

Das Tyrosinintegrase-Analog TelN  
katalysiert die *telomere resolution*  
im Bakteriophagen NI5

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Diplombiochemiker

**Jan Deneke**

aus Berlin

Berlin 2002

*„Wer das Leben nicht schätzt, der verdient es nicht.“*

Leonardo da Vinci

italienischer Maler, Bildhauer, Architekt, Naturforscher und Ingenieur (1452 - 1519)

1. Gutachter: Prof. Dr. *rer. nat.* Walter Messer

2. Gutachter: Prof. Dr. *rer. nat.* Ralf Erdmann

Tag der Disputation: 29.10.2002

---

## Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Juni 1999 bis Juni 2002 im Labor von Dr. Erich Lanka am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik. Ihm gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine vielfältigen Anregungen und Hinweise. Sein Wissen und seine Erfahrung haben mir sehr geholfen. Diese Arbeit hätte ohne ihn nicht in dieser Form entstehen können.

Für die, tatkräftige Unterstützung und manch guten Rat möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen, Marianne Schlicht, Dr. Günter Ziegelin, Stefan Ehrentraut und Isabel Pasch bedanken. Gunnar Schröder, Kodoktorand und Sitznachbar, sei wegen seiner intelligenten Vorschläge und mach' vergnüglicher Runde Golf ausdrücklich hervorgehoben.

Besonderen Dank richte ich an Rudi Lurz und Gerhild Lüder für die Hilfe und Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie, sowie für Tee, Kekse und moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Auch den vielen Mitarbeitern am Institut, die mir das Leben leichter gemacht haben, indem sie dafür gesorgt haben, daß der Forschungsberieb reibungslos laufen kann, sei an dieser Stelle gedankt.

Ebenfalls zu danken habe ich Prof. Dr. Ralf Erdmann und Prof. Dr. Walter Messer für ihre Bereitschaft, diese Arbeit an der Freien Universität zu betreuen.

Nicht zuletzt Dank auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, welche unsere Arbeitsgruppe finanziell unterstützte und Direktor Prof. Dr. Hans Lehrach für die materielle und finanzielle Unterstützung.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	II
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
<b>I Einleitung .....</b>	<b>I</b>
1.1 Erhaltung der vollständigen genetischen Information in linearen Genomen .....	1
1.2 Der Bakteriophage NI5 als Modellsystem für das Studium linearer Genome .....	2
1.3 Die Replikation linearer, kovalent geschlossener Plasmide erfordert einen besonderen Reaktionsschritt .....	5
1.4 Was versteht man unter <i>telomere resolution</i> ? .....	8
1.5 Aufgabenstellung .....	10
<b>2 Material .....</b>	<b>11</b>
2.1 <i>E. coli</i> Stämme .....	11
2.2 Bakteriophagen, Plasmide und Nukleinsäuren .....	11
2.2.1 Bakteriophagen .....	11
2.2.2 Plasmide .....	12
2.2.3 Genetische Karten der wichtigsten in dieser Arbeit hergestellten Plasmide .....	18
2.2.4 Nukleinsäuren .....	19
2.3 Medien .....	27
2.4 Chemikalien und Proteine .....	27
2.5 Puffer .....	28
2.6 Sonstige Materialien .....	29

<b>3 Methoden</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 DNA-Techniken</b> .....	<b>30</b>
3.1.1 Allgemeines .....	30
3.1.2 DNA-Isolierung .....	30
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.1.4 <i>In vitro</i> Rekombinationstechniken .....	31
3.1.5 <i>telN</i> Mutagenese .....	32
3.1.6 DNA-Sequenzierung.....	33
3.1.7 DNA Endmarkierung .....	33
<b>3.2 Elektrophoresetechniken</b> .....	<b>33</b>
3.2.1 Dokumentation von Elektrophoreseexperimenten .....	33
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung.....	34
3.2.3 Alkalische Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Analyse.....	34
3.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA-Proteinkomplexen.....	34
3.2.5 DNA-Sequenzgele .....	35
3.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung (SDS-PAGE) .....	35
<b>3.3 Proteinanalyse</b> .....	<b>36</b>
3.3.1 Glyceringradientenzentrifugation.....	36
3.3.2 Proteinüberproduktion durch induzierte Genexpression.....	36
3.3.3 Denaturierender analytischer Zellaufschluss.....	36
3.3.4 Nativer analytischer Zellaufschluss .....	37
3.3.5 Nativer präparativer Zellaufschluss.....	37
3.3.6 Proteinreinigung mittels Säulenchromatographie .....	37
3.3.7 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran .....	37
3.3.8 Proteinsequenzierung .....	38
<b>3.4 Transmissionselektronenmikroskopie</b> .....	<b>38</b>
3.4.1 Spreitung und Längenmessung von doppelsträngiger und denaturierter DNA.....	38
3.4.2 Nachweis von Protein-DNA Komplexen.....	38

3.5 Biochemische Analysemethoden .....	39
3.5.1 Bestimmung der <i>cleaving-joining</i> Aktivität des TelN Proteins .....	39
3.5.2 Fragmentretentionstest zur Analyse von DNA-Protein Interaktionen.....	39
3.5.3 DNaseI <i>footprint</i> Analyse.....	39
3.5.4 <i>Surface Plasmon Resonance</i> wurde zur Analyse von Protein-DNA Interaktion benutzt.....	40
4 Ergebnisse .....	42
4.1 4-stufige TelN Reinigung.....	42
4.2 Herstellung von TelN DNA-Substraten.....	45
4.3 TelN hat <i>telomere resolution</i> Aktivität .....	46
4.3.1 TelN kann <i>telRL</i> effizient linearisieren .....	46
4.3.2 TelN alleine erzeugt geschlossene <i>Hairpin</i> -Enden .....	47
4.4 Die Effizienz der <i>telomere resolution</i> wurde analysiert .....	49
4.4.1 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen.....	49
4.4.2 Die <i>telomere resolution</i> wird von divalenten Kationen stimuliert .....	50
4.4.3 Benötigt die <i>telomere resolution</i> Z-DNA Konformation in <i>telO</i> ? .....	51
4.5 TelN hat die Fähigkeit, DNA zu binden.....	53
4.5.1 Das aktive Zentrum TelNs liegt innerhalb der Aminosäuren 402-431 .....	53
4.5.2 <i>Telomere resolution</i> : Entkopplung von Erkennung/Bindung und Transesterifikation .....	55
4.5.3 TelN Deletionsmutanten dienen zur Analyse der Domänenstruktur von TelN.....	56
4.5.4 In <i>tos</i> wird <i>telRL</i> spezifisch von TelN erkannt und gebunden.....	59
4.5.5 TelN hat sequenzspezifische- und nicht-sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit .....	61
4.5.6 Zwei TelN Moleküle binden spezifisch an eine <i>telRL</i> -Sequenz .....	63
4.5.7 TelN schützt ~ 50 bp von <i>telRL</i> vor Angriff durch DNaseI .....	64
4.6 <i>telRL</i> -Substratmutanten gaben Aufschluß über funktionelle Bereiche in <i>telRL</i> .....	66
4.6.1 TelNs sequenzspezifische Affinität zu <i>telRL</i> wird von R3 / L3 vermittelt .....	66
4.6.2 <i>telO</i> ist ein hinreichendes Substrat für die <i>telomere resolution</i> , R3/L3 ist für eine effiziente Reaktion notwendig.....	68

4.6.3 <i>telO</i> ist essentiell für die Erkennung und Prozessierung durch TelN .....	68
4.7 TelN schneidet versetzt in <i>telO</i> mit einem 6-Basenpaar Überhang.....	71
4.7.1 Die Transesterifikation durch TelN findet in <i>telO</i> an dem Übergang TA zu CG statt .....	71
4.7.2 pJD105(TA) <sub>7</sub> ist ein Suizidsubstrat .....	72
4.7.3 TelN bindet transient an das 3'-Ende der <i>telomere resolution site</i> .....	73
4.7.4 <i>Run-off</i> Sequenzierung des prozessierten Suizidsubstrats pJD105(TA) <sub>7</sub> zeigt einen 6-Basenpaar Überhang .....	74
5 Diskussion .....	76
5.1 TelN als Tyrosinintegrase-Analog.....	76
5.2 Vorhersage der Domänenstruktur von TelN.....	77
5.3 Die Schritte der <i>telomere resolution</i> Reaktion.....	78
5.4 Die DNA-Substratkonformation: der Schlüssel für die <i>telomere resolution</i> Reaktion? ...	81
5.5 Gemeinsamkeiten zwischen eng verwandten <i>telomere resolution</i> Systemen .....	86
5.6 Perspektiven .....	88
6 Summary .....	90
7 Zusammenfassung .....	91
8 Abkürzungen .....	92
9 Literatur.....	93
10 Lebenslauf.....	102

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die Morphologie des lambdoiden Bakteriophage N15.....	3
Abb. 2 Der lytische und lysogene Zyklus des Bakteriophagen N15.....	4
Abb. 3 Kleinstes noch linear replizierendes Miniplasmid, erzeugt aus N15 .....	5
Abb. 4 Domänenstruktur von P4 $\alpha$ und N15 RepA .....	6
Abb. 5 Modell zur Replikation des linearen Plasmids des Bakteriophagen N15.....	8
Abb. 6 Schematische Darstellung der <i>telomere resolution</i> .....	9
Abb. 7 Die <i>telomerase occupancy site (tos)</i> und <i>telN</i> bilden eine genetische Einheit .....	9
Abb. 8 Plasmidkarten von Überexpressions- und Substratplasmiden .....	18
Abb. 9 Vergleich der Shine-Dalgarno-Sequenz von <i>Gen10</i> des Bakteriophagen T7 und N15- <i>telN</i> .....	42
Abb. 10 TelN Proteinreinigung.....	43
Abb. 11 Glyzeringradientenzentrifugation von TelN.....	44
Abb. 12 Schematische Darstellung des TelN-Substrats.....	46
Abb. 13 Gelelektrophoretischer Nachweis für Produkte der <i>telomere resolution</i> .....	47
Abb. 14 Alkalische Agarose-Gelelektrophorese von linearer DNA mit kovalent geschlossenen Enden .....	48
Abb. 15 Elektronenmikroskopischer Nachweis kovalent geschlossener DNA-Enden .....	49
Abb. 16 <i>Telomere resolution</i> : Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	50
Abb. 17 Einfluß zweiwertiger Kationen auf die <i>telomere resolution</i> .....	51
Abb. 18 Einfluß von Aminen auf die <i>telomere resolution</i> .....	52
Abb. 19 Alaninscan an TelN.....	53
Abb. 20 Reaktion von pJD105 mit H415A.....	54
Abb. 21 Entkopplung von Bindung und Transesterifikation der <i>telomere resolution</i> .....	55



Abb. 22 Elektronenmikroskopie von TelN Y424F- <i>tos</i> Komplexen.....	56
Abb. 23 Sequenzvergleich zwischen TelN und analogen und potentiell analogen Proteinen..	57
Abb. 24 N- und C-terminale Deletionen am TelN Protein und deren Auswirkung auf die <i>telomere resolution</i> .....	58
Abb. 25 TelN bindet in <i>tos</i> an <i>telRL</i> .....	60
Abb. 26 Bindungskonstanten definierter TelN-Substrat Komplexe.....	61
Abb. 27 <i>Surface plasmon resonance</i> Analyse der TelN-DNA Bindung.....	64
Abb. 28 DNaseI <i>footprint</i> Analyse von TelN Y424F- <i>telRL</i> -, und - <i>telRL</i> A20TT21A-Komplexen .....	65
Abb. 29 Schematische Darstellung der in TelN- <i>telRL</i> Komplexen gegen DNaseI geschützten Bereiche.....	66
Abb. 30 Mutationen in funktionellen Bereichen des <i>telRL</i> -Substrats.....	67
Abb. 31 Kinetik der <i>telomere resolution</i> mit verschiedenen Substraten .....	68
Abb. 32 <i>Next-neighbour</i> Analyse an einem synthetischen <i>telRL</i> -Substrat .....	70
Abb. 33 In der <i>next-neighbor</i> -Analyse verwendete Oligonukleotide.....	71
Abb. 34 Prozessierung von pJD105(TA) <sub>7</sub> mit TelN.....	72
Abb. 35 Nachweis kovalenter Bindung von TelN an das Suizidsubstrat pJD105(TA) <sub>7</sub> .....	73
Abb. 36 <i>Run-off</i> Sequenzierung am TelN-behandelten Suizid-Substrat pJD105(TA) <sub>7</sub> .....	74
Abb. 37 Zuordnung funktioneller Bereiche in <i>telRL</i> .....	75
Abb. 38 Vorhergesagte TelN-Domänenstruktur .....	77
Abb. 39 Teilschritte der <i>telomere resolution</i> .....	79
Abb. 40 Modelle für die TelN- <i>telRL</i> Interaktion.....	82
Abb. 41 Mögliche Krümmung verschiedener <i>telomere resolution sites</i> .....	84
Abb. 42 DNA-Sequenzvergleich verschiedener <i>telomere resolution sites</i> .....	87

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	12
Tab. 2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	13
Tab. 3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide .....	19
Tab. 4 Säulenmatrices .....	29
Tab. 5 Diverse Materialien .....	29
Tab. 6 Temperaturprogramm der PCR.....	31
Tab. 7 Reinigungstabelle für TelN.....	43
Tab. 8 Zusammenfassung der biophysikalischen Eigenschaften TelNs .....	45
Tab. 9 Funktionalität der im Alaninscan erzeugten TelN-Punkmutanten.....	54
Tab. 10 Scheinbare Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von TelN-DNA Komplexen ...	62