

Das Tyrosinintegrase-Analog TelN
katalysiert die *telomere resolution*
im Bakteriophagen N15

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
I Einleitung	I
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
2 Material	II
2.1 <i>E. coli</i> Stämme	II
2.2 Bakteriophagen, Plasmide und Nukleinsäuren	II
2.2.1 Bakteriophagen	II
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

3 Methoden	30
3.1 DNA-Techniken	30
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
3.2 Elektrophoresetechniken	33
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
3.3 Proteinanalyse	36
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
3.4 Transmissionselektronenmikroskopie	38
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) ₇ 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) ₇ 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 α 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) ₇ mit TelN.....	72
Abb. 35 Nachweis kovalenter Bindung von TelN an das Suizidsubstrat pJD105(TA) ₇	73
Abb. 36 <i>Run-off</i> Sequenzierung am TelN-behandelten Suizid-Substrat pJD105(TA) ₇	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