissertation, Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Hannover.
- Hua, Y., I. Narumi, G. Gao, B. Tian, K. Satoh, S. Kitayama und B. Shen (2003). "Pprl: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*." Biochem Biophys Res Commun **306**(2): 354-60.
- Iftode, C., Y. Daniely und J. A. Borowiec (1999). "Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB." Crit Rev Biochem Mol Biol **34**(3): 141-80.

- Jarosik, G. P. und E. J. Hansen (1994). "Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae* *ssb*-gene encoding single-strand DNA-binding protein." Gene **146**(1): 101-3.
- Jeruzalmi, D., M. O'Donnell und J. Kuriyan (2001). "Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (γ) complex of *E. coli* DNA polymerase III." Cell **106**(4): 429-41.
- Kelman, Z. und M. O'Donnell (1995). "DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine." Annu Rev Biochem **64**: 171-200.
- Kelman, Z., A. Yuzhakov, J. Andjelkovic und M. O'Donnell (1998). "Devoted to the lagging strand-the χ subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly." Embo J **17**(8): 2436-49.
- Khamis, M. I., J. R. Casas-Finet, A. H. Maki, J. B. Murphy und J. W. Chase (1987). "Investigation of the role of individual tryptophan residues in the binding of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein to single-stranded polynucleotides. A study by optical detection of magnetic resonance and site-selected mutagenesis." J Biol Chem **262**(23): 10938-45.
- Kim, Y., S. Tabor, C. Bortner, J. Griffith und C. Richardson (1992). "Purification and characterization of the bacteriophage T7 gene 2.5 protein. A single-stranded DNA-binding protein." J. Biol. Chem. **267**(21): 15022-15031.
- Kindler, B. (1997). AKKUPROG: Auswertung von Messungen chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Analyse von Biopolymeren in der Ultrazentrifuge. Anwendung auf Protein-DNA-Wechselwirkungen. Dissertation, Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Hannover.
- Kneale, G. G. (1992). "Single stranded DNA-binding proteins." Current Opinion in Structural Biology **2**(1): 124-130.
- Kneale, G. G., R. Freeman und D. A. Marvin (1982). "Pf1 bacteriophage replication--assembly complex. X-ray fibre diffraction and scanning transmission electron microscopy." J Mol Biol **156**(2): 279-92.
- Kong, X. P., R. Onrust, M. O'Donnell und J. Kuriyan (1992). "Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp." Cell **69**(3): 425-37.
- Krauss, G., A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner, F. Peters und G. Maas (1975). "Equivalent and non-equivalent binding sites for +RNA on aminoacyl-tRNA synthetases." Eur J Biochem **55**(3): 517-29.
- Kuriyan, J. und M. O'Donnell (1993). "Sliding clamps of DNA polymerases." J Mol Biol **234**(4): 915-25.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lamm, O. (1929). "Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung." Arkiv för matematik, astronomi och fysik **21B No. 2**.
- Landwehr, M., U. Curth und C. Urbanke (2002). "A dimeric mutant of the homotetrameric single-stranded DNA binding protein from *Escherichia coli*." Biol Chem **383**(9): 1325-33.
- Laue, T. M., B. D. Shah, T. M. Ridgeway und S. M. Pelletier (1992). Computer-Aided Interpretation of analytical sedimentation data for proteins, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Lebowitz, J., M. S. Lewis und P. Schuck (2002). "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review." Protein Sci **11**(9): 2067-79.

- LeBowitz, J. H. und R. McMacken (1986). "The *Escherichia coli* DnaB replication protein is a DNA helicase." J Biol Chem **261**(10): 4738-48.
- Levin-Zaidman, S., J. Englander, E. Shimoni, A. K. Sharma, K. W. Minton und A. Minsky (2003). "Ringlike Structure of the *Deinococcus radiodurans* Genome: A Key to Radioresistance?" Science **299**(5604): 254-256.
- Lipton, M. S., L. Pasa-Tolic, G. A. Anderson, D. J. Anderson, D. L. Auberry, J. R. Battista, M. J. Daly, J. Fredrickson, K. K. Hixson, H. Kostandarithes, C. Masselon, L. M. Markillie, R. J. Moore, M. F. Romine, Y. Shen, E. Stritmatter, N. Tolic, H. R. Udseth, A. Venkateswaran, K. K. Wong, R. Zhao und R. D. Smith (2002). "Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11049-54.
- Little, J. W. und D. W. Mount (1982). "The SOS regulatory system of *Escherichia coli*." Cell **29**(1): 11-22.
- Lohman, T. M. und W. Bujalowski (1990). *E. Coli* single strand binding protein: multiple single stranded DNA binding modes and cooperativities. The Biology of non specific protein DNA interactions. A. Revzin. Boca Raton, FL., CRC Press: 131-168.
- Lohman, T. M., K. Chao, J. M. Green, S. Sage und G. T. Runyon (1989). "Large-scale purification and characterization of the *Escherichia coli* rep-gene product." Journal of Biological Chemistry **264**: 10139-10147.
- Lohman, T. M. und M. E. Ferrari (1994). "*Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities." Annu Rev Biochem **63**: 527-70.
- Lohman, T. M. und L. B. Overman (1985). "Two binding modes in *E. coli* single-strand binding protein (SSB) single-stranded DNA complexes: Modulation by NaCl concentration." Journal of Biological Chemistry **260**: 3594-3603.
- Lohman, T. M., L. B. Overman und S. Datta (1986). "Salt-dependent changes in the DNA binding co-operativity of *Escherichia coli* single strand binding protein." J Mol Biol **187**(4): 603-15.
- Machner, M. P., C. Urbanke, M. Barzik, S. Otten, A. S. Sechi, J. Wehland und D. W. Heinz (2001). "ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology 1 domains simultaneously." J Biol Chem **6**: 6.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko und J. Parker (2001). Brock Mikrobiologie. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer.
- Matsumoto, T., Y. Morimoto, N. Shibata, T. Kinebuchi, N. Shimamoto, T. Tsukihara und N. Yasuoka (2000). "Roles of functional loops and the C-terminal segment of a single-stranded DNA binding protein elucidated by X-Ray structure analysis." J Biochem (Tokyo) **127**(2): 329-35.
- McHenry, C. S. und W. Crow (1979). "DNA polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and identification of subunits." J. Biol. Chem. **254**(5): 1748-1753.
- Meyer, R. R. und P. S. Laine (1990). "The single stranded DNA binding protein of *E. coli*." Microbiological Reviews **54**: 342-380.
- Michel, B. und N. D. Zinder (1989). "In vitro binding of the bacteriophage f1 gene V protein to the gene II RNA-operator and its DNA analog." Nucleic Acids Res **17**(18): 7333-44.
- Minton, K. W. (1994). "DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*." Mol Microbiol **13**(1): 9-15.
- Minton, K. W. (1996). "Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*." Mutat Res **363**(1): 1-7.

- Misselwitz, R., K. Welfle, U. Curth, C. Urbanke und H. Welfle (1995). "Stability of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (EcoSSB)." J Biomol Struct Dyn **12**(5): 1041-54.
- Mok, M. und K. J. Marians (1987). "The *Escherichia coli* preprimosome and DnaB helicase can form replication forks that move at the same rate." J Biol Chem **262**(34): 16644-54.
- Molineux, I. J., A. Pauli und M. L. Gefter (1975). "Physical studies of the interaction between the *Escherichia coli* DNA binding protein and nucleic acids." Nucleic Acids Res **2**(10): 1821-37.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**(Pt 1): 263-73.
- Murzin, A. G. (1993). "OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences." Embo J **12**(3): 861-7.
- Myszka, D. G. (1997). "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors." Curr Opin Biotechnol **8**(1): 50-7.
- Myszka, D. G. (1999). "Improving biosensor analysis." J Mol Recognit **12**(5): 279-84.
- Nakai, H. und C. Richardson (1988a). "The effect of the T7 and *Escherichia coli* DNA-binding proteins at the replication fork of bacteriophage T7." J. Biol. Chem. **263**(20): 9831-9839.
- Nakai, H. und C. Richardson (1988b). "Leading and lagging strand synthesis at the replication fork of bacteriophage T7. Distinct properties of T7 *gene-4* protein as a helicase and primase." J. Biol. Chem. **263**(20): 9818-9830.
- Narumi, I. (2003). "Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go." Trends Microbiol **11**(9): 422-5.
- Nilsson, P., B. Persson, M. Uhlen und P. A. Nygren (1995). "Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology." Anal Biochem **224**(1): 400-8.
- O'Donnell, M. und P. S. Studwell (1990). "Total reconstitution of DNA polymerase III holoenzyme reveals dual accessory protein clamps." J Biol Chem **265**(2): 1179-87.
- Onrust, R., J. Finkelstein, V. Naktinis, J. Turner, L. Fang und M. O'Donnell (1995a). "Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. I. Organization of the clamp loader." J Biol Chem **270**(22): 13348-57.
- Onrust, R., J. Finkelstein, J. Turner, V. Naktinis und M. O'Donnell (1995b). "Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. III. Interface between two polymerases and the clamp loader." J Biol Chem **270**(22): 13366-77.
- Overman, L. B., W. Bujalowski und T. M. Lohman (1988). "Equilibrium binding of *Escherichia coli* single-strand binding protein to single-stranded nucleic acids in the (SSB)65 binding mode. Cation and anion effects and polynucleotide specificity." Biochemistry **27**(1): 456-71.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray (1995). "How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein." Protein Science **4**: 2411-2425.
- Philo, J. S. (1997). "An improved function for fitting sedimentation velocity data for low-molecular-weight solutes." Biophys J **72**(1): 435-44.
- Porter, R. D., S. Black, S. Pannuri und A. Carlson (1990). "Use of the *Escherichia coli* *ssb*-Gene to prevent Bioreactor Takeover by plasmidless Cells." BioTechnology **8**: 47-51.

- Pritchard, A. E., H. G. Dallmann, B. P. Glover und C. S. McHenry (2000). "A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of $\delta\delta'$ with DnaX(4) forms DnaX(3) $\delta\delta'$." Embo J **19**(23): 6536-45.
- Prober, J. M., G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen und K. Baumeister (1987). "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides." Science **238**(4825): 336-41.
- Raghunathan, S., A. G. Kozlov, T. M. Lohman und G. Waksman (2000). "Structure of the DNA binding domain of *E-coli* SSB bound to ssDNA." Nature Struct. Biol. **7**(8): 648-652.
- Raghunathan, S., C. S. Ricard, T. M. Lohman und G. Waksman (1997). "Crystal structure of the homo-tetrameric DNA binding domain of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein determined by multiwavelength x-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9-Å resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 6652-6657.
- Reckmann, B., F. Grosse, C. Urbanke, R. Frank, H. Blocker und G. Krauss (1985). "Analysis of secondary structures in M13mp8 (+) single-stranded DNA by the pausing of DNA polymerase alpha." Eur J Biochem **152**(3): 633-43.
- Rew, D. A. (2003). "*Deinococcus radiodurans*." Eur J Surg Oncol **29**(6): 557-8.
- Rhodes, G. (2000). Crystallography Made Crystal Clear. University of Southern Maine, Academic Press, Elsevier Science (USA).
- Riesner, D. und R. Römer (1973). Physicochemical Properties of Nucleic Acids, Academic Press, London.
- Ruvolo, P. P., K. M. Keating, K. R. Williams und J. W. Chase (1991). "Single-stranded DNA binding proteins (SSBs) from prokaryotic transmissible plasmids." Proteins **9**(2): 120-34.
- Saikrishnan, K., J. Jeyakanthan, J. Venkatesh, N. Acharya, K. Sekar, U. Varshney und M. Vijayan (2003). "Structure of *Mycobacterium tuberculosis* single-stranded DNA-binding protein. Variability in quaternary structure and its implications." J Mol Biol **331**(2): 385-93.
- Sancar, A., K. R. Williams, J. W. Chase und W. D. Rupp (1981). "Sequences of the *ssb*-gene and protein." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4274-8.
- Sandigursky, M., F. Mendez, R. E. Bases, T. Matsumoto und W. A. Franklin (1996). "Protein-protein interactions between the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein and exonuclease I." Radiat Res **145**(5): 619-23.
- Sanger, F. und A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J Mol Biol **94**(3): 441-8.
- Schägger, H. und G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schuck, P. (1997). "Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules." Annu Rev Biophys Biomol Struct **26**: 541-66.
- Schuck, P. (2000). "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." Biophys J **78**(3): 1606-19.
- Schuler, G. D., S. F. Altschul und D. J. Lipman (1991). "A workbench for multiple alignment construction and analysis." Proteins **9**(3): 180-90.

- Schwarz, G. und F. Watanabe (1983). "Thermodynamics and kinetics of co-operative protein-nucleic acid binding. I. General aspects of analysis of data." J Mol Biol **163**(3): 467-84.
- Sigal, N., J. Delius, T. Kornberg, M. L. Gefter und B. M. Alberts (1972). "A DNA-Unwinding Protein Isolated from *Escherichia coli*: Its Interaction with DNA and with DNA Polymerases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **69**: 3537-3541.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-30.
- Thommes, P., C. L. Farr, R. F. Marton, L. S. Kaguni und S. Cotterill (1995). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila* embryos. Physical and biochemical characterization." J Biol Chem **270**(36): 21137-43.
- Tiranti, V., M. Rocchi, S. DiDonato und M. Zeviani (1993). "Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB)." Gene **126**(2): 219-25.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tsuchihashi, Z. und A. Kornberg (1990). "Translational Frameshifting Generates the γ -Subunit of DNA Polymerase III Holoenzyme." PNAS **87**(7): 2516-2520.
- Tucker, P. A., D. Tsernoglou, A. D. Tucker, F. E. Coenjaerts, H. Leenders und P. C. van der Vliet (1994). "Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding." Embo J **13**(13): 2994-3002.
- Urbanke, C. und A. Schaper (1990). "Kinetics of binding of single-stranded DNA binding protein from *Escherichia coli* to single-stranded nucleic acids." Biochemistry **29**: 1744-1749.
- Urbanke, C., B. Ziegler und K. Stieglitz (1980). "Complete Evaluation of Sedimentation Velocity Experiments in the Analytical Ultracentrifuge." Fresenius Z. Anal. Chem. **301**: 139-140.
- Vales, L. D., J. W. Chase und J. B. Murphy (1980). "Effect of *ssbA1* and *lexC113* mutations on lambda prophage induction, bacteriophage growth, and cell survival." J Bacteriol **143**(2): 887-96.
- Van Dyck, E., F. Foury, B. Stillman und S. J. Brill (1992). "A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB." Embo J **11**(9): 3421-30.
- van Holde, K. E., W. C. Johnson und P. S. Ho (1998). Principles of Physical Biochemistry. New Jersey, Prentice Hall.
- Wadsworth, R. I. M. und M. F. White (2001). "Identification and properties of the crenarchaeal single-stranded DNA binding protein from *Sulfolobus solfataricus*." Nucl. Acids. Res. **29**(4): 914-920.
- Webster, G., J. Genschel, U. Curth, C. Urbanke, C. H. Kang und R. Hilgenfeld (1997). "A common core for binding single-stranded DNA: structural comparison of the single-stranded DNA-binding proteins (SSB) from *E-coli* and human mitochondria." FEBS Letters **411**: 313-316.
- White, O., J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, E. K. Hickey, J. D. Peterson, R. J. Dodson, D. H. Haft, M. L. Gwinn, W. C. Nelson, D. L. Richardson, K. S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J. J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K. S. Makarova, L. Aravind, M. J. Daly, K. W. Minton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, K. E. Nelson, S. Salzberg, H. O. Smith, J. Craig, Venter und C. M. Fraser (1999). "Genome Sequence of

- the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1." Science **286**(5444): 1571-1577.
- Williams, K. R., J. B. Murphy und J. W. Chase (1984). "Characterization of the structural and functional defect in the *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein encoded by the *ssb-1* mutant gene. Expression of the *ssb-1* gene under lambda pL regulation." J Biol Chem **259**(19): 11804-11.
- Williams, K. R., E. K. Spicer, M. B. Lopresti, R. A. Gugenheimer und J. W. Chase (1983). "Limited proteolysis studies on the *E. coli* single-stranded DNA binding protein." Journal of Biological Chemistry **258**: 3346-3355.
- Witte, G. (2001). Interaktionen zwischen Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen und der χ -Untereinheit der DNA-Polymerase III aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Biophysikalische Chemie, Universität Hannover.
- Witte, G., C. Urbanke und U. Curth (2003). "DNA polymerase III χ -subunit ties single-stranded DNA binding protein to the bacterial replication machinery." Nucl. Acids. Res. **31**(15): 4434-4440.
- Xiao, H., R. Crombie, Z. Dong, R. Onrust und M. O'Donnell (1993). "DNA polymerase III accessory proteins. III. *ho/C* and *ho/D* encoding chi and psi." J Biol Chem **268**(16): 11773-8.
- Yang, C., U. Curth, C. Urbanke und C. H. Kang (1997). "Crystal structure of human mitochondrial single stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution." Nature Struct. Biol. **4**: 153-157.
- Yuzhakov, A., Z. Kelman und M. O'Donnell (1999). "Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase." Cell **96**(1): 153-63.
- Yuzhakov, A., J. Turner und M. O'Donnell (1996). "Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication." Cell **86**(6): 877-86.
- Zabeau, M. und K. K. Stanley (1982). "Enhanced expression of cro-beta-galactosidase fusion proteins under the control of the PR promoter of bacteriophage lambda." Embo J **1**(10): 1217-24.

Lebenslauf

Gregor Witte

05.07.1974	geboren in Langenhagen
1981-1985	Besuch der Grundschule Hallermund in Eldagsen
1985-1987	Besuch der Orientierungsstufe Süd in Springe
1987-1994	Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums in Springe
1994	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
1994-1995	Zivildienst bei der DRK-Sozialstation in Springe
1995-2001	Studium an der Universität Hannover WS 1995 Chemie SS 1996 bis SS 2001 Biochemie
09/2000-03/2001	Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover
03/2001	Abschluss als Diplom-Biochemiker
06/2001-06/2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Urbanke