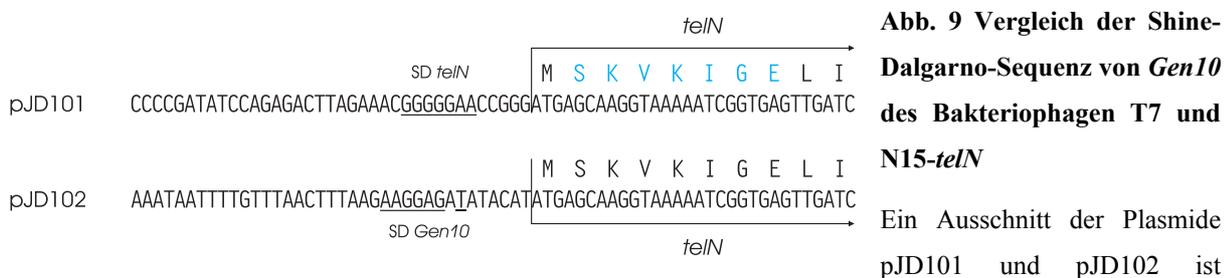


4 Ergebnisse

4.1 4-stufige TelN Reinigung

Um TelN als Enzym charakterisieren zu können, wurde das *Gen29 (telN)* des Bakteriophagen N15 mit seiner Shine-Dalgarno-Sequenz molekular in den Expressionsvektor pMS119EH kloniert. Das resultierende Plasmid (pJD101, siehe Tab. 2) war in SCS1-Zellen unter Selektionsdruck stabil. Die native Shine-Dalgarno-Sequenz wurde benutzt, weil sie im Falle von *telN* zu besserer Genexpression führte, als die in pJD102 verwendete SD-Sequenz von *Gen10* des Bakteriophagen T7 (Abb. 9). Induktion der Transkription des *lacI/P_{lac}* basierten Expressionssystems ermöglichte die Überproduktion eines unter physiologischen Bedingungen gut löslichen Proteins (bei dieser Reinigung erzielte Konzentration: ca. 30 mg/ml) der gemessenen Größe von ~75 kDa (Abb. 10, Spuren a, b). Die Identität des Genprodukts wurde durch N-terminale Sequenzierung bestimmt. Die Peptidsequenz (SKVKIGE) entsprach der für TelN vorhergesagten, jedoch wird das N-Formylmethionin (Codon AUG) offenbar posttranslational entfernt (Abb. 9).



gezeigt. Das 5'-Ende des *telN*-Gens ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem *telN*-Gen ist unterstrichen. Die bei der N-terminalen Sequenzierung des *telN*-Genprodukts ermittelte Aminosäuresequenz ist blau markiert.

SCS1(pJD101) wurde zur präparativen Überproduktion von TelN benutzt. Das Protein wurde durch Chromatographie über vier verschiedene Säulenmatrices gereinigt (Abb. 10, Tab. 7). Das Material in der Bande mit einer Größe von 62 kDa wurde durch N-terminale Sequenzierung als TelN-Teilpeptid identifiziert (TelN*, ~3 %, Abb. 10, Spur h). Wahrscheinlich handelt es sich um ein Abbauprodukt oder um ein durch einen Kettenabbruch bei der Translation entstandenes Fragment. Da TelN* größer ist, als das kleinste im Rahmen dieser Arbeit hergestellte, noch funktionsfähige C-terminal verkürzte TelN-Protein (Abb. 24), trägt es wahrscheinlich anteilmäßig zur enzymatischen Gesamtaktivität von Fraktion V bei.

Die Verunreinigung bei 42 kDa (~1 %, Abb. 10, Spur h) konnte durch N-terminale Sequenzierung als Lac-Repressor identifiziert werden. Die Ausbeute an TelN war 2,2 mg/l Kultur.

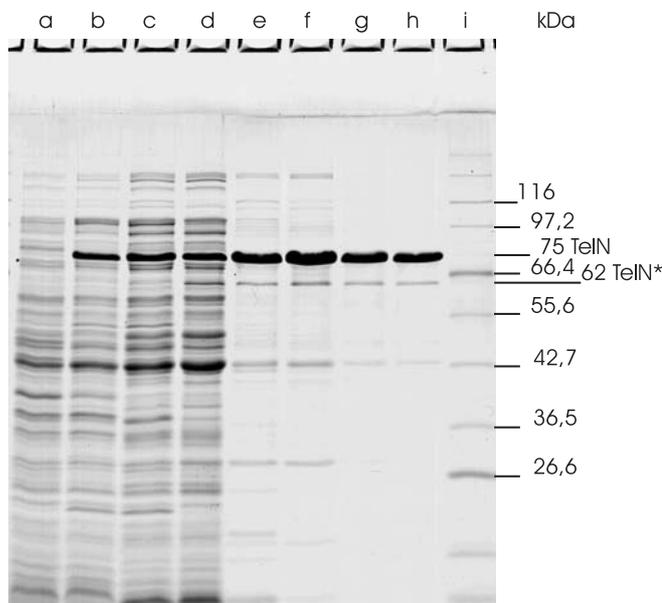


Abb. 10 TelN Proteinreinigung

Aliquots von Zellextrakten und Reinigungsstufen I-V (siehe 3.3.2, 3.3.5, 3.3.6 und Tab. 7) wurden mit SDS-PAGE (15 %) analysiert. Spuren a und b: SDS-Extrakt nicht-induzierter und IPTG-induzierter SCS1(pJD101) Zellen (31 und 34). Spur c: Brij-Lysozym-Extrakt induzierter SCS1(pJD101) Zellen (51); Spur d: Fraktion I (46); Spur e: Fraktion II (9,2); Spur f: Fraktion III (14,5); Spur g: Fraktion IV (4,1); Spur h: Fraktion V (3,9); Spur i: Proteinmarker. Die Proteinmenge in µg ist in Klammern angegeben. Die Bande bei 63 kDa in Fraktion V ist ein TelN-Teilpeptid (TelN*).

Tab. 7 Reinigungstabelle für TelN

Fraktion	Reinigungsschritt	Gesamtprotein	TelN Ausbeute	TelN Reinheit
		[mg] ^{a,d}	[%] ^{b,d}	[%] ^{c,d}
I	Prezipitation mit (NH ₄) ₂ SO ₄	2394	100	7
II	Heparin-Sepharose CL-6B	201	83	70
III	Hydroxylapatite Bio-Gel	186	77	70
IV	DEAE-Sephacel	61,9	32	90
V	Phosphocellulose P11	11,4	7	96

^a Proteing Gesamtmenge [mg]; ^b Ausbeute an TelN-Protein [%]; ^c Anteil TelNs an der Proteing Gesamtmenge [%]; ^d Die Proteinmengen und die Einheitlichkeit wurden densitometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.1).

Die Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE überprüft. Das TelN Protein wurde in SCS1(pJD101) Zellen hergestellt (4 x 1,2 l, 36 g Zellen [Naßgewicht]). Die Überproduktion und Lyse der Zellen wurde wie in 3.3.2 und 3.3.5 beschrieben durchgeführt. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Das zentrifugierte Lysat wurde mit (NH₄)₂SO₄ versetzt (60% gesättigte Lösung, Di Jeso, 1968), 30 min gerührt und das Präzipitat abzentrifugiert (90.000 x g, 30 min, 4°C). Das Sediment wurde in Puffer A (50 mM NaCl, siehe 2.5) resuspendiert und 3 x 6 h gegen diesen Puffer dialysiert (Fraktion I, 100 ml, Abb. 10, Spur d). Es folgte die chromatographische Reinigung mittels der oben angegebenen Säulenmatrixes. Bedingungen:

Eluierte Fraktion	Equil. Puffer ^a	Waschvol. [ml]	Gradient [mM] ^b	TelN Elution [mM]	Elutionsvol. [ml]	Säulengröße [cm]	Abb. 10 Spur
II	A ^c	250	50 - 600 NaCl	430	175	2,6 x 15	e
III	B ^c	100	20 - 500 K _x H _y PO ₄	180	75	2,6 x 5	f
IV	A ^c	60	50 - 600 NaCl	160	58	2,6 x 5	g
V	C ^c	80	50 - 600 NaCl	340	4,8 ^d	1,6 x 9	h

^a Die ionischen Bedingungen des Equilibrierungspuffers und Gradientenstartpuffers waren identisch; ^b in Equilibrierungspuffer; ^c Siehe 2.5; ^d Die *peak*-Fraktionen (22 ml) wurden durch Dialyse gegen 20 % PEG 20.000 in Puffer A [50 mM NaCl] eingeeengt und anschließend gegen 50 % Glycerin in Puffer A [50 mM NaCl] dialysiert. TelN wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt. Das Protein war unter diesen Bedingungen für mindestens drei Jahre.

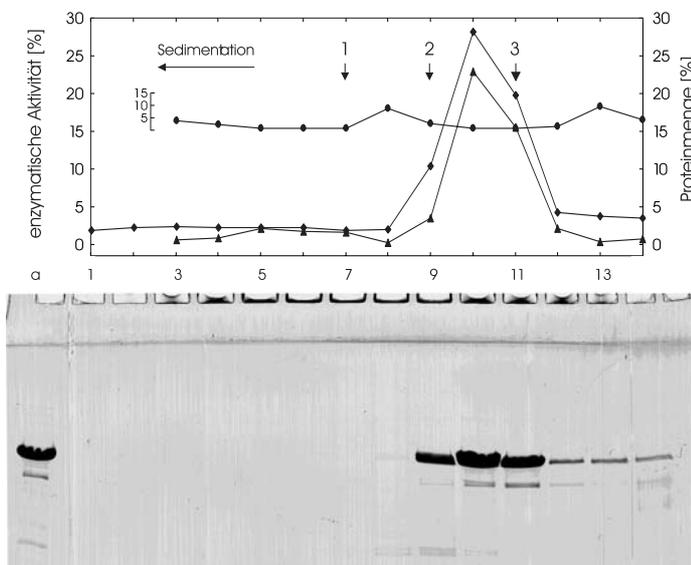


Abb. 11 Glyceringradientenzentrifugation von TelN

Ein linear Glyceringradient, beladen mit TelN (Fraktion V, 400 µg, Tab. 7) wurde wie beschrieben (3.3.1) zentrifugiert und ausgetropft. 3-µl-Aliquots der Fraktionen wurden mit SDS-PAGE untersucht. Die Abbildung zeigt das Coomassie-Blau gefärbte Gel. Die einzelnen Fraktionen wurden auf TelN Aktivität getestet (3.5.1). Die relative Proteinmenge und relative Aktivität (in % des insgesamt auf den Gradienten aufgetragen Proteins [◆] und dessen Aktivität [▲])

wurde in dem Graphen dargestellt. Der Quotient Proteinmenge [mg] / enzymatische Aktivität [U] ist auf der in die Abbildung eingefügten Skala eingezeichnet [●]. Der waagrechte Pfeil zeigt die Richtung der Sedimentation. Senkrechte Pfeile bezeichnen die Position der *peak*-Fraktionen von Referenzproteinen (1, Katalase [11,3]; 2, Aldolase [7,8]; 3, BSA [4,4]) in Svedbergeinheiten [$S_{20,w}$].

Das gereinigte TelN-Protein (Fraktion V) wurde einer Glyceringradientenzentrifugation unterzogen (Abb. 11) um die Größe und die Quartärstruktur des Proteins zu ermitteln und dem gereinigten Protein unzweifelhaft die vorhergesagte enzymatische Aktivität zuzuordnen. Mit einem Sedimentationswert von 5,1 $S_{w,20}$ sedimentiert TelN etwas schneller als es für ein ideales, globuläres Protein von 72.2 kDa zu erwarten wäre

(4,7 $S_{w,20}^1$), aber nicht schnell genug um von einem Dimer ausgehen zu können (7,4 $S_{w,20}^1$). Das heißt, TelN verhält sich in Lösung wie ein Monomer. Die ebenfalls durchgeführte Gelfiltration (Daten nicht gezeigt) ergab einen Stokes-Radius von 5 nm. Zusammen mit den

Tab. 8 Zusammenfassung der biophysikalischen Eigenschaften TelNs

630 Aminosäuren
 $pI_{calc} = 5,8$
 $M_{calc} = 72.177 \text{ Da}$
 $M_r \sim 75.000 \text{ Da}$
 überschüssige Ladungen = -13
 Monomer in Lsg. ($S_{20,w} = 5,1$)
 Achsenverhältnis = 1 : 1,8
 Löslichkeit > 30 mg/ml

Daten aus der Glyzeringradientenzentrifugation konnte das Achsenverhältnis von TelN mit 1 : 1,8 berechnet werden. Daraus folgt, daß TelN kein globuläres, sondern ein anisometrisches Protein ist. TelN* sedimentiert mit derselben Geschwindigkeit wie BSA. Dies ist mit der monomeren Masse dieses Fragments nahezu konsistent. Der Lac-Repressor bildet jedoch in Lösung ein Tetramer und sedimentiert daher mit 7,8 $S_{w,20}$ schneller als man es vom Monomer erwarten würde. Die Sedimentationsgeschwindigkeit entspricht seiner scheinbaren Masse von 168 kDa (4 x 42 kDa). Die Maxima der enzymatischen Aktivität und der TelN-Menge korrelierten.

Das Verhältnis von Proteinmenge / enzymatischer Aktivität ist über alle Fraktionen nahezu konstant (Abb. 11). Die Eigenschaften des TelN-Proteins sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

4.2 Herstellung von TelN DNA-Substraten

Um ein *in vitro*-System für die *telomere resolution* etablieren zu können, wurden die vorhergesagte DNA-Zielsequenz für die TelN-Reaktion (*tos*, Rybchin & Svarchevsky, 1999, Abb. 12) und Teile davon molekular kloniert werden. Die erzeugten Plasmide pJD104, pJD105 und pJD106 enthalten *tos*, *telRL* und *telO* (Tab. 2, Abb. 12). Während pJD105 und pJD106 in SCS1 unter Selektionsdruck stabil erhalten blieb, war SCS nicht mit pJD104 transformierbar (Daten nicht gezeigt). SURE2, ein *recBJ* Stamm ließ sich jedoch mit pJD104 transformieren. In diesem Stamm können Rekombinationsereignisse (ausgelöst durch Tertiärstrukturen der DNA wie z. B. *hairpins*, *loops* und *holliday junctions*) während der Replikation nicht mehr stattfinden (2.1). Ein *recA*-Stamm wie SCS1, bei dem lediglich die Multimerisierung verhindert wird, erwies sich als ungeeignet.

¹ berechneter Wert, ausgehend von einem Achsenverhältnis von 1:1 für das monomere Protein

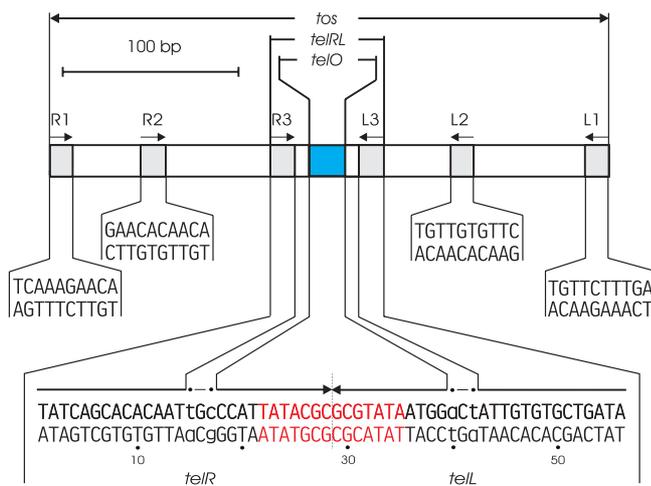


Abb. 12 Schematische Darstellung des TelN-Substrats

tos (*telomerase occupancy site*, 310 bp, Rybchin & Svarchevsky, 1999) besteht aus 3 *inverted repeats* (R1/L1 und R2/L2 mit jeweils 10 bp sowie R3/L3 mit 14 bp, graue Boxen) sowie *telO* (blaue Box), einem 22 bp Palindrom. R3/L3 und *telO* bilden zusammen *telRL* (56 bp). Die Sequenzen von R1/L1, R2/L2 sowie *telRL* sind als Basenfolge dargestellt. Die Pfeile über den grauen Boxen zeigen die Richtung des jeweiligen

repeats. Die Pfeile über der *telRL*-Sequenz zeigen den rechten und linken Telomerarm von N15 (*telR* und *telL*). *telRL* ist ein 56-bp nicht-perfektes Palindrom. Die Nukleotide der Sequenz wurden von bp 1-56 nummeriert, um ein einfaches Referenzsystem zu haben. Zwei Basenpaare unterbrechen die Symmetrie. Diese sind in der Sequenz durch Kleinbuchstaben und Punkte in den darüberliegenden Pfeilen markiert. Der rot markierte Bereich in *telRL* bezeichnet einen Sequenzabschnitt (14 bp) mit vorhergesagter Z-DNA Konfiguration (Rybchin & Svarchevsky, 1999).

4.3 TelN hat *telomere resolution* Aktivität

4.3.1 TelN kann *telRL* effizient linearisieren

Das gereinigte Protein und potentielle DNA-Substrate (Svarchevsky & Rybchin, 1984; Rybchin & Svarchevsky, 1999) wurden in einem *in vitro* Experiment verwendet um die vorhergesagte Aktivität des Enzyms nachzuweisen. Die *telRL*-Sequenz - der innere Teil des vollständigen *tos*-Substrats - ist für eine vollständige Prozessierung unter Standardbedingungen hinreichend. DNA ohne TelN-Substrat bleibt unverändert (Abb. 13, Spur h und i). Ist lediglich das zentrale Palindrom (*telO*) vorhanden, entsteht unter Standardbedingungen nur wenig Reaktionsprodukt (Abb. 13, Spur e, f). Erst bei unphysiologisch hohen Enzymkonzentrationen ist eine nahezu vollständige Prozessierung zu beobachten (Abb. 31). Unter Standardbedingungen wurden 0,1 - 1 pmol DNA mit 0,3 pmol (25 Einheiten) TelN inkubiert (3.5.1). Versetzt man DNA (Form I, II oder III), die Substrat (*tos* oder *telRL*) enthält mit TelN, so entsteht lineare DNA, bzw. zwei DNA-Fragmente. Das Produkt der Reaktion wurde mit Agarosegelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 13, Spur b und c). Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß TelN sein Substrat sequenzspezifisch erkennt und prozessiert.

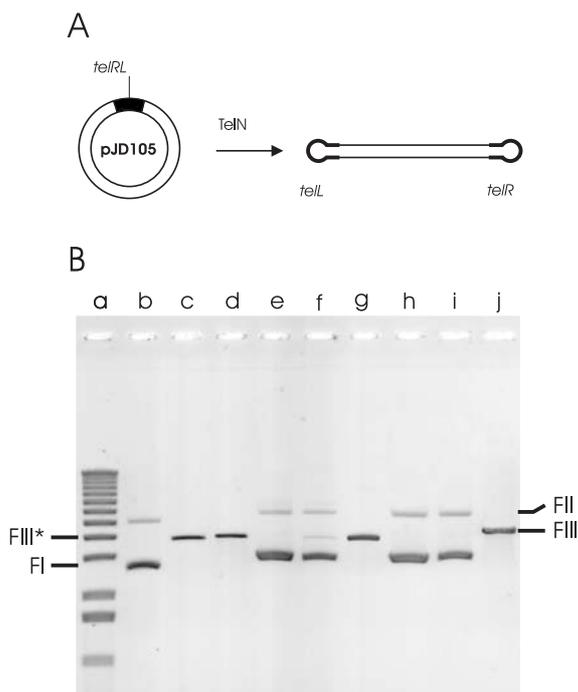


Abb. 13 Gelelektrophoretischer Nachweis für Produkte der telomere resolution

Der Reaktionsablauf ist in A schematisch dargestellt. Auf der Abbildung des 0,7 % ige Agarosegels (B) ist der Ansatz mit pJD105, pJD106 und pBR329 (Tab. 2) nach der Inkubation mit TelN Protein (3.5.1) gezeigt. Spur a: DNA-Größenstandard (1 kb-Leiter); b, c, d: pJD105; e, f, g: pJD106; h, i, j: pBR329; b, e, h: unbehandeltes Plasmid; c, f: Plasmid + TelN (150 U); i: Plasmid + TelN (7500 U); d, g, j: Plasmid + *AatII* (25 U). Das Substrat (FI) und das entstehende lineare Plasmid mit kovalent geschlossenen Enden sind markiert (FIII*, *vide infra*).

4.3.2 TelN alleine erzeugt geschlossene Hairpin-Enden

Da das lineare Plasmid von N15 *in vivo* ein kovalent geschlossenes Plasmid ist (Svarchevsky & Rybchin, 1984), sollten die *in vitro* von TelN erzeugten DNA-Enden dieselbe Konfiguration aufweisen. Um diese Vorhersage zu überprüfen, wurde das Produkt der TelN-DNA Reaktion mittels alkalischer Agarosegelelektrophorese, Elektronenmikroskopie und Sequenzierung der DNA-Enden analysiert (3.1.6).

Das Substrat pJD104 wurde mit TelN inkubiert und dadurch in Form III* überführt. Das entstehende lineare DNA-Fragment wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, um die DNA in zwei unterschiedlich lange Fragmente zu spalten (Abb. 14, A). Diese hatten im nicht-denaturierenden Agarosegel die erwartete Länge (Abb. 14, B, Spur b und c, 3,5; 3,1; 1,3 und 0,9 kb). In der alkalischen Agarosegelelektrophorese jedoch entstanden einzelsträngige DNA-Fragmente der doppelten bei neutralem pH beobachteten Länge (Abb. 14, B, Spur c' und b', 7,0; 6,1; 2,6; 1,7 knt). Dieses Ergebnis zeigt, daß die von TelN erzeugten DNA-Fragmente eine kovalente Bindung zwischen den Enden der Stränge enthalten, also eine *hairpin*-Struktur bilden.

Durch Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, daß Inkubation von pJD104 mit TelN tatsächlich lineare DNA der erwarteten Länge produziert (Abb. 15, B). Diese DNA bildet nach der irreversiblen Denaturierung mit Formaldehyd einzelsträngige Ringe der

erwarteten doppelten Länge der linearen DNA (Abb. 15, A III und C). Daraus folgt, daß beide Enden der TelN-linearisierten DNA kovalent geschlossen sind.

Zusätzlich wurden die für die Agarosegelelektrophorese benutzten DNA-Fragmente wie in 3.1.6 beschrieben sequenziert (Daten nicht gezeigt). Dazu mußte das in Abb. 14, A III gezeigte, durch Spaltung mit *MscI* erhaltene DNA-Fragment nochmals durch Behandlung mit *EcoRI* verkürzt werden. Erst danach ließ sich der *hairpin* mit dem primer ‚teIET close‘ sequenzieren (Tab. 3).

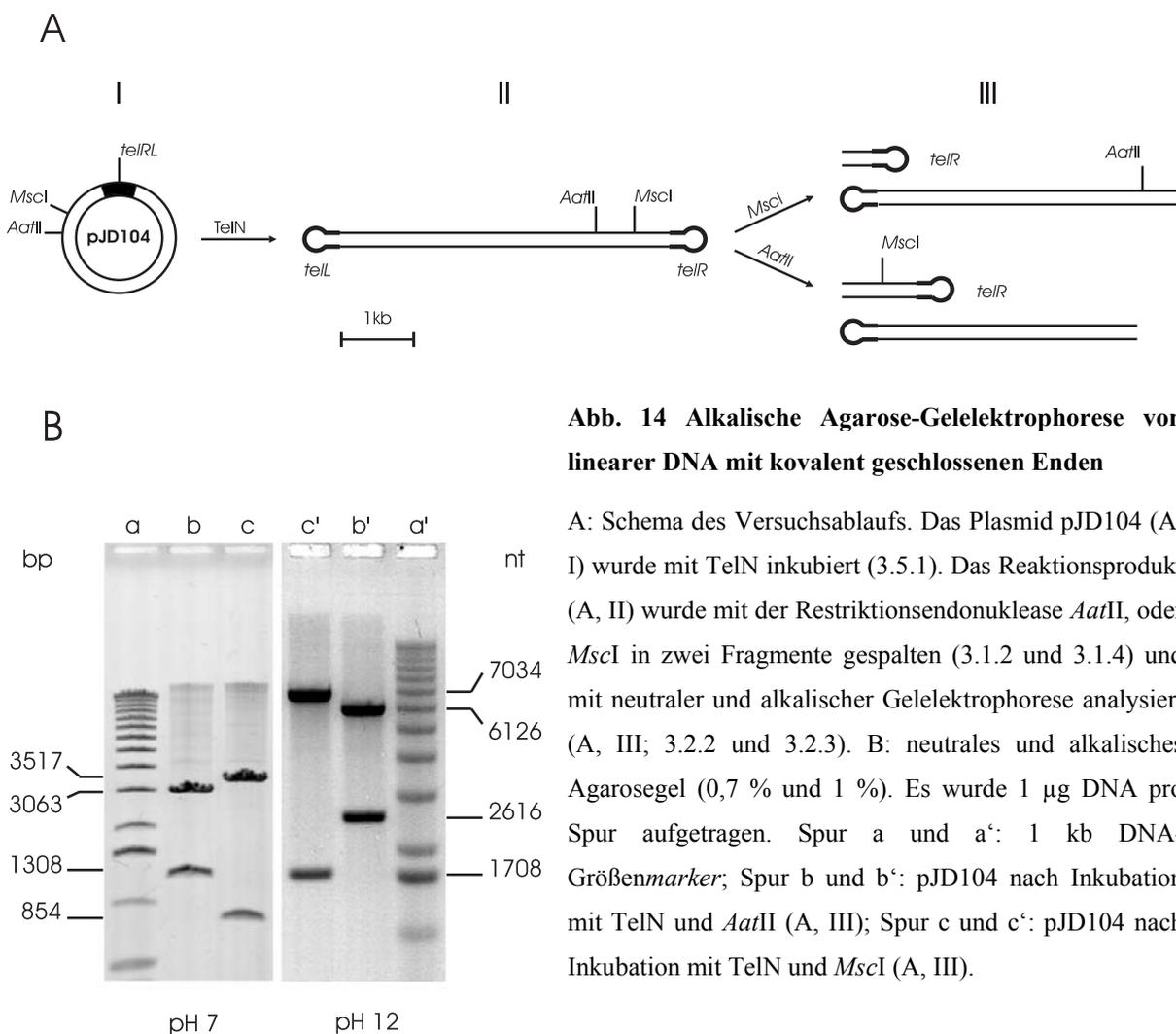


Abb. 14 Alkalische Agarose-Gelelektrophorese von linearer DNA mit kovalent geschlossenen Enden

A: Schema des Versuchsablaufs. Das Plasmid pJD104 (A, I) wurde mit TelN inkubiert (3.5.1). Das Reaktionsprodukt (A, II) wurde mit der Restriktionsendonuklease *AatII*, oder *MscI* in zwei Fragmente gespalten (3.1.2 und 3.1.4) und mit neutraler und alkalischer Gelelektrophorese analysiert (A, III; 3.2.2 und 3.2.3). B: neutrales und alkalisches Agarosegel (0,7 % und 1 %). Es wurde 1 µg DNA pro Spur aufgetragen. Spur a und a': 1 kb DNA-Größenmarker; Spur b und b': pJD104 nach Inkubation mit TelN und *AatII* (A, III); Spur c und c': pJD104 nach Inkubation mit TelN und *MscI* (A, III).

Die erhaltene Sequenz (ca. 100 bp) schließt das vollständige, perfekte Palindrom von *telR* bzw. *telL* ein (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der beiden anderen Ansätze zur Analyse der von TelN erzeugten DNA-Enden. Dies beweist, das die *in vitro* beobachteten Telomerenden von N15 durch eine *cleavage-joining* Reaktion erzeugt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die von Rybchin und Svarchevski, 1999

gemachten Vorhersagen. Die Reaktion wird von TelN alleine, ohne Kofaktoren oder zusätzliche Energiequelle (r/dNTPs) durchgeführt. In *Borrelia spp.* hat sich der Begriff *telomere resolution* für derartige Reaktionen durchgesetzt (Chaconas *et al.*, 2001), und wird auch hier verwendet. Das in dieser Arbeit entwickelte, einfache *in vitro* Systems der *telomere resolution* erlaubt das detaillierte Studium des Reaktionsmechanismus.

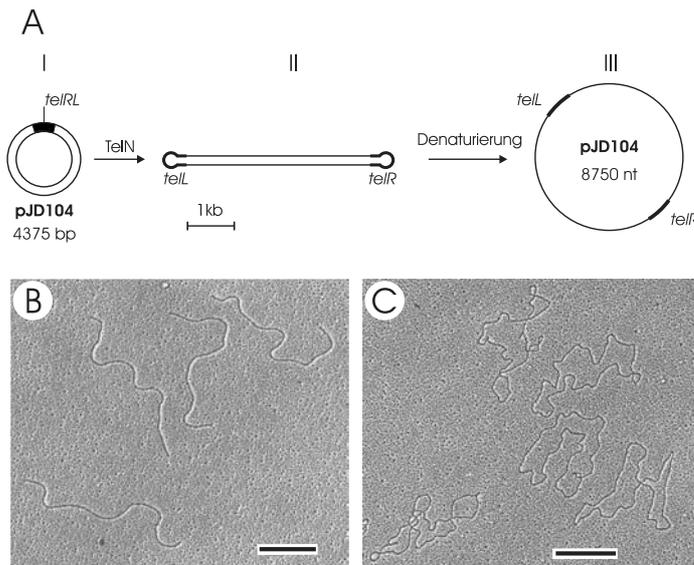


Abb. 15 Elektronenmikroskopischer Nachweis kovalent geschlossener DNA-Enden

A zeigt den Versuchablauf schematisch. Nach Inkubation des Substratplasmids mit TelN (A, I; siehe 3.5.1), wurde das Reaktionsprodukt isoliert (A, II; siehe 3.1.2). Einzelstängige DNA-Ringe nach Denaturierung (A, III). B: nicht-denaturierte, TelN-prozessierte DNA (A, II; siehe 3.4.1). C: DNA nach chemischer Denaturierung (A, III; siehe 3.4.1). Die Balken in B und C entsprechen 1 kb bzw. 1 knt.

4.4 Die Effizienz der *telomere resolution* wurde analysiert

4.4.1 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen

Um die *telomere resolution in vitro* zu charakterisieren wurde der Einfluß diverser Bedingungen und Chemikalien auf die Reaktion untersucht. Da bei geringen Kaliumglutamatkonzentrationen Pufferbedingungen herrschen, die den physiologischen in *E. coli* ähnlich sind (Griep & McHenry, 1989) wurde dieser Puffer zur Durchführung der Reaktion benutzt (Abb. 16, A). Weitere Untersuchungen der Pufferbedingungen zeigten eine Abhängigkeit der Reaktion von Chlorid- und Phosphationen. Diese inhibieren TelN bei Konzentrationen ab 200 mM bzw. 50 mM vollständig (Daten für Phosphationen nicht gezeigt). Die Inhibierung tritt bei ineffizient prozessierten Substraten (z.B. *telO*) schon bei kleinen Ionenkonzentrationen (ca. 25-50 mM) auf. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 7,5 (Abb. 16, B), das Temperaturoptimum bei 25°C (Abb. 16, C). Die Messung der Kinetik der Reaktion (Abb. 16, D) zeigt, daß diese sehr schnell abläuft (5×10^8 Reaktionen / s bei equimolaren Mengen von Substrat und Enzym). Es gibt keine erkennbare *lag*-Phase.

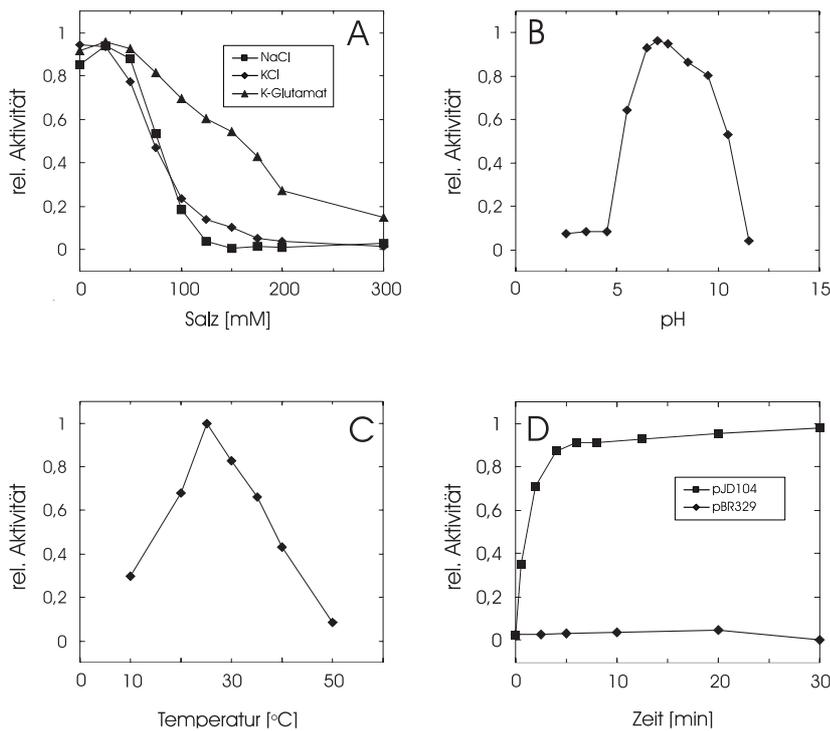


Abb. 16 Telomere resolution: Optimierung der Reaktionsbedingungen

In den Experimenten wurden 0,3 pmol TelN Protein und 0,15 pmol DNA-Substrat (pJD104) eingesetzt. A: Einfluß monovalenter Ionen; B: Einfluß des pH; C: Einfluß der Temperatur; D: Kinetik der TelN-Reaktion mit pJD104 und pBR329 als Substrat. Weitere Versuchsbedingungen siehe 3.5.1.

4.4.2 Die telomere resolution wird von divalenten Kationen stimuliert

In TelN gibt es eine Aminosäuresequenz, die einem vorhergesagten Bindungsmotiv für Ca^{2+} entspricht (TelN-Aminosäuren 541-563, ...ipEdDESqDDeLDEDEIeldeg..., die Aminosäuren in Großbuchstaben sind identisch zu dem von Kretsinger, 1987 definierten Motiv: $D_x(D,N,S)\sim(I,L,V,F,Y,W)(D,E,N,S,T,G)(D,N,Q,G,H,R,K)\sim(G,P)(L,I,V,M,C)(D,E,N,Q,S,T,A,G,C)x_2(D,E)(L,I,V,M,F,Y,W)D_x(S)\sim(I,L,V,F,Y,W)(D)(D)\sim(G,P)(L)(D)x\{2\}(E)(I)$). Daher wurde untersucht, ob Ca^{2+} oder andere divalente Kationen die Reaktion stimulieren. Dies ist der Fall (Abb. 17, A). TelNs enzymatische Aktivität wird jedoch nicht nur von Ca^{2+} -Ionen positiv angeregt, sondern auch von den Erdalkalitionen Be^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} (Abb. 17, A) sowie diversen zweiwertigen Nebengruppenmetallionen (Abb. 17, B). Dieses Verhalten des Enzyms ist ungewöhnlich. Die Aktivitätssteigerung der *telomere resolution* nimmt mit zunehmendem Ionenradius zu ($Be^{2+} < Mg^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$). Dies gilt sowohl für die Ionen aus der Gruppe der Erdalkalien, als auch für Co^{2+} und Mn^{2+} aus der Nebengruppe. Cu^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} gehorchen dieser Regel nicht, da sie sehr wahrscheinlich mit den SH-Gruppen der zwei Cysteinreste im Protein reagieren und so das Enzym inaktivieren. Ein weiteres ungewöhnliches Verhalten der *telomere resolution* trat auf, als versucht wurde, die Reaktion durch Chelatisierung der divalenten Kationen zu inhibieren: EDTA und EGTA können divalente Kationen teilweise ersetzen und die *telomere resolution* ebenfalls stimulieren (Abb. 17, C). Daraus folgt, daß das Enzym selbst zu seiner katalytischen Aktivität trotz

Calciumbindemotivs keine divalenten Kationen benötigt. Diese Ionen können daher wahrscheinlich nicht Teil des katalytisches Zentrums im Protein sein. Es stellt sich also die Frage, welche Rolle die Kationen, die funktionellen Gruppen von EDTA und EGTA, oder alternativ Polyamine in der *telomere resolution* spielen.

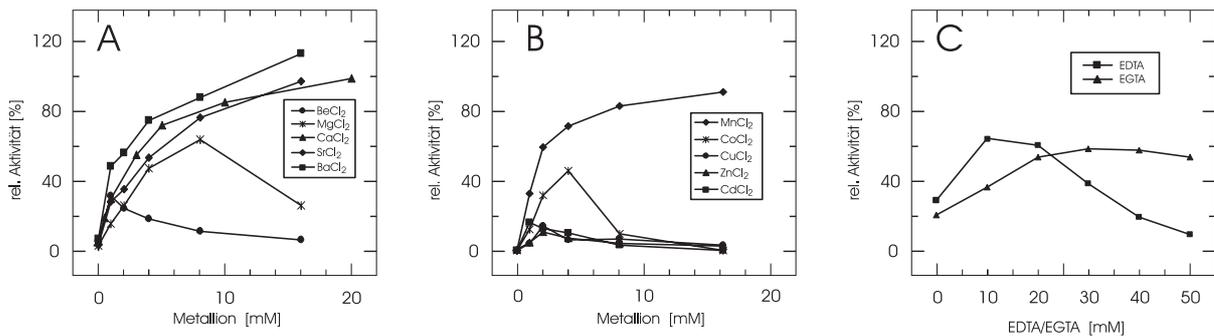


Abb. 17 Einfluß zweiwertiger Kationen auf die *telomere resolution*

Die Reaktionen wurden wie beschrieben durchgeführt (3.5.1), außer daß in A und B statt CaCl₂ die in der Abbildung angegebenen Salze eingesetzt wurden. Teil C beschreibt den Effekt von EDTA und EGTA (beides Na-Salz, pH 8,0) auf die Reaktion, ohne Zugabe von CaCl₂.

4.4.3 Benötigt die *telomere resolution* Z-DNA Konformation in *telO*?

TelRL enthält einen Bereich mit vorhergesagter Z-DNA Struktur (Rybchin & Svarchevsky, 1999, Abb. 18, C). Um zu überprüfen, ob *telRL* während der *telomere resolution* Z-Konformation in der DNA Struktur annehmen könnte, wurden dem EDTA und EGTA verwandte Substanzen ausgewählt, die aber nicht chelatbildend waren. Polyamine sind dafür bekannt die Bildung von Z-DNA zu begünstigen (Eichman *et al.*, 2000), da sie in der DNA die negativen Ladungen der Phosphatgruppen abschirmen (Abb. 18, D). Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch klar, daß nur Polyamine einen Effekt zeigten. Acteate (Natriumacetat, Ammoniumacetat, Citronensäure, etc.) hatten keinen Einfluß auf die Effizienz der Reaktion (Daten nicht gezeigt). Spermin, Spermidin und Cobalthexamamin ([Co(NH₃)₆]³⁺) zeigten hingegen eine ebenso starke Stimulierung der *telomere resolution* wie Ca²⁺ und Ba²⁺ (Abb. 18, A). Spermin war dabei das beste Stimulanz. Es erreicht den maximalen Effekt bereits in einem Konzentrationsbereich (0,2 mM) der eine Größenordnung unter der des nächst effizienten Amins (Spermidin, 2 mM) liegt. Spermin wurde deswegen in einem Competitionsexperiment zusammen mit Ca²⁺ eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß Ca²⁺ und Spermin einen additiven Effekt auf die Stimulierung der Reaktion haben (Abb.

18, B). Es findet eine Anregung der Reaktion statt, die über das hinaus geht, was jede der beiden Komponenten einzeln bewirken kann. Dieses Verhalten des Systems legt den Schluß nahe, daß auch die DNA von den eingesetzten Substanzen beeinflusst werden könnte. Die Vorhersage von einer möglichen Z-DNA Konformation im Substrat wird damit gestützt (siehe dazu auch 5.4)

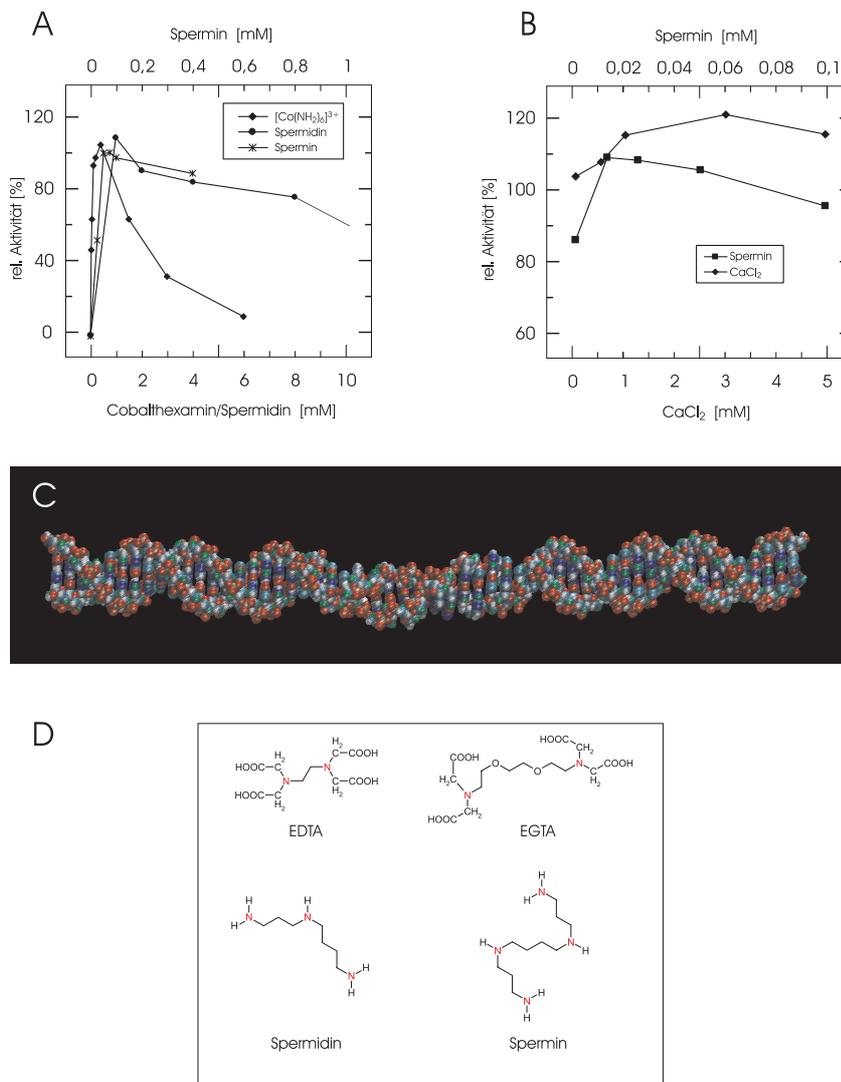


Abb. 18 Einfluß von Aminen auf die telomere resolution

Das Substratplasmid pJD105 wurde wie in 3.5.1 beschrieben mit TelN inkubiert; mit folgenden Abweichungen: A stellt den Effekt von Aminen (ohne CaCl₂) dar. B zeigt den Einfluß von Spermin [■] bei konstanter CaCl₂ Konzentration (1 mM) sowie den Effekt von CaCl₂ [◆] bei konstanter Sperminkonzentration (0,025 mM). Die Aktivität des Enzyms wurde bei der Zugabe von 2 mM CaCl₂ als 100% gesetzt, die Enzymmenge war so gewählt, daß die nicht-stimulierte Reaktion kein Reaktionsprodukt ergab (0% Aktivität). Teil C zeigt die mögliche Z-DNA Konformation der R/Y Basenabfolge in *telO* im Molekülmodell von *telRL*. Das Modell wurde mit Hilfe des Programs NAMOT (<http://namot.lanl.gov/>) erstellt. Teil D zeigt die Strukturen der in Teil A und in Abb. 17, C verwendeten organischen Polyamine. Die Stickstoffatome sind rot hervorgehoben.

4.5 TelN hat die Fähigkeit, DNA zu binden

4.5.1 Das aktive Zentrum TelNs liegt innerhalb der Aminosäuren 402-431

Ein Sequenzvergleich mit verwandten Proteinen (Esposito & Scocca, 1997) ergab, daß das in Tyrosinintegrasen vorhandene Motiv: hxxxLGHxxxxTxxxYxH, auch in TelN vorkommt. Das h steht für hydrophobe Reste, Großbuchstaben bezeichnen konservierte Aminosäuren. Dieses auch als Box C bezeichnete Motiv enthält in Tyrosinintegrasen das katalytische Tyrosin und bildet damit das aktive Zentrum dieser Proteinklasse. In TelN könnte diese Position Y424 sein. Der Sequenzvergleich zeigte noch zwei weitere konservierte Motive in Tyrosinintegrasen/rekombinasen: Box A (hxxhxxTGhRxkExxxL; k steht für kleine Seitenketten) und Box B (HxLRHxxAxxLxxxxxG). Ein möglicher bakterieller *zipper* (AS 180-201) wurde bereits früher postuliert (Rybchin & Svarchevsky, 1999). Um die *telomere resolution* in einzelne Schritte zu zerlegen, wurden Aminosäureaustausche im postulierten aktiven Zentrum von TelN vorgenommen. Die bereits bekannten Motive in TelN, sowie die vorgenommenen Austausche sind in Abb. 19 dargestellt.

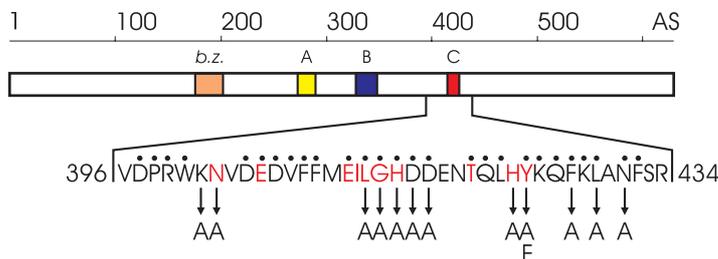


Abb. 19 Alaninscan an TelN

Der Balken entspricht der Gesamtlänge von TelN (630 Aminosäurereste). Die Boxen A, B und C sind gelb, blau und rot markiert. Der potentielle bakterielle *zipper* ist orange markiert. Die Aminosäuren 396-434 sind

herausgehoben. Punkte über den Aminosäureresten markieren mit PY54 TelN identische Aminosäurereste. Rote Buchstaben bezeichnen das konservierte Motiv von Box C. Die Positionen der vorgenommenen Aminosäureaustausche sind mit einem Pfeil und A markiert.

Der Alaninscan zeigte, daß der Austausch des Tyrosins an Position 424 durch Alanin oder Phenylalanin zu einem Protein ohne *cleavage-joining* Aktivität führt (Tab. 9). Auch die in der Nähe liegenden Aminosäuren H423, F427, L429, N431 und L413 waren für das Protein essentiell. Sie müssen entweder für die Transesterifikation essentiell sein, oder zur Tertiärstruktur des Proteins beitragen. Nur Aminosäureaustausche, die nicht die Struktur des Proteins verändern, können dabei eine Aussage über das aktive Zentrum des Enzyms liefern. TelN Y424F verursacht vermutlich keine Änderung der Tertiärstruktur, da hier nur die funktionelle, aromatische OH-Gruppe fehlt.

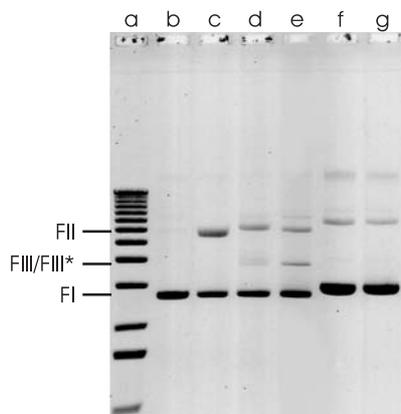


Abb. 20 Reaktion von pJD105 mit H415A

Die Abbildung des 0,7 % igen Agarosegels zeigt den Ansatz des Plasmids pJD105 nach Inkubation mit TelN H415A wie in 3.5.1. Spur a: DNA Größenstandard (1 kb-Leiter); b: pJD105; c: pJD105 + DNaseI (0,0001 U, siehe 3.5.3); d: pJD105 + TelN H415A; e: pJD105 + TelN H415A + ProK; f: pBR329; g: pBR329 + TelN H415A. Die verschiedenen Formen (FI, FII und FIII, bzw FIII*) sind neben den Banden zugeordnet.

Tab. 9 Funktionalität der im Alanin-scan erzeugten TelN-Punktmutanten

Mutation	<i>in vitro</i> ^a	spez. DNA-Bindung ^a
Wildtyp	++	++
K401A	++	n. b.
G414A	+	n. b.
D416A	++	n. b.
D417A	+	n. b.
Y424F	-	++
Y424A	-	n. b.
L413A	-	n. b.
H423A	-	n. b.
F427A	-	n. b.
L429A	-	n. b.
N431A	-	n. b.
H415A	+,v	+

^a Die katalytische Aktivität wurde (außer bei TelN wt, TelN Y424F und TelN H415A) mit einem Rohextrakt des entsprechenden Proteins analysiert. Für weitergehende Aussagen wäre eine quantitative Untersuchung und damit eine Reinigung des entsprechenden Proteins erforderlich. ++ katalytische Aktivität / DNA-Bindungsverhalten wie bei TelN wt. + katalytische Aktivität / DNA-Bindungsverhalten eingeschränkt gegenüber TelN wt. - keine katalytische Aktivität. v: veränderte *cleaving-joining* Aktivität; n. b.: nicht bestimmt.

Die Aminosäureaustausche K401A, G414A, D416A und D417A blieben ohne größeren Einfluß auf die Aktivität des Enzyms. Der Austausch H415A führt jedoch zu einem Protein, das möglicherweise die Bildung von *open circle* Form DNA (FII) bei der *telomere resolution* begünstigt, d. h. die Reaktion bleibt auf einer frühen Intermediatsstufe stehen (Abb. 20). Die Analyse dieses Reaktionsprodukts kann möglicherweise Aufschluß über den Mechanismus der *telomere resolution* geben. Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen sind in Tab. 9 zusammengefaßt. Die Vorhersage, daß das aktive Tyrosin im Box C Motiv von TelN zu finden ist wird durch die Ergebnisse gestützt. Es bedarf jedoch der Analyse eines kovalenten DNA-TelN-Intermediats um den Beweis für diese Hypothese liefern zu können. Von allen hergestellten TelN Mutanten war TelN Y424F die wichtigste in den hier präsentierten Untersuchungen, da das Enzym die Fähigkeit DNA zu binden behielt (*vide infra*).

4.5.2 *Telomere resolution: Entkopplung von Erkennung/Bindung und Transesterifikation*

Ziel der Mutagenese in *telN* und nachfolgend auch im *telRL*-Substrat war das Trennen von DNA-Erkennungs- und Bindungsfähigkeit (die ja einer Reaktion an der DNA zwingend vorausgehen muß) sowie der *cleavage-joining* Aktivität (Abb. 21). Dadurch konnte das DNA-Bindungsverhalten von TelN untersucht werden.

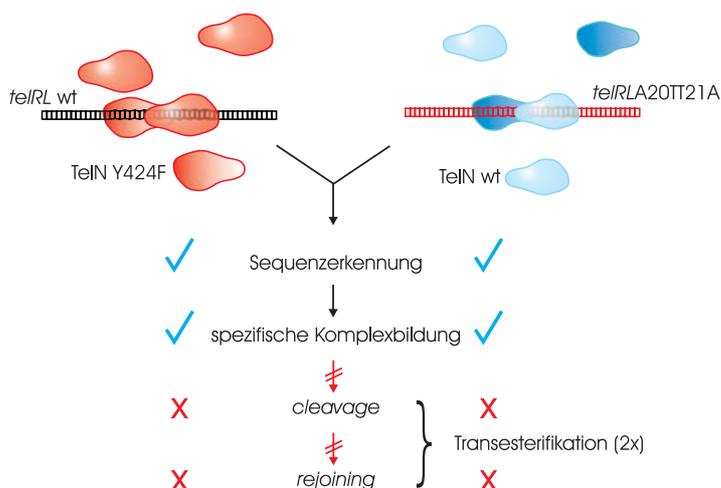


Abb. 21 Entkopplung von Bindung und Transesterifikation der *telomere resolution*

Links die Reaktion mit TelN-Mutantenprotein (rot) und Wildtyp-substrat (blau). Rechts die Reaktion mit Wildtypprotein (blau) und mutiertem Substrat (rot).

Sowohl mit TelN Y424F als auch mit *telRL* A20TT21A konnte in der *telomere resolution* die Erkennung/Bindung von der Transesterifikation entkoppelt werden (Abb. 21). Durch (i) TelN Mutagenese zur Herstellung eines in der *telomere resolution* inerten Protein, daß aber noch DNA-Bindungsfähigkeit besitzt und (ii) durch *telRL* Mutagenese zur

Herstellung eines nicht schneidbaren Substrats, welches von TelN wt aber noch spezifisch gebunden werden kann (Abb. 21).

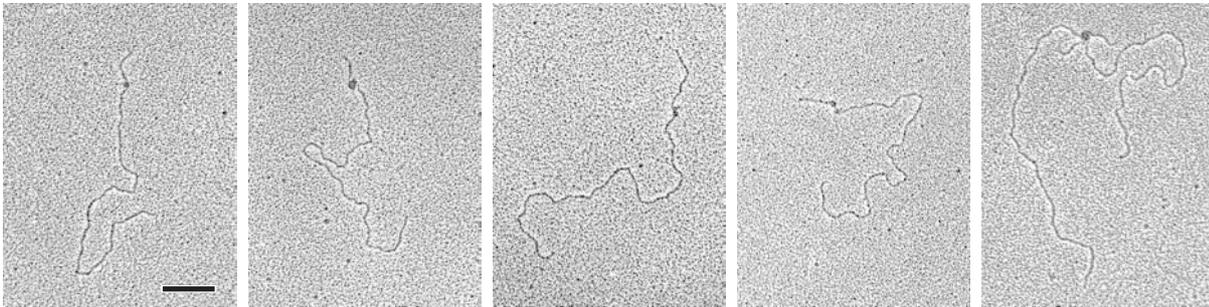


Abb. 22 Elektronenmikroskopie von TelN Y424F-*tos* Komplexen

pJD104 wurde vor der Präparation für die Elektronenmikroskopie (siehe 3.4.2) mit *SphI* linearisiert (siehe 3.1.4). Der Balken entspricht 500 bp.

Die elektronenmikroskopische Analyse zeigt, daß linearisiertes *tos* Plasmid (pJD104) zwar von TelN Y424F gebunden wird (schwarze Punkte, Abb. 22), aber keine *telomere resolution* erfolgen kann. Die DNA behält ihre ursprüngliche Länge, zwei Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen nicht. Ein ähnliches Verhalten zeigt die Substratmutante *telRL* A20TT21A. Auch hier kann TelN wt die DNA noch spezifisch erkennen, es ist jedoch keine Transesterifikation mehr zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, daß die DNA-Bindungsfähigkeit unabhängig ist von der enzymatischen Aktivität der Transesterifikation. Um Einblick in die Domänenstruktur von TelN gewinnen wurden Deletionsmutanten hergestellt.

4.5.3 TelN Deletionsmutanten dienen zur Analyse der Domänenstruktur von TelN

Die Analyse der Domänenstruktur von TelN begann mit einem Sequenzvergleich bekannter TelN-Analoga. Diese Analyse sollte als Grundlage für das weitere Vorgehen dienen. Der Vergleich (Abb. 23) ergibt zunächst die bereits bekannten Motive (Box A, B C; Esposito & Scocca, 1997) für Tyrosinintegrasen/Rekombinasen. Über die bekannten Motive hinaus ist auffällig, daß TelN am C-terminalen Ende (AS 440-630) kaum Homologien zu verwandten Proteinen hat. Gleiches gilt für den N-terminalen Bereich (AS 1-260). Einzige Ausnahme ist das TelN-Analog aus dem Bakteriophagen PY54, welches sehr eng mit TelN aus N15 verwandt ist (die beiden Proteine haben insgesamt ~60 % identischer oder homologer Aminosäuren). Der von mir durchgeführte Alanin-scan (4.5.1) zeigt, daß Box C

Ergebnisse

wahrscheinlich das für die Transesterifikation verantwortliche katalytische Zentrum enthält, jedoch die DNA-Bindung nicht beeinträchtigt (*vide infra*). Es stellt sich daher die Frage, welcher Teil von TelN für die spezifische DNA-Bindung und die Erkennung der *resolution site* verantwortlich ist.

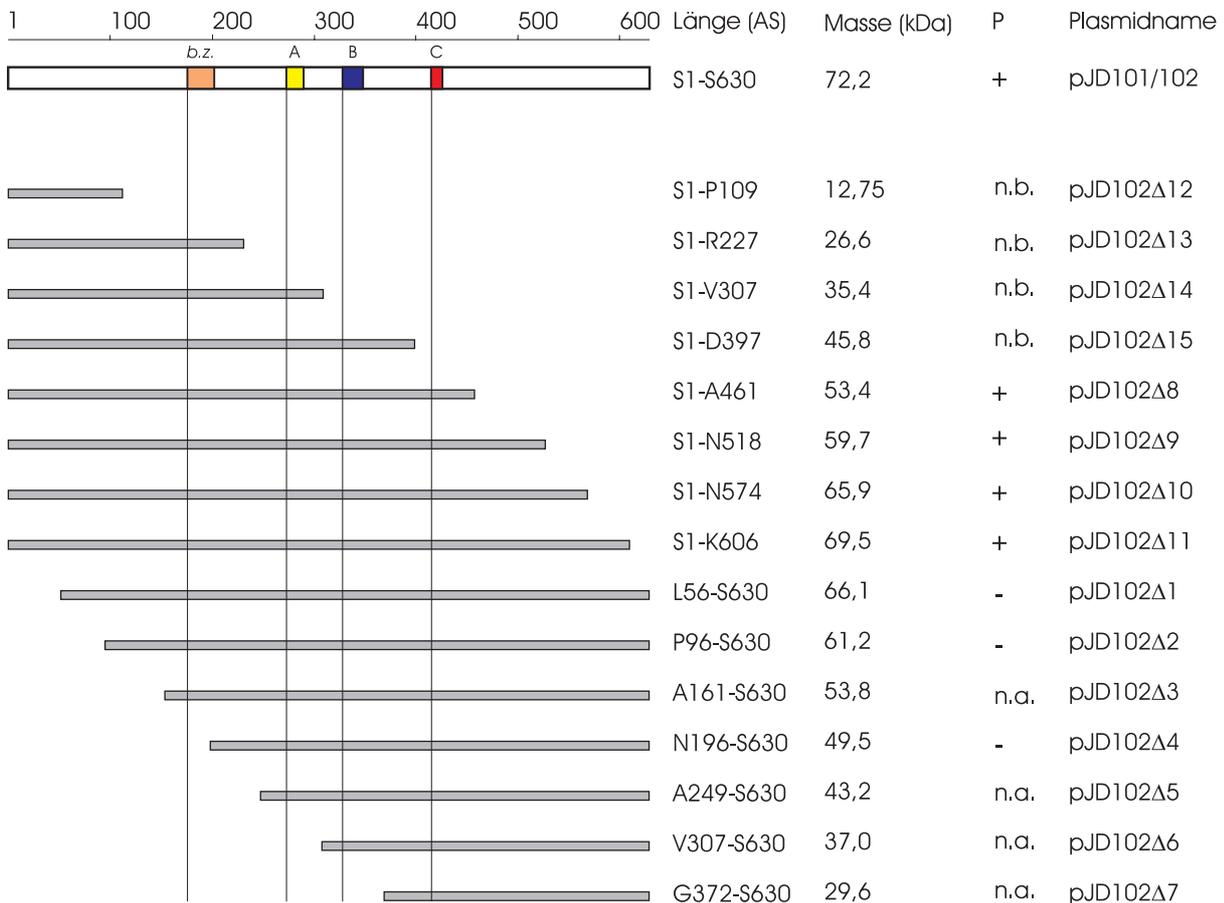


Abb. 24 N- und C-terminale Deletionen am TelN Protein und deren Auswirkung auf die *telomere resolution*

Das Wildtyp-Protein ist schematisch als Balken dargestellt. Der potentielle *bacterial-zipper*, sowie die konservierten Motive Box ‚A‘, ‚B‘ und ‚C‘ sind in orange, gelb, blau und rot. Die grauen Balken stellen den noch verbleibenden Proteinanteil von TelN dar; die Reste sind neben den Balken angegeben. Rechts davon die vorhergesagte molekulare Masse (kDa), daneben die *telomere resolution* Aktivität des verkürzten Proteins (P). Um diese zu bestimmen wurde ein Proteinrohextrakt wie in 3.3.4 beschrieben hergestellt. 2 µl Proteinrohextrakt wurden mit 0,1 pmol pJD105 inkubiert wie in 3.5.1 beschrieben. Nur im Falle von pJD102Δ1 wurde gereinigtes Protein verwendet. Falls lineares DNA-Produkt auftrat wurde in die Spalte P ein + eingetragen. Der Plasmidname ist in der Spalte ganz rechts aufgeführt. n. b. = nicht bestimmt. n. a. = nicht anwendbar (Protein ist nur in Zwittergent löslich, welches die TelN-DNA Bindungsfähigkeit inhibiert).

Zur Herstellung von Deletionsmutanten wurde per PCR der gewünschte Bereich von *telN* amplifiziert und danach als *NdeI/HindIII* Fragment in pMS470 Δ 8 eingesetzt (3.1.5.1). Die resultierenden pJD102-Derivate und deren Verhalten bei der *telomere resolution* sind in Abb. 24 zusammengefaßt. Die N-terminalen Deletionen pJD102 Δ 1 bis pJD102 Δ 4 zeigen ein anomales Verhalten bei der *telomere resolution*. Während bei pJD102 Δ 1 und pJD102 Δ 2 im Rohextrakt noch eine veränderte enzymatische Aktivität nachweisbar war (es tritt eine sequenzspezifische Topoisomeraseaktivität auf, Daten nicht gezeigt), ist diese im gereinigten Protein nicht mehr vorhanden. Das bedeutet, daß wahrscheinlich noch ein Kofaktor die Aktivität des Mutanten-Proteins stimuliert.

Verkürzungen von *telN* führten zu unter physiologischen Bedingungen (3.3.4) schwerlöslichen Proteinen (pJD102 Δ 3, pJD102 Δ 5 bis pJD102 Δ 7). C-terminale Verkürzungen von *telN* (pJD102 Δ 8 bis pJD102 Δ 11), deren Verhalten in der *telomere resolution* deswegen nicht untersucht werden konnte, hingegen führten zu voll funktionsfähigen Enzymen, solange das Box C Motiv erhalten blieb. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß das C-terminale Ende von TelN für die *in vitro* Reaktion nicht von Bedeutung ist.

Alle beobachteten Fähigkeiten und die Transesterasefunktion des Proteins müssen daher im N-terminalen Bereich des Proteins (AS 1-430) lokalisiert sein. Die Rolle des C-terminalen Bereichs von TelN ist unklar, möglicherweise ist er aber an Interaktionen mit anderen Replikationsproteinen beteiligt, da dieser Bereich *in vivo* essentiell ist (pers. Mitteilung von N. Ravin).

4.5.4 In *tos* wird *telRL* spezifisch von TelN erkannt und gebunden

Die Entkopplung der *telomere resolution* in einzelne Teilschritte ist möglich durch die Nutzung von TelN Y424F zur Untersuchung der Bindungseigenschaften des Proteins. *TelRL* A20TT21A diente zum Vergleich der DNA-Bindungseigenschaften von TelN wt mit den TelN-Mutanten. Die benutzten Methoden waren elektronenmikroskopische Analysen der DNA-Komplexe und Fragmentretentionsexperimente.

Um die TelN-Bindungsstellen auf seinem Substrat eingrenzen zu können, wurden die Substrate *tos*, *telRL* und *telO* linearisiert, mit TelN inkubiert und die erzeugten TelN-DNA Komplexe im Elektronenmikroskop analysiert (Abb. 22). Die DNA-Längen (in bp) zwischen gebundenem TelN-Protein und jedem Ende der DNA wurde gemessen (Abb. 25). Um die Bindungsstelle von TelN auf jedem DNA-Substrat eindeutig bestimmen zu können, war es

nötig jedes Substrat mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen zu linearisieren. Die Histogramme zeigen, daß TelN *tos* und *telRL* spezifisch als Substrat erkennt. Die meisten Moleküle weisen ein TelN Protein in der Mitte von *tos* auf. Daraus folgt, daß die TelN-Bindungsstelle innerhalb von *tos* liegen muß. Diese Bindungsstelle muß *telRL* sein, da der beobachtete Peak symmetrisch ist, in der Mitte von *tos* liegt und *telRL* von TelN spezifisch als Substrat erkannt wird, *telO* aber nicht. Die TelN Moleküle waren in diesem Falle zufällig über die gesamte Länge der Plasmid-DNA verteilt. Daraus folgt, daß die innere inverse Repetition (R3/L3) von *telRL* essentiell für das spezifische Binden von TelN an sein Substrat sein muß. Die *repeats* R1/L1 und R2/L2 scheinen nur von untergeordneter Bedeutung für spezifische DNA-Bindung zu sein. Um bessere Aussagen über die Bindungsaffinität von TelN zu den verschiedenen Substraten machen zu können, sind jedoch Fragmentretentionsexperimente erforderlich.

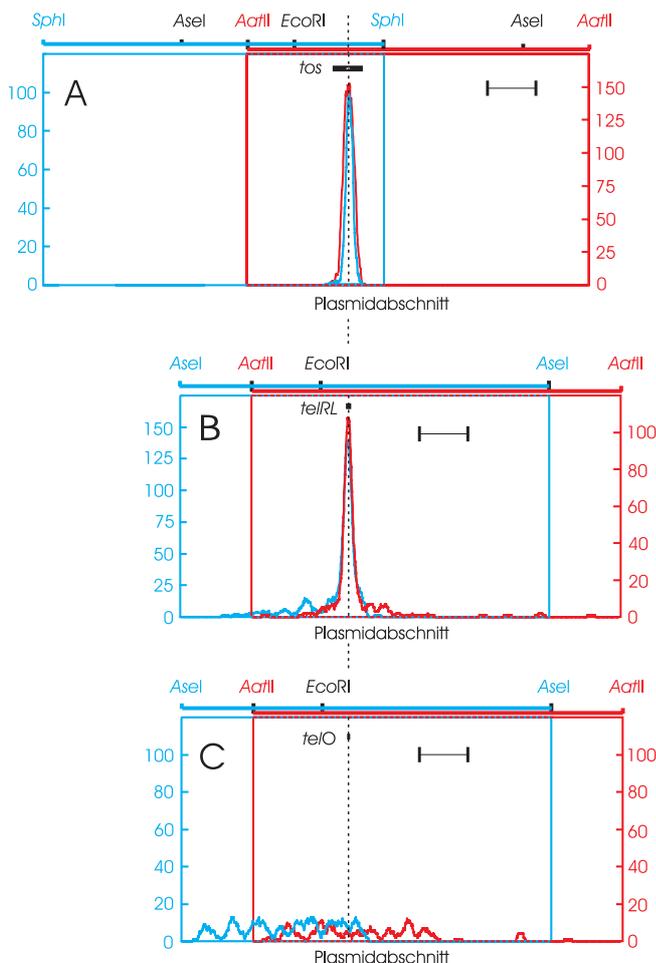


Abb. 25 TelN bindet in *tos* an *telRL*

Die Histogramme zeigen die statistisch häufigste Bindungsposition von TelN Y424F auf den linearisierten Substratplasmiden pJD104 (A, enthält *tos*), pJD105 (B, *telRL*) und pJD106 (C, *telO*). Die TelN-DNA Komplexe wurden wie in 3.4.2 beschrieben für die Elektronenmikroskopie präpariert, photographiert und vermessen. In zwei Ansätzen wurde die DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen linearisiert (3.1.4) und danach getrennt mit TelN inkubiert und analysiert. Gleiche Bereiche der beiden resultierenden Histogramme (blau und rot) wurden überlappend übereinandergelegt. Die Abszisse des Histogramms stellt die Plasmidlänge dar. Die Ordinate zeigt die Anzahl der gebundenen TelN-Moleküle an 1000 äquidistanten Stellen auf dem Plasmid, jeweils integriert über einen Bereich von 80 bp. Für pJD104 (A, *tos*, 4374 bp) wurden die Restriktionsenzyme *Sph*I (Histogramm in blau, 114 DNA Moleküle wurden vermessen) und *Aat*II (rot, 178 Moleküle) benutzt. pJD105 (B, *telRL*, 3867 bp) wurde mit *Ase*I (297 Moleküle) und *Aat*II (198 Moleküle) linearisiert; pJD106 (C, *telO*, 3831 bp) mit *Ase*I (164) und *Aat*II (111 Moleküle). Der Balken entspricht 500 bp. Die gestrichelte Linie markiert das Symmetriezentrum der Bindungsstelle.

114 DNA Moleküle wurden vermessen) und *Aat*II (rot, 178 Moleküle) benutzt. pJD105 (B, *telRL*, 3867 bp) wurde mit *Ase*I (297 Moleküle) und *Aat*II (198 Moleküle) linearisiert; pJD106 (C, *telO*, 3831 bp) mit *Ase*I (164) und *Aat*II (111 Moleküle). Der Balken entspricht 500 bp. Die gestrichelte Linie markiert das Symmetriezentrum der Bindungsstelle.

4.5.5 TelN hat sequenzspezifische- und nicht-sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität von TelN an verschiedene DNA-Sequenzen wurden Fragmentretentionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die *telomere resolution site* (*tos*), bzw. Teile davon (*telRL* und *telO*), sowie DNA ohne *resolution site* untersucht (Abb. 26, A). Um Aussagen über den Unterschied zwischen TelN wt und TelN Y424F bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit gegenüber dem nicht-prozessierbaren Mutanten-Substrat *telRL A20TT21A* machen zu können, wurde auch dieses in die Experimente einbezogen. Durch die Quantifizierung der Menge ungebundenen DNA-Substrats gegenüber der Menge eingesetzten Proteins konnten Bindungsaffinitätskurven für die eingesetzten DNA-Sequenzen bestimmt werden, da diese in der Elektrophorese stabile Komplexe mit TelN bilden. Die Kurven dienen zur Ermittlung von scheinbaren Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten ($K_{d(app)}$).

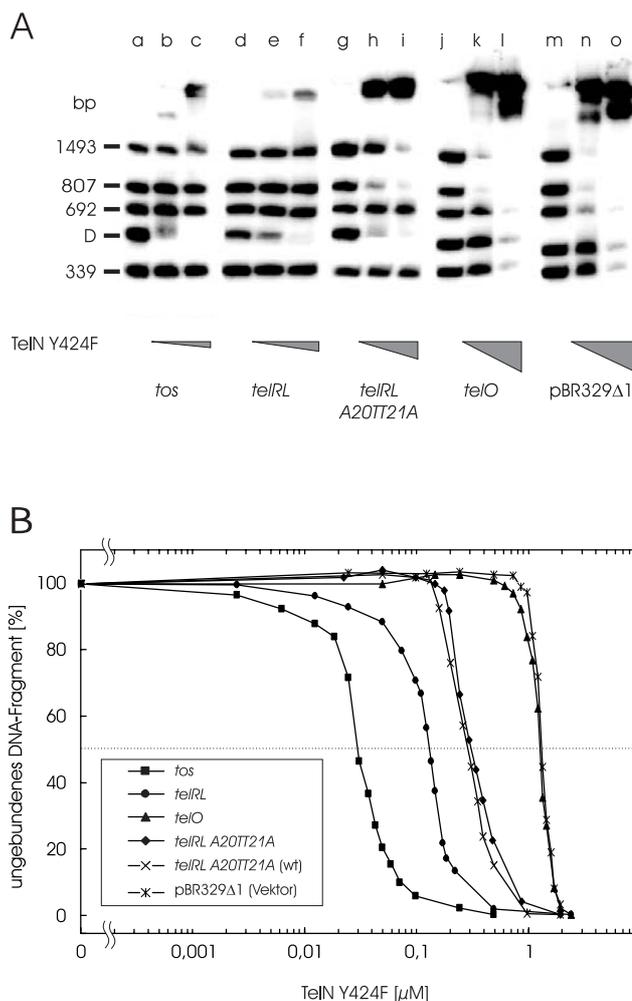


Abb. 26 Bindungskonstanten definierter TelN-Substrat Komplexe

Teil A zeigt repräsentative Autoradiogramme der Fragment-Retentionsanalyse auf nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen. TelN Y424F wurde mit verschiedenen DNA-Substraten inkubiert wie in 3.5.2 beschrieben. Fragment D enthält die TelN Bindungsstelle. Spuren a-c enthalten aus pJD104 gewonnene Fragmente (Fragment D, *tos*, 510 bp) die mit verschiedenen Mengen Protein (a: 0; b: 0,05; c: 0,15 μ M) inkubiert wurden. Spuren d-f: pJD105 (Fragment D, *telRL*, 517 bp) mit d: 0; e: 0,1; f: 0,2 μ M TelN. Spuren g-i: pJD105 A20TT21A (Fragment D, *telRL A20TT21A*, 517 bp) mit g: 0; h: 0,4; i: 0,6 μ M TelN. Spuren j-l: pJD106 (Fragment D, *telO*, 461 bp) mit j: 0; k: 0,9; l: 1,8 μ M TelN. Spuren m-q: pBR329Δ1 (Fragment D, keine N15 DNA, 461 bp) mit m: 0; n: 1; o: 1,8 μ M TelN. Teil B zeigt die aus der Quantifizierung von Fragment D (siehe Teil A und 3.2.1.2) resultierenden Gleichgewicht-

Bindungskurven. Für jeden Datenpunkt wurden die Meßwerte aus mindestens zwei Experimenten gemittelt. Die aus den Kurven ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten ($K_{d(app)}$) sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Die Bindungsaffinitätskurven sind in Abb. 26, B gezeigt, die daraus abgelesenen $K_{d(\text{app})}$ -Werte sind in Tab. 10 zusammengestellt. Auch dieses Experiment beweist, daß *tos* und *telRL* von TelN spezifisch erkannt werden, wie in den repräsentativen Autoradiogrammen (Abb. 26 A, Spuren a-f) zu sehen ist. Fragment D, welches die *resolution site* enthält, wird zuerst komplexiert und der Komplex zum oberen Ende des Gels verschoben. Eine nicht-spezifische DNA-Bindung kann hier ausgeschlossen werden, da Fragment D kleiner ist, als die größeren DNA-Fragmente ohne Sequenzbereiche aus der *telomere resolution site*, die im Falle einer nicht-sequenzspezifischen Bindung zuerst von TelN gebunden werden müßten. Weder für *telO*, noch für Vektor-DNA kann eine sequenzspezifische DNA-Bindung beobachtet werden (Abb. 26 B, Spuren j-o). Folglich sind auch die abgelesenen $K_{d(\text{app})}$ -Werte für *telO* und Vektor-DNA identisch (1300 nM, siehe Abb. 26 B und Tab. 10). Die

Tab. 10 Scheinbare Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von TelN-DNA Komplexen

Substrat	$K_{d(\text{app})}$ [nM] ^a	<i>telomere resolution</i> [%] ^b
<i>tos</i>	28	100
<i>telRL</i>	130	97
<i>telRL</i> A20TT21A	290 ^c	0 ^d
<i>telRL</i> A20TT21A	310	n.a.
<i>telO</i>	1300	1
pBR329Δ1	1300	0

^a Für die Bestimmung von $K_{d(\text{app})}$ wurde TelN Y424F benutzt. ^b Relative Prozessierbarkeit im Verhältnis zu TelN (wt) mit *tos*. ^c TelN (wt). ^d Die Menge eingesetzten TelNs war 100-mal größer als bei *tos* oder *telRL*. n.a., nicht analysiert.

stabilsten TelN-DNA Komplexe wurden mit *tos* als Substrat beobachtet. Der $K_{d(\text{app})}$ Wert ist für diese Komplexe 28 nM. Die Komplexe mit *telRL*-DNA haben einen $K_{d(\text{app})}$ -Wert von 130 nM und sind damit nur 1/5 so stabil wie *tos*-DNA Komplexe. Der $K_{d(\text{app})}$ -Wert für *telRL* A20TT21A – TelN Y424F Komplexe liegt mit 310 nM mehr als doppelt so hoch wie der für das Wildtyp *telRL*-Substrat. Der Wert unterscheidet sich nur geringfügig für den für *telRL* A20TT21A – TelN wt Komplex bestimmten ($K_{d(\text{app})} = 290$ nM). Der Unterschied zu *telRL* wt ist vermutlich auf die Mutation A20TT21A zurückzuführen. Aus diesen Daten ist zu schließen, daß die *repeats* R1/L1 und R2/L2 einen wichtigen Beitrag zur stabilen spezifischen

DNA-Bindung von *tos* leisten. Gleichzeitig wird die Beobachtung aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen (4.5.4) bestätigt, daß nur der innere *repeat* R3/L3 essentiell für die spezifische DNA-Bindung von TelN ist. Es wird aber auch klar, daß die *repeats* zwar für die spezifische Bindung des Proteins essentiell sind, aber *telO* essentiell für die vorher stattfindende Erkennung des Substrats sein muß. Anderenfalls könnte die Substratmutation A20TT21 keinen Einfluß auf die Bindung haben. Außerdem konnte gezeigt werden, das TelN Y424F sich nur unwesentlich von TelN wt in seinem DNA-Bindungsverhalten unterscheidet.

Dieses Ergebnis stützt die Annahme, daß der Austausch Y zu F in TelN Y424F nur einen kleinen oder keinen Einfluß auf die Tertiärstruktur des Proteins hat. Außerdem wird durch den *Alaninscan* offensichtlich, daß das katalytische Zentrum von TelN unwesentlich zur sequenzspezifischen und nicht-sequenzspezifischen DNA-Bindung beiträgt. Nachdem klar war, daß TelN seine *resolution site* spezifisch bindet, stellte sich die Frage, ob ein oder mehrere TelN-Moleküle an ein *telRL*-Substratmolekül binden.

4.5.6 Zwei TelN Moleküle binden spezifisch an eine *telRL*-Sequenz

Surface-Plasmon-Resonance (SPR) wurde zur Aufklärung der Stöchiometrie der *telomere resolution* benutzt, außerdem bot diese Methode auch eine weitere Möglichkeit, die Quartärstruktur des Enzyms zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst TelN an einen für Protein-Protein Wechselwirkungen bestimmten B1-Chip gebunden. Nach Waschen mit 1 M NaCl, um eventuell vorhandene Oligomerkomplexe zu dissoziieren, wurde TelN-Proteinlösung über das auf dem Chip gebundene Protein gepumpt. Es konnte nur ein geringfügiger Anstieg der auf dem Chip gebundenen Masse beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies untermauert den Befund aus 4.1, daß TelN in Lösung als Monomer vorliegt.

Zur Analyse der TelN:*telRL* Stöchiometrie wurden Oligonukleotide mit der *telRL*-DNA-Sequenz und 20 bp flankierender N15-DNA auf jeder Seite (Gesamtlänge: 97 bp) hybridisiert und auf einem SA-Chip kovalent gebunden. Eine zufällig generierte DNA-Sequenz gleicher Länge diente als Referenz in einer anderen Flußzelle. Die Sequenz der benutzten Oligonukleotide ist in Tab. 3 angegeben. Die Messungen ergaben eine maximale Massenzunahme von 450 RU (ohne Kompetitor, Abb. 27, A). Dies entspricht einem stöchiometrischen Verhältnis von 1,64 TelN Molekülen pro *telRL* Molekül. Das Verhältnis sank auf 1,48 pro *telRL*, bei der Zugabe von Kompetitor (Abb. 27, B).

Die SPR tendiert bei der Stöchiometriebestimmung im Falle von TelN zu einem zu kleinen Verhältnis von Substrat (Protein) zu Ligand (DNA). Zwar sollte theoretisch ein kleiner Längenunterschied der Referenz-DNA gegenüber dem *telRL*-Substrat keine Rolle spielen (BIAcore Handbook, 1994, Seite 5-1), praktisch ist dieser Effekt aber zu beobachten. Benutzt man ein Referenzsubstrat, welches nur 74 bp lang ist, also 22 bp kürzer ist als das *telRL*-Substrat, so erhält man ein stöchiometrisches Verhältnis von 2,18 TelN Molekülen pro *telRL*-Molekül (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, daß mehr als ein TelN Molekül, also wahrscheinlich zwei TelN Moleküle an jeweils ein Substratmolekül spezifisch binden müssen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Notwendigkeit von zwei TelN-Molekülen bei zwei gleichzeitig ablaufenden Transesterifikationen und nur einem bekannten katalytischen Tyrosin pro Molekül. Mögliche Gründe für diese Beobachtung werden in 5.1 diskutiert.

Der von TelN geschützte *telRL*-Bereich wurde durch die Untersuchung der stabilen TelN-DNA Komplexe eingegrenzt.

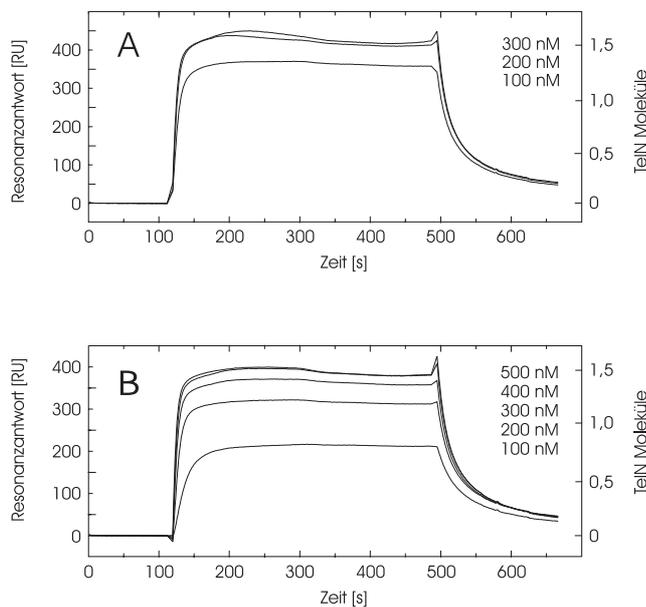


Abb. 27 Surface plasmon resonance Analyse der TelN-DNA Bindung

TelN Y424F wurde wie in 3.5.4 beschrieben für die Experimente benutzt. Die immobilisierte DNA wurde aus den in Tab. 3 mit *Plasmon Resonance* bezeichneten Oligonukleotiden hergestellt. Die Sensogramme zeigen die Massendifferenz an in beiden Flußzellen gebundenem Protein in RU im zeitlichen Verlauf des Experiments. Die in den Experimenten eingesetzte Proteinkonzentration ist rechts der resultierenden Kurve angegeben. Teil A der Abbildung zeigt Experimente, die ohne Zugabe von Kompetitor-DNA durchgeführt wurden, B zeigt Experimente in denen 1 ng/µl Kalbsthymus DNA als Kompetitor zugesetzt wurde.

4.5.7 TelN schützt ~ 50 bp von *telRL* vor Angriff durch DNaseI

Der von TelN auf *telRL* bedeckte DNA-Abschnitt wurde durch DNaseI *footprint* Experimente vermessen. Dazu wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Fragment, welches *telRL* enthielt, mit DNaseI teilweise verdaut und anschließend auf einem DNA-Sequenzgel analysiert (Abb. 28, A). Da das mutierte Substrat *telRL* A20TT21A ein verändertes Bindungsverhalten zeigt, wurde es ebenfalls in einem *footprint* Experiment eingesetzt, um herauszufinden, ob das

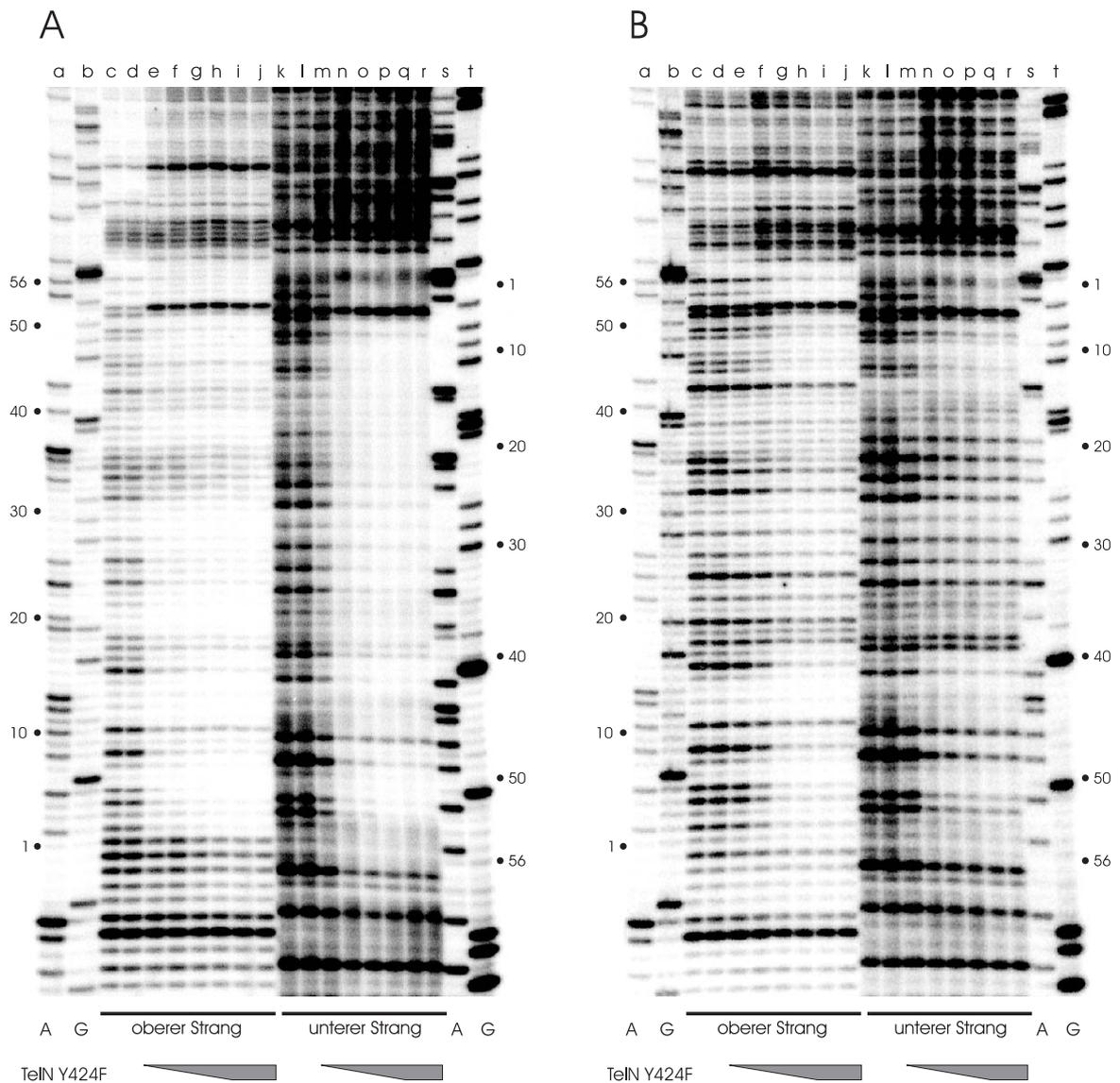


Abb. 28 DNaseI footprint Analyse von TelN Y424F-*telRL*-, und -*telRL* A20TT21A-Komplexen

Für das Experiment wurde ein 159 bp PCR-*telRL*-Fragment verwendet (*template*: pJD105; *primer*: siehe Tab. 3). Die Versuchsbedingungen sind in 3.5.3 beschrieben. Das Autoradiogramm des Sequenzgels in Teil A zeigt den oberen (Spuren c-j) und den unteren Strang (Spuren k-r) des PCR-Fragments. Die Ansätze enthielten die folgenden Konzentrationen TelN Y424F: c, d, k und l: 0 μ M; e und m: 0,5 μ M; f und n: 1,5 μ M; g und o: 2,5 μ M; h und p: 3,5 μ M; i, j ,q und r: 5 μ M. Die Spuren a und b enthalten die dideoxy-*cycle-sequencing* Reaktion mit ddA und ddG für den oberen Strang. Spuren s und t enthalten die gleiche Reaktion für den unteren Strang. Die Zahlen rechts und links der Spuren markieren die Nukleotid-Position von *telRL*. Die Abbildung in Teil B zeigt das gleiche Experiment wie in Teil A beschrieben, außer daß für die Reaktionen pJD105 A20TT21A als *template* benutzt wurde.

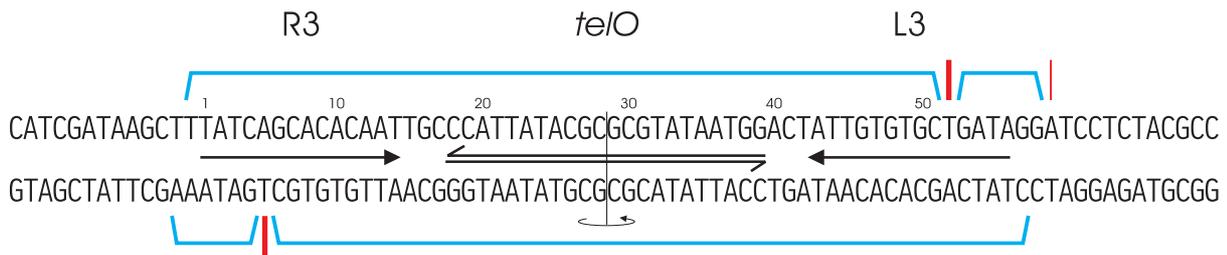


Abb. 29 Schematische Darstellung der in TelN-*telRL* Komplexen gegen DNaseI geschützten Bereiche

Die Sequenz der zentralen Region des *footprinting*-PCR-Fragments (159-bp, pJD105 Basenpaare 212–370) ist dargestellt. Basenpaar-Positionen in *telRL* sind durch Zahlen über den Buchstaben markiert. Die blaue Klammer bezeichnet vor DNaseI Angriff geschützte Bereiche. Rote, senkrechte Balken markieren hypersensitive Nukleotidpositionen. Die gestrichelte, senkrechte Linie zeigt das Symmetriezentrum von *telRL*.

veränderte Bindungsverhalten auch einen -gegenüber dem Wildtypsubstrat- veränderten TelN-Bedeckungsbereich haben würde (Abb. 28, B). Die Autoradiogramme zeigen, daß TelN einen großen Bereich von *telRL* vollständig abdeckt. Ein ~ 50 bp großer Sequenzbereich ist dem Angriff durch DNaseI unzugänglich. Das Protektionsmuster zeigt eine hypersensitive Bande in jedem Strang sowie einen Bereich alternierend schwächer und stärker geschützter Banden im oberen Strang. Dieses alternierende Muster ist im unteren Strang des Wildtypsubstrats nur schwach ausgeprägt. Werden die Protektionsmuster über die Sequenz von *telRL* eingezeichnet, dann zeigt sich ein spiegelsymmetrisches Muster von hypersensitiven Banden, die den geschützten Bereich in jeweils 52 bp und 6 bp große Bereiche aufteilen (Abb. 29). Das Muster des *footprints* von *telRL* A20TT21A zeigt nur geringe Unterschiede zu dem von *telRL* wt. Lediglich das alternierende Muster von schwächer und stärker geschützten Banden ist hier in beiden Strängen etwas stärker ausgeprägt. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, daß zwei TelN-Proteine auf *telRL* spezifisch binden können. Um zu verstehen, in welchem Bereich von *telRL* Erkennung, Bindung und Transesterifikation stattfindet, wurden weitere *telRL*-Substratmutanten hergestellt.

4.6 *TelRL*-Substratmutanten gaben Aufschluß über funktionelle Bereiche in *telRL*

4.6.1 TelNs sequenzspezifische Affinität zu *telRL* wird von R3 / L3 vermittelt

In den in 4.5.5 gezeigten Bindungsstudien konnte eine Reduktion der Bindungsaffinität von TelN zu seinem Substrat beobachtet werden, wenn von *tos* ($K_{d(\text{app})} = 28 \text{ nM}$, Tab. 10) die *repeats* R1/L1 und R2/L2 entfernt wurden ($K_{d(\text{app})}$ von *telRL* = 130 nM). Eine weitere

schrittweise Verkürzung der 56-bp *telRL*-Sequenz (Abb. 30) führte zu einer Verringerung der Bindungsaffinität des Substrats zu TelN. Bei einer Substratlänge von 36 bp konnte kein Unterschied zu nicht-sequenzspezifischer DNA-Affinität mehr beobachtet werden (Abb. 30, pJD105 RL10). Auch die Entfernung von einer Hälfte des *repeats* R3/L3 führte zu dem Verlust sequenzspezifischer DNA-Bindung in diesem Substrat (Abb. 30, pJD105Δ8). Dies zeigt, daß die inversen Repetitionen R1/L1, R2/L2 die Affinität von TelN zu seinem Substrat erhöhen und das R3/L3 für die hochaffine sequenzspezifische Bindung der *telomere resolution site* durch TelN essentiell ist. Ein vollständig symmetrisches DNA-Substrat, erzeugt durch Punktmutationen an Position 15, 17, 40 und 42 von *telRL* zeigte keine Veränderung der DNA-Bindungsaffinität und Prozessierungsaktivität von TelN im Vergleich zu *telRL* wt (Abb. 30, pJD105R-sym). Weitere Untersuchungen konzentrierten sich deswegen auf *telO*.

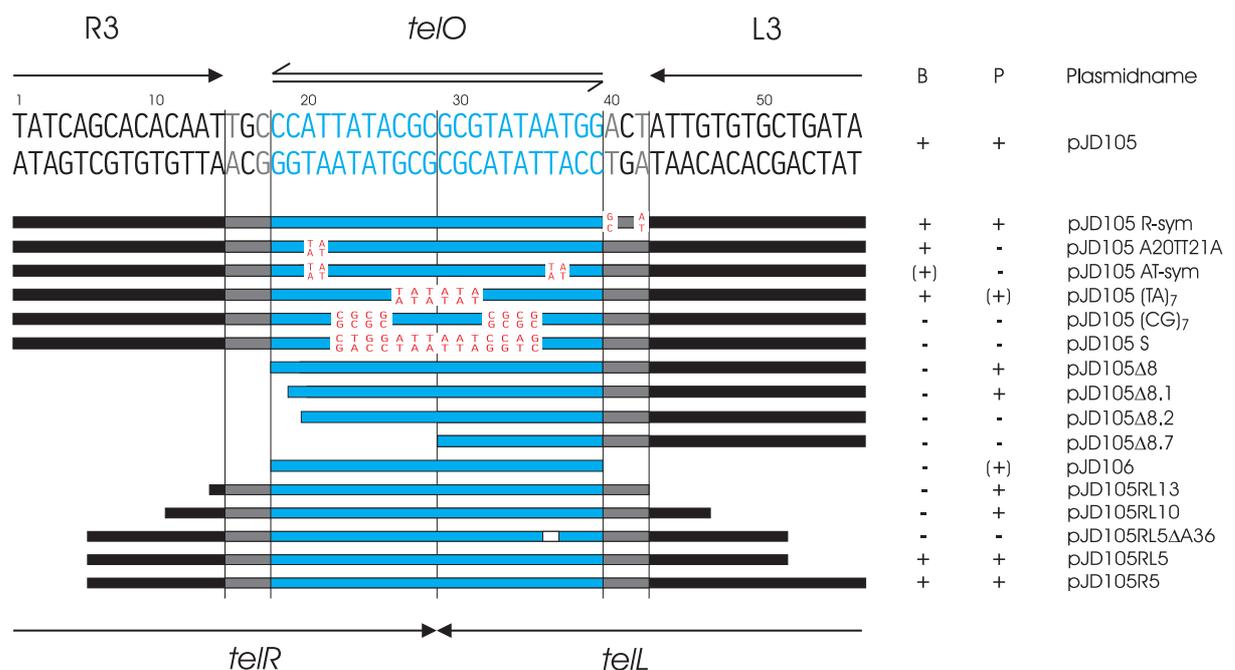


Abb. 30 Mutationen in funktionellen Bereichen des *telRL*-Substrats

Länge und Position der funktionellen Sequenzbereiche von *telRL* sind eingezeichnet. Nukleotide in *telRL*, die die perfekte Palindromstruktur unterbrechen sind in grau, *telO* ist blau dargestellt. Die Skala über der DNA-Sequenz numeriert die Basenpaare von *telRL*. Die Mutantensubstrate sind durch Balken dargestellt, Mutationen mit roten Buchstaben eingezeichnet. Jedes der hergestellten Substrate wurde wie in 3.5.1 beschrieben mit 7700 U TelN inkubiert, um die *telomere resolution* zu überprüfen (Spalte P, mit +/- markiert). Die spezifische Substratbindung wurde mit TelN Y424F gemessen (Spalte B, mit + markiert, + wenn $K_{d(app)} < 600$ nM). (+)-Markierungen stehen für reduzierte *telomere resolution* Aktivität, bzw. schwache sequenzspezifische DNA-Bindung ($K_{d(app)} < 1300$ nM aber > 150 nM) von TelN Y424F.

4.6.2 *telO* ist ein hinreichendes Substrat für die *telomere resolution*, R3/L3 ist für eine effiziente Reaktion notwendig

Es wurden Reaktionskinetiken der *telomere resolution* mit den Substraten pJD104 (*tos*), pJD105 (*telRL*) und pJD106 (*telO*) angefertigt um zu zeigen, daß die Geschwindigkeit der Reaktion direkt mit der sequenzspezifischen DNA-Bindung des Substrats durch TelN zusammenhängt (Abb. 31). Sowohl *tos* als auch *telRL* werden effizient (d.h. mit einer Geschwindigkeit von $> 0,04$ pmol/min bei den standardmäßig (3.5.1) eingesetzten Proteinkonzentrationen) von TelN prozessiert. Beide Substrate werden von TelN spezifisch erkannt, *telO* wird jedoch von TelN wesentlich schwächer als *telRL* gebunden (Abb. 26, B und Tab. 10) und wird unter Standardbedingungen kaum prozessiert. Erst bei einer 20-mal größeren Enzymmenge, als für *telRL* benötigt, wird nach der Standardinkubationszeit ca. 50 % des Substrats umgesetzt. Daraus ergibt sich, daß *telO* zwar die essentiellen Sequenzbereiche für die *telomere resolution in vitro* enthält, die Effizienz der Reaktion aber von der Anwesenheit der inversen Repetitionen R3/L3 abhängt, da diese die hohe sequenzspezifische DNA-Bindungsaffinität vermitteln. Die DNA-Bindung von TelN an *telO* ist zwar sequenzspezifisch, aber die Bindungsaffinität ist ununterscheidbar von der nicht-sequenzspezifischen DNA-Bindungsfähigkeit von TelN. Da die *telomere resolution* aber sequenzspezifisch abläuft, waren weitere Untersuchungen notwendig, um die Frage zu klären, welche Sequenzbereiche in *telO* für die spezifische Erkennung durch TelN verantwortlich sind.

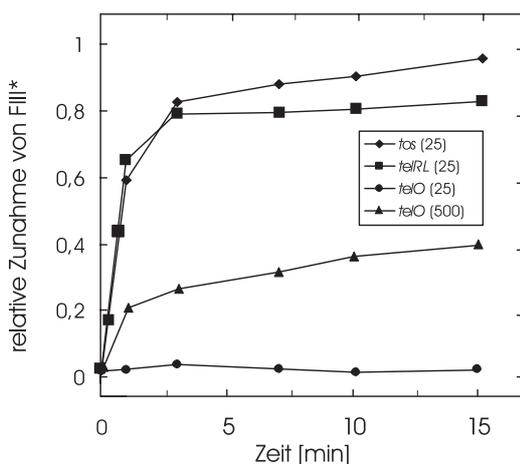


Abb. 31 Kinetik der *telomere resolution* mit verschiedenen Substraten

Es wurden die Plasmide pJD104 (*tos*), pJD105 (*telRL*) und pJD106 (*telO*) verwendet. Experimentelle Bedingungen: siehe 3.5.1. Die eingesetzten Mengen an TelN-Protein (Einheiten) sind hinter dem Substrat angegeben.

4.6.3 *telO* ist essentiell für die Erkennung und Prozessierung durch TelN

Die erste Substratmutation, die zur Klärung der Frage nach Erkennung und Prozessierung herangezogen wurde, war *telRL* A20TT21A (Abb. 30). Dieses Derivat, welches die zweifache

Rotationssymmetrie in *telO* aufhebt, bildet mit TelN weniger stabile Komplexe als die *telRL* Wildtyp-Sequenz (Tab. 10). Dieses Substrat kann nicht mehr von TelN prozessiert werden. Die Wiederherstellung der Symmetrie, durch Einführung von zwei weiteren Punktmutationen in der *telO*-Kernregion (A36T und T37A, siehe Abb. 30, pJD105AT-sym), hatte eine weitere Reduktion der spezifischen Bindungsfähigkeit des Substrats durch TelN zur Folge. Es war daher nicht überraschend, daß auch dieses Substrat nicht von TelN prozessiert werden konnte. Die vollständige *telO*-Kernregion ist aber auf jeder Seite vermutlich 1 bp größer, als durch die Punktmutationen in *telRL* eingegrenzt, da das Derivat pJD105 Δ 8 noch von TelN prozessiert wird, pJD105 Δ 8.1 jedoch nicht.

Ersetzt man den 14-bp Bereich von *telRL*, in dem Z-DNA Konformation vorhergesagt wird (Rybchin & Svarchevsky, 1999), durch eine willkürlich (durch Würfeln) erzeugte Sequenz (Abb. 30, pJD105S; Tab. 3), so ist dieses Substrat inert in Prozessierung und Bindung. Ersetzt man die 14 bp durch (CG)₇ führt das zum selben Ergebnis (Abb. 30, pJD105(CG)₇). Überraschenderweise ergab der Austausch der Originalsequenz durch (TA)₇ ein völlig anderes Resultat (Abb. 30, pJD105(TA)₇). Dieses Substrat wird von TelN mindestens so gut gebunden wie *telRL* Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Jedoch weicht der Ablauf der Prozessierung dieses Substrats vom der Wildtypsituation stark ab (4.7.2).

Die Ergebnisse aus 4.6 bis 4.6.3 zeigen, daß die inversen Repetitionen R1/L1-R3/L3 für die sequenzspezifische DNA-Bindung des Substrats durch TelN verantwortlich sind. Das zentrale 6-bp Segment (CGCGCG) von *telO* ist für eine normale *telomere resolution* essentiell, nicht jedoch für die spezifische DNA-Bindung (Abb. 30, pJD105(TA)₇). Die sechs flankierenden Basenpaare rechts und links des zentralen (CGCGCG) Segments sind für die Erkennung des Substrats essentiell und tragen zur sequenzspezifischen DNA-Bindung bei (Abb. 30, pJD105(CG)₇). Deswegen ist *telO* (i) für die Erkennung des Substrats durch TelN und (ii) die spezifische DNA-Bindung durch das Enzym essentiell. Beide Fähigkeiten werden durch die Sequenz und/oder die Konformation des Kernbereiches (Basenpaare 19-38) von *telO* vermittelt.

Um die Frage zu klären, wo genau in *telO* die Transesterifikation an der DNA stattfindet, wurde eine *next-neighbor*-Analyse an einem synthetisch hergestellten *telRL*-Substrat durchgeführt.

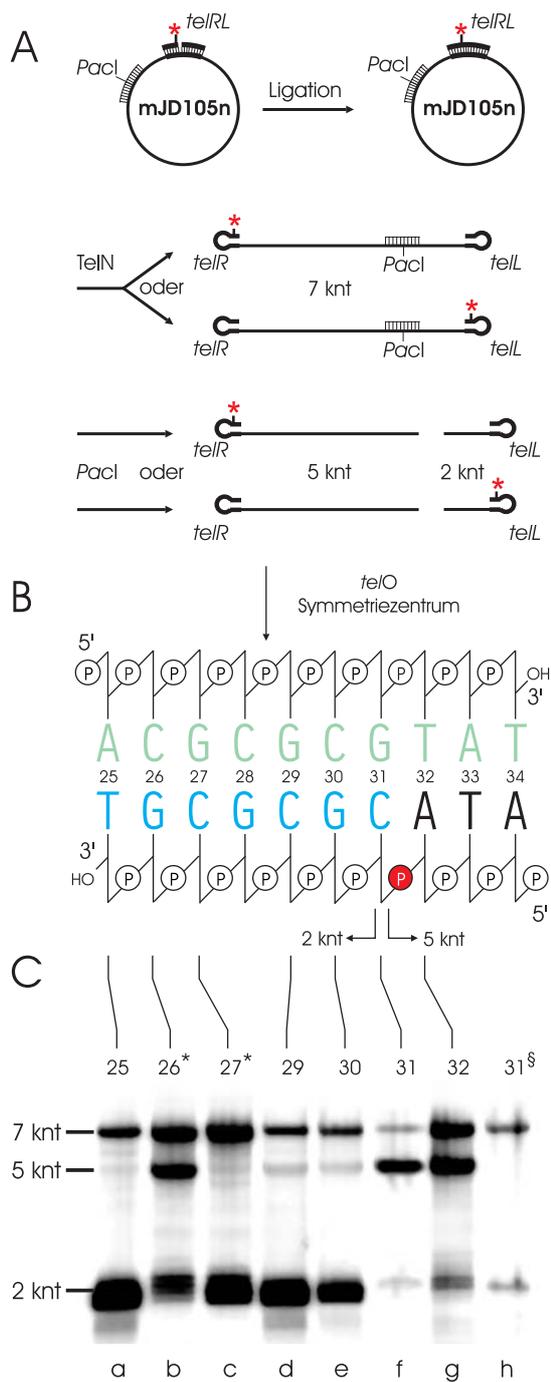


Abb. 32 Next-neighbour Analyse an einem synthetischen *telRL*-Substrat

A: Vereinfachte Darstellung des Versuchsablaufs. Das synthetische Substrat wurde erzeugt indem an einzelstängige, virale DNA, die den oberen Strang von *telRL* enthielt (mJD105n, 7 knt), drei Oligonukleotide angelagert wurden. Zwei davon bildeten den vollständigen unteren Strang von *telRL* (siehe Abb. 33), das dritte bildete den unteren Strang der Restriktionsschnittstelle *PacI*. Von den zwei Oligonukleotiden, die an *telRL* hybridisiert wurden, war eines mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ phosphoryliert (roter Stern in Teil A, blaues Oligonukleotid in Teil C und in Abb. 33), so daß nach der Ligation ein Phosphatrest im unteren Strang von *telRL* radioaktiv markiert war (siehe auch Teil B dieser Abbildung). Das Modell Substrat wurde mit 200 pmol *TelN* inkubiert (siehe 3.5.1) und anschließend mit *PacI* in zwei Fragmente von 5 knt und 2 knt Länge gespalten (siehe 3.1.4). Je nachdem wie die *telRL*-Oligonukleotide gewählt waren, konnte sich die Radioaktivität anschließend im 5 knt oder im 2 knt Fragment befinden. Die Reaktionsprodukte wurden mit Agarosegelelektrophorese (0,7% Gel) wie beschrieben getrennt und ein Autoradiogramm angefertigt (siehe 3.2.2 und 3.2.1.2). Teil **B** zeigt einen Ausschnitt des synthetischen *telRL*-Substrats nach der Hybridisierung der Oligonukleotide und deren Ligation. Die virale DNA ist grün dargestellt. Das 5'-phosphorylierte Oligonuklotid ist blau markiert, das zweite *telRL*-Oligonukleotid schwarz. Das radioaktiv markierte Phosphatmolekül ist durch einen roten Kreis bezeichnet. Die dargestellten *telRL*-

Basenpaare sind numeriert wie in Abb. 12 und das Symmetriezentrum von *telO* ist markiert. Striche und Nummern zwischen Teil B und C der Abbildung verweisen auf die ^{32}P -phosphorylierte *telRL*-Base die im Autoradiogramm zu sehen ist. Pfeile geben an, welche Phosphatreste sich nach der Reaktion in der 2 knt, bzw. in der 5 knt-Bande befinden. * oberer Strang von *telRL*; die in Abb. 33 mit * versehenen Oligonukleotide wurden ans mJD105u hybridisiert. § nicht-ligiertes Substrat. Teil **C** zeigt das Autoradiogramm. Die 7 knt, 5 knt und 2 knt Banden sind markiert. Spuren a, d, e, f und g: Basen 25, 29, 30, 31 und 32 des unteren Stranges von *telRL*. Spur b und c: Basen 26 und 27 des oberen Stranges von *telRL*. Spur h: wie Spur f, jedoch ohne vorherige Ligation der beiden *telRL*-bildenden Oligonukleotide.

4.7 TelN schneidet versetzt in *telO* mit einem 6-Basenpaar Überhang

4.7.1 Die Transesterifikation durch TelN findet in *telO* an dem Übergang TA zu CG statt

Das künstlich hergestellte Modell-*telRL*-Substrat (Abb. 32, A) wurde von TelN normal prozessiert (Daten nicht gezeigt). Ausgesuchte Phosphatreste im unteren Strang von *telRL* konnten radioaktiv markiert werden. Der genaue Ablauf des Experiments ist in Abb. 32, A gezeigt. Das Modell-Substrat wurde mit TelN inkubiert und die entstandene lineare DNA (7 knt) mit einem Restriktionsenzym zur Unterscheidung in zwei verschieden lange Fragmente gespalten. Je nachdem, welches Phosphat in *telRL* radioaktiv markiert worden war, befand sich dieses nach der TelN-Behandlung im kurzen (2 knt) oder langen (5 knt) DNA-Fragment. Dies war abhängig davon, ob die Transesterifikation in der DNA oberhalb oder unterhalb des markierten Phosphates stattfand (Abb. 32, B).



Abb. 33 In der *next-neighbor*-Analyse verwendete Oligonukleotide

Die hier gezeigten Oligonukleotide bildeten den komplementären Strang zur *telRL*-Sequenz, im viralen Einzelstrang des in Abb. 32 dargestellten Substrats. Die *telO*-Region ist mit Pfeilen über der Sequenz markiert. Die Zahlen rechts der Oligonukleotidpaare (schwarz und blau) geben die Position des ³²P-markierten Phosphats in der *telRL*-Sequenz an. Die blau dargestellten Oligonukleotide sind radioaktiv 5'-markiert. Alle Sequenzen sind 5'-3' dargestellt. Die Pfeile über den Zahlen geben an, ob diese Oligonukleotide den unteren Strang von *telRL* (Pfeil nach links), oder den oberen Strang von *telRL* (Pfeil nach rechts) bildeten. * Diese Oligonukleotidpaare wurden an mJD105u hybridisiert (Abb. 32, A und B).

Das Ergebnis des Experiments zeigt, daß TelN in *telO* versetzt schneidet. Der nukleophile Angriff der katalytischen Aminosäure von TelN muß dabei auf die 5'- oder 3'-seitige Phosphordiesterbindung von Base C26 (oberer Strang), bzw C31 (unterer Strang) erfolgen (Abb. 32, B und C). Daraus ergibt sich ein 4-bp (5'-Hydrolyse) oder 6-bp (3'-

Hydrolyse) Überhang. Die 7 knt-Bande zeigt dabei linearisiertes Substrat, welches nicht von TelN prozessiert wurde. Die schwache 2 knt-Bande in den Spuren b und g von Teil C ist auf eine nicht-sequenzspezifische Bindung des radioaktiven Oligonukleotids zurückzuführen.

Die Frage der 5'- oder 3'-seitigen Hydrolyse könnte entschieden werden, wenn man entweder eine der Basen direkt radioaktiv markiert, oder wenn ein TelN-DNA Intermediat isoliert werden könnte, an welches TelN kovalent gebunden ist.

4.7.2 pJD105(TA)₇ ist ein Suizidsubstrat

Die Prozessierung des Plasmids pJD105(TA)₇ mit TelN ergibt ein Muster aus mehreren, diffusen Banden in der Agarosegelelektrophorese (siehe Abb. 34, Spuren b-e, Banden 3-7). Die Analyse des Reaktionsprodukts im Elektronenmikroskop zeigte, daß die Mehrzahl der DNA-Moleküle zirkulär waren und von einer Größe, die auf Multimere schließen läßt (Abb. 34, Spuren b-e, Banden 4-7). Diese Multimere können nur durch intermolekulare sequenzspezifische Rekombination durch TelN entstehen. An jedes der multimeren DNA-Moleküle hatte mindestens ein TelN Molekül gebunden (elektronenmikroskopische Daten nicht gezeigt).

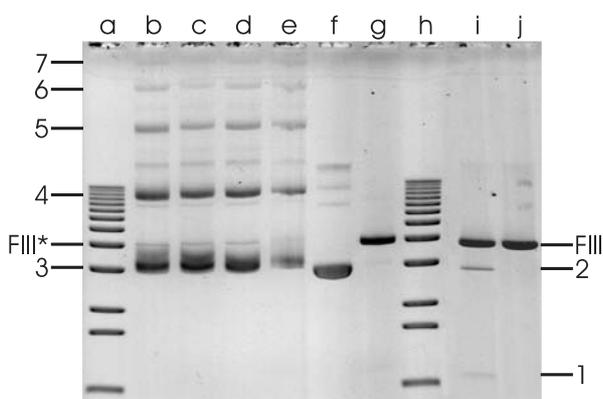


Abb. 34 Prozessierung von pJD105(TA)₇ mit TelN

Das Bild des 0,7 % igen Agarosegels zeigt das Experiment mit pJD105 und pJD105(TA)₇ nach Inkubation mit TelN (siehe 3.5.1), mit und ohne vorherige Linearisierung durch *AatII* (siehe 3.1.4). Spur b-d: pJD105(TA)₇ nach Inkubation mit 5000 U TelN, Verdau mit ProK und Zugabe von 0,05 % (b), 0,1 % (c) und 0,2 % (d) SDS (jeweils Endkonzentration); e: das Plasmid nach Inkubation mit

5000 U TelN; f: pJD105(TA)₇; g: pJD105 nach Inkubation mit 150 U TelN; i: pJD105(TA)₇ nach Linearisierung mit *AatII* und Inkubation mit 5000 U TelN; j: das Plasmid nach Linearisierung mit *AatII*; a und h: DNA-Größenstandard (1 kb-Leiter). Die linearen Formen der Plasmide sind mit FIII* bzw. mit FIII gekennzeichnet. Die Banden der Reaktionsprodukte sind mit 1-7 nummeriert.

Die TelN-DNA Komplexe sind möglicherweise Intermediate der *telomere resolution* Reaktion; das Substrat pJD105(TA)₇ ist daher ein Suizidsubstrat. Weitere Untersuchung des Substrats, durch Linearisierung mit *AatII* vor der TelN-Reaktion und anschließendem Proteinase K Verdau des Ansatzes, führte in der Agarosegelelektrophorese zu drei scharfen Banden der erwarteten Größe (Abb. 34, Spur i, Banden 1, 2, FIII). Dies legt den Schluß nahe,

daß es sich tatsächlich um ein Intermediat der *telomere resolution* Reaktion handeln könnte, in dem TelN kovalent an den Phosphatrest eines DNA-Strangbruchs gebunden war. Um die *resolution site* in *telO* einzugrenzen, wurden die pJD105(TA)₇ Intermediate mittels DNA-Endmarkierung weiter analysiert.

4.7.3 TelN bindet transient an das 3'-Ende der *telomere resolution site*

Zur Klärung der Frage, ob TelN tatsächlich kovalent an das 3' oder 5'-Ende der *telomere resolution site* bindet, wurde das durch Inkubation von pJD105(TA)₇ mit TelN erzeugte Protein-DNA-Addukt einer 3'-, bzw. 5'-Markierung der DNA unterzogen. Da nur freie DNA-Enden mit terminaler Transferase markiert/phosphoryliert werden können, sollte bei der 3'- oder 5'-Markierung nur das nicht vom Protein blockierte Ende des TelN-geschnittenen Stranges der DNA markierbar sein (Abb. 35, A). Nach 3'-Markierung der DNA, Spaltung durch ein Restriktionsenzym und Trennung durch Agarosegelelektrophorese war nur das längere von zwei DNA-Fragmenten durch Autoradiographie nachweisbar (Abb. 35, B, Spur 1*), während nach 5'-Markierung beide Fragmente im Autoradiogramm zu sehen waren (Daten nicht gezeigt).

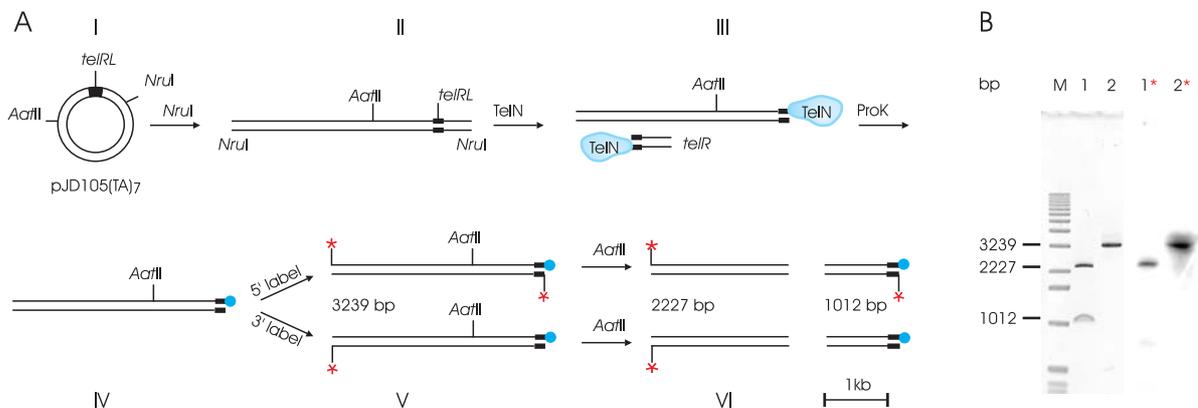


Abb. 35 Nachweis kovalenter Bindung von TelN an das Suizidsubstrat pJD105(TA)₇

A: Experimentalablauf (schematisch). Das Mutantensubstrat pJD105(TA)₇ (A, I) wurde mit *NruI* linearisiert (A, II), mit TelN inkubiert (A, III) und mit Proteinase K behandelt. Das 3239 bp -Fragment wurde isoliert (A, IV) und entweder am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit ³²P (bzw. [α -³²P]-dATP) markiert wie in 3.1.7.1 und 3.1.7.2 beschrieben. Die Position des radioaktiven Phosphats ist mit einem roten Stern markiert (A, V). Nach *AatII*-Spaltung der DNA in zwei Fragmente (A, VI), wurden diese mit Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.2) aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (siehe 3.2.1.1) und autoradiographiert (siehe 3.2.1.2). Teil B zeigt das Ergebnis. Spur 1: A, VI; Spur 2: A, V. 1,2 Ethidiumbromidfärbung, 1*,2* Autoradiogramm. Spur M enthält den 1-kb DNA-Größenstandard.

4.7.4 Run-off Sequenzierung des prozessierten Suizidsubstrats pJD105(TA)₇ zeigt einen 6-Basenpaar Überhang

Um die Position der zwei transienten Schnittstellen in *telO* zu bestimmen, wurden die TelN-DNA-Addukte aus Abb. 35, AIII einer *run-off* Sequenzierung unterzogen. Dazu wurden die Fragmente zunächst mit Proteinase K behandelt und anschließend wie in 3.1.6 beschrieben sequenziert. Das Ergebnis zeigt, daß die DNA- Sequenz im oberen und unteren Strang von *telRL* links, bzw. rechts des Symmetriezentrums endet (in diesem Falle TATATA, siehe Abb. 36). In beiden Fällen kann das zentrale 6-bp Segment von *telO* sequenziert werden. Danach bricht die Sequenz ab. In der Sequenz des oberen Strangs sind nach dem zentralen Segment noch zwei Basen schwach im Elektropherogramm zu sehen, im untern Strang drei (Abb. 36). Es ist eine bekannte Eigenschaft von Tac-DNA-Polymerase, in Sequenzierreaktionen willkürlich ein T oder A *telmplate*unabhängig an das Komplement anzuhängen, wenn das Ende der *template*-DNA erreicht ist. Da die Peaks signifikant schwächer als die Vorhergehenden sind, handelt es sich hierbei vermutlich um Artefakte.

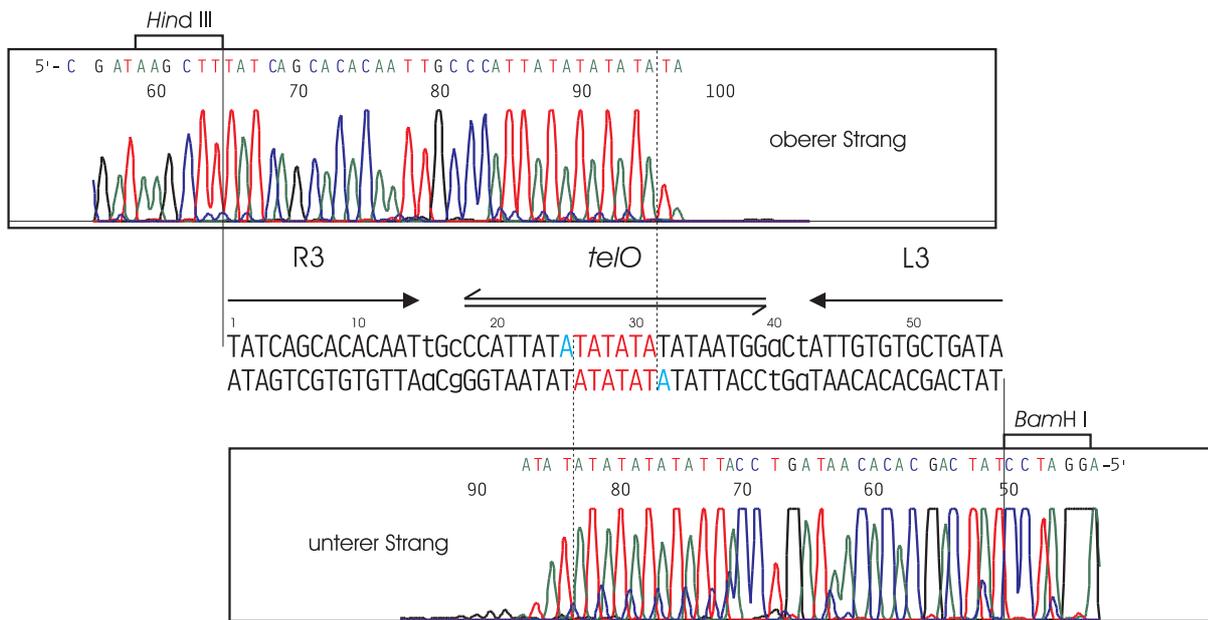


Abb. 36 Run-off Sequenzierung am TelN-behandelten Suizid-Substrat pJD105(TA)₇

2 pmol des Plasmids pJD105(TA)₇ wurde wie in 3.5.1 beschrieben mit 100 pmol TelN inkubiert. Das entstandene Produkt aus linearer DNA mit kovalent gebundenem Protein wurde mit Proteinase K behandelt und die DNA-Enden sequenziert (siehe 3.1.6, primer: pmsl und pms-r-seq aus Tab. 3). Die resultierenden Elektropherogramme sind abgebildet. Zwischen den Elektropherogrammen ist die Sequenz des mutierten *telRL*-Substrats dargestellt. Der mutierte Bereich ist rot markiert. Die Base, an deren Phosphatrest TelN kovalent bindet, ist blau gekennzeichnet.

Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt daher, daß TelN am Suizidsubstrat mit einem 6-Basenpaar Überhang schneidet.

Für die Übertragung dieses Ergebnisses auf die Wildtyp-Situation müßte man annehmen, daß TelN im Wildtyp-Substrat die gleiche Seite der DNA -nämlich die 3'-Seite- wie im Mutantensubstrat pJD105(TA)₇ angreift (4.7.3). Dies würde bedeuten, daß TelN in *telO* mit einem 6-Basenpaar Überhang schneidet. Die Vermutung, daß es sich im Wildtyp-Substrat auch um einen 6-Basenpaar Überhang handeln könnte, wird durch das Ergebnis der *run-off* Sequenzierung an TelN-behandeltem pJD105 (TA)₇ gestützt, in dem ebenfalls ein 6-Basenpaar Überhang gefunden wurde (4.7.4).

Die Ergebnisse von 4.4.3 bis 4.7.1 zeigen, daß in den nur 56 Basenpaaren von *telRL* alle für die *telomere resolution* essentiellen Sequenzbereiche enthalten sind (Abb. 37). Im inneren Bereich von *telRL -telO-*, der 22 bp umfaßt, findet die Transesterifikation statt, auch ist dieser Bereich essentiell für die Erkennung und sequenzspezifische Bindung durch TelN. Die inverse Repetition R3/L3 ist essentiell für eine hohe Affinität in der sequenzspezifischen DNA-Bindung durch TelN. Ein kleiner Bereich (14 bp) von *telO* könnte Z-DNA Konformation annehmen, der auch von TelN gegen DNaseI geschützt ist, da TelN *telRL* vollständig bedeckt.



Abb. 37 Zuordnung funktioneller Bereiche in *telRL*

TelRL ist als Basenfolge dargestellt. Die Pfeile über der Sequenz zeigen den rechten und linken Telomerarm von N15 (*telR* und *telL*). *telRL* ist ein 56-bp nicht-perfektes Palindrom. Die Sequenz wurde von bp 1-56 numeriert wie in Abb. 12 beschrieben. Zwei Basenpaare unterbrechen die Symmetrie. Diese sind in der Sequenz durch Kleinbuchstaben und Punkte in den darüberliegenden Pfeilen markiert. Die funktionellen Bereiche sind unter der Sequenz zugeordnet. Der rot dargestellte Bereich in *telO* ist für die Erkennung und sequenzspezifische Bindung durch TelN essentiell, der blau markierte Bereich für die Transesterifikation. Die Stellen der Transesterifikation, sowie der Überhang, sind im oberen und unteren Strang gestrichelt markiert und befinden sich rechts und links von (CG)₆. Über der Sequenz sind der vor Angriff von DNaseI geschützte Sequenzabschnitt und der Bereich vorhergesagter Z-DNA Konformation gekennzeichnet.