

# Charakterisierung des Replikationsproteins ORF904 des archaealen Plasmids pRN1

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades  
- Doktor der Naturwissenschaften -  
der Fakultät für Biologie, Chemie  
und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
Diplom-Biologin

**Kirsten Beck**

Bayreuth, 2008

Diese Arbeit wurde von Februar 2004 bis Juli 2008 unter Anleitung von PD Dr. Georg Lipps am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.10.2008

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 23.01.2009

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz X. Schmid (Erstgutachter)

Prof. Dr. Georg Lipps (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitzender)

Prof. Dr. Wolfgang Schumann

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. DNA-Replikation.....	1
1.2. Plasmide als Modell für die Replikation .....	4
1.3. Das crenarchaeale Plasmid pRN1 .....	5
1.3.1. ORF56 und ORF80 .....	7
1.3.2. ORF904.....	7
1.4. Primasen .....	10
1.5. Assoziation von Primasen mit anderen Enzymaktivitäten.....	13
1.6. Vorläufiges Modell der Replikation von pRN1 .....	14
1.7. Problemstellung .....	15
2. Material und Methoden .....	16
2.1. Materialien .....	16
2.1.1. Bakterienstämme .....	16
2.1.2. Nährmedien .....	16
2.1.3. Plasmide .....	16
2.1.4. Oligodesoxynukleotide.....	16
2.1.5. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.5.1. Chromatographiematerialien.....	17
2.1.5.2. Radiochemikalien .....	17
2.1.5.3. Allgemeine Chemikalien .....	17
2.1.5.4. Enzyme .....	18
2.1.5.5. Längenstandards.....	18
2.1.5.6. Antikörper.....	18
2.1.5.7. Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.5.8. Software.....	18
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Elektrophoretische Methoden.....	19
2.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.2.1.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	19
2.2.1.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schaeffer und von Jagow.....	20
2.2.1.4. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli .....	20
2.2.2. Detektion von Nukleinsäuren in Gelen.....	21
2.2.2.1. Detektion unmarkierter DNA mittels Ethidiumbromid.....	21
2.2.2.2. Detektion radioaktiv markierter DNA.....	21
2.2.3. Detektion von Proteinen in Gelen .....	21
2.2.3.1. Coomassie-Färbung.....	21
2.2.3.2. Silberfärbung.....	21

2.2.4. Westernblot .....	22
2.2.4.1. Transfer mittels <i>semi-dry blotting</i> .....	22
2.2.4.2. Antikörperreaktion .....	22
2.2.5. Isolierung und Reinigung von DNA .....	23
2.2.5.1. Phenol/Chloroform-Präparation von Plasmid-DNA.....	23
2.2.5.2. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Kit .....	23
2.2.5.3. Isolierung einzelsträngiger Plasmid-DNA.....	23
2.2.5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen .	24
2.2.5.5. Bestimmung der Konzentration von DNA .....	24
2.2.6. Klonierung.....	24
2.2.6.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	24
2.2.6.2. Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	25
2.2.6.3. Enzymatische Dephosphorylierung.....	25
2.2.6.4. Ligation .....	25
2.2.6.5. Verwendung von Klonierungsvektoren.....	26
2.2.7. Phosphorylieren und Hybridisieren von DNA .....	26
2.2.7.1. Enzymatische Phosphorylierung .....	26
2.2.7.2. Hybridisierung .....	26
2.2.7.3. Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Standards.....	26
2.2.8. Transformation von <i>E. coli</i> .....	27
2.2.8.1. Herstellung RbCl-kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen .....	27
2.2.8.2. Transformation .....	27
2.2.9. Expression und Aufreinigung von Proteinen .....	27
2.2.9.1. Test auf Überexpression.....	28
2.2.9.2. Fermentation und Aufschluß der Zellen.....	28
2.2.9.3. Affinitätschromatographie .....	29
2.2.9.4. FPLC-gestützte Kationenaustauscherchromatographie .....	30
2.2.9.5. Ultrafiltration zur Konzentrierung.....	30
2.2.9.6. Dialyse der Proteine .....	30
2.2.9.7. Proteinkonzentrationsbestimmung .....	30
2.2.9.8. Gelfiltration .....	31
2.2.10. Untersuchungen der Proteinaktivität .....	31
2.2.10.1. Primaseaktivitätsassay .....	31
2.2.10.2. Polymeraseaktivitätsassay .....	32
2.2.10.3. Bestimmung von $K_m$ und $V_{max}$ .....	32
2.2.10.4. Bestimmung der Affinitätskonstante $K_d$ .....	32
2.2.10.5. Terminale Transferase-Assays.....	34
2.2.11. Kristallisation und Strukturbestimmung.....	35
2.2.11.1. Kristallisation von N40-C370 .....	35

2.2.11.2. Messen der Kristalle und Bestimmung der Struktur.....	35
2.2.12. Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1 .....	36
2.2.12.1. Ligation-mediated PCR (LMPCR) .....	36
2.2.12.2. Bestimmung des Startpunkts auf einzelsträngigem Plasmid .....	37
2.2.12.3. Primaseaktivität mit putativem Replikationsursprung .....	38
2.2.13. Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen.....	39
2.2.13.1. Dot Blot .....	39
2.2.13.2. Plattenbasierter Interaktionsassay .....	39
2.2.13.3. <i>Pull-down</i> Assay .....	40
3. Ergebnisse und Diskussion .....	41
3.1. Aktivitäten der Prim/Pol-Domäne.....	41
3.1.1. Charakterisierung der Primaseaktivität.....	41
3.1.1.1. Die Primase ist sequenzspezifisch .....	41
3.1.1.2. Zusammensetzung des Primers .....	48
3.1.2. Mechanismus der Primersynthese .....	54
3.1.2.1. Genauigkeit der Primersynthese .....	54
3.1.2.2. Weitere Untersuchungen der Primaseaktivität.....	61
3.1.3. Zusätzliche Aktivität der Prim/Pol-Domäne .....	69
3.1.3.1. ORF904 besitzt terminale Transferaseaktivität .....	69
3.1.3.2. Untersuchung der Aktivität der Deletionsmutanten.....	70
3.2. Struktur der Primasedomäne mit DNA-Templat .....	73
3.2.1. Kristallisation des Proteins .....	73
3.2.1.1. Assemblierung des Komplexes .....	75
3.2.1.2. Kristallisation.....	76
3.2.1.3. Ernten der Kristalle und Datensammlung .....	78
3.2.1.4. Bestimmung der Struktur .....	79
3.2.1.5. Soaken mit Desoxynukleotiden .....	81
3.2.2. Mutagenese der Primasedomäne.....	82
3.3. Erste Schritte zum Aufbau eines <i>in vitro</i> Replikationssystems mit ORF904 .....	91
3.3.1. Versuche den Replikationsursprung von pRN1 zu identifizieren .....	91
3.3.1.1. LM-PCR (ligation mediated PCR).....	91
3.3.1.2. Identifizierung des Startpunkts auf einzelsträngigen Plasmiden.....	95
3.3.1.3. Verwendung eines identifizierten putativen Ursprungs .....	97
3.3.2. Interaktion von ORF904 mit anderen Proteinen .....	101
3.3.2.1. Dot Blot.....	103
3.3.2.2. Plattenbasierte Interaktionsstudien.....	105
4. Zusammenfassende Diskussion .....	120
4.1. Charakterisierung der Aktivität der Prim/Pol-Domäne von ORF904 .....	120
4.1.1. Primaseaktivität .....	120

4.1.1.1. ORF904 ist sequenzspezifisch.....	120
4.1.1.2. Der Primer enthält Ribo- und Desoxynukleotide .....	121
4.1.1.3. Die Primersynthese ist ungewöhnlich genau .....	122
4.1.1.4. Nichtkomplementäre Primer könnten durch „Verrutschen“ entstehen ...	124
4.1.1.5. Kinetik der Primasereaktion .....	125
4.1.1.6. Die minimale Primasedomäne umfasst die ersten 370 Aminosäuren.....	126
4.1.2. ORF904 besitzt zusätzlich eine terminale Transferaseaktivität .....	127
4.2. Strukturelle Untersuchungen der Primaseaktivität .....	128
4.2.1. Bestimmung der Struktur der minimalen Primasedomäne .....	128
4.2.2. Y352 und W314 der C-terminalen Subdomäne sind an der Substraterkennung beteiligt.....	129
4.3. Aufbau eines <i>in vitro</i> Replikationssystems.....	131
4.3.1. Der Replikationsursprung von pRN1 .....	131
4.3.2. ORF904 interagiert mit PCNA1 und ORF80.....	133
4.3.3. ORF904 ist in der Lage zu multimerisieren.....	135
5. Zusammenfassung .....	137
6. Summary .....	140
7. Abkürzungen .....	143
8. Referenzen .....	145
9. Anhang .....	158
9.1. Oligodesoxynukleotide .....	158
9.2. Kristallisation .....	164

# 1. Einleitung

## 1.1. DNA-Replikation

Die Replikation von DNA ist einer der fundamentalen Prozesse des Lebens, dessen Prinzipien in allen zellulären Organismen gleich sind. Für die Replikation chromosomaler DNA wird zuerst eine bestimmte DNA-Sequenz, der Replikationsursprung, von einem oder mehreren Proteinen erkannt und die DNA wird im Bereich des Ursprungs entwunden. Dann kommt es zur Beladung der DNA mit Helikase, welche die weitere Entwindung der Doppelstränge vornimmt. Im Anschluss wird der eigentliche Replikationsapparat, welcher unter anderem DNA-Polymerase und Primase enthält, assembliert und die Replikation der DNA schreitet in eine oder beide Richtungen fort. Auf Grund der Antiparallelität der DNA-Stränge und der Tatsache, dass die Synthese von DNA nur in 5' → 3' Richtung erfolgt, kann dabei ein Strang kontinuierlich repliziert werden (Leitstrang), während der andere in einer Reihe von kurzen Abschnitten (Okazaki-Fragmenten) synthetisiert wird (Folgestrang).

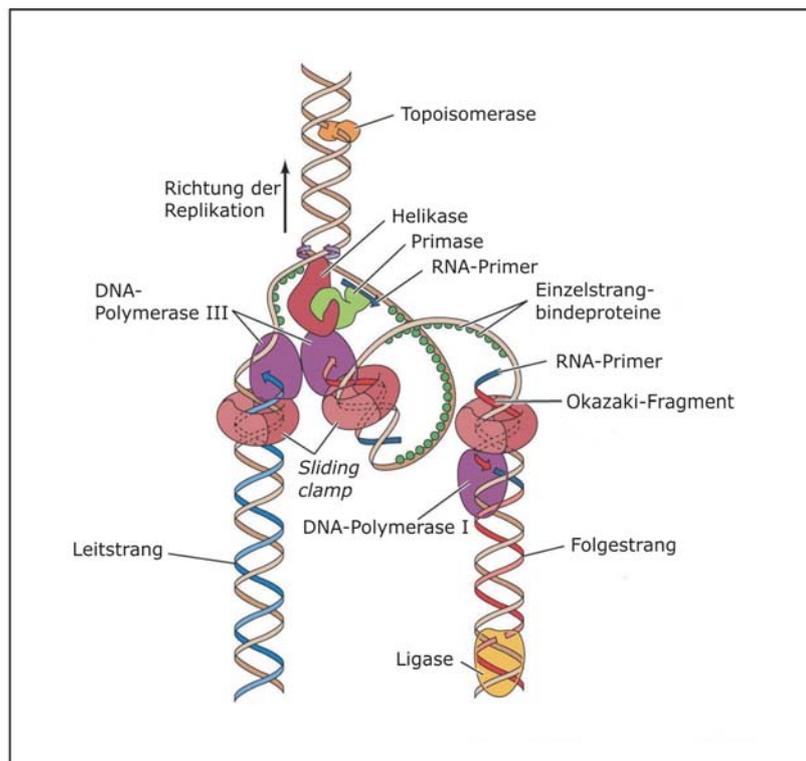
Dann werden die Primer mittels Nukleasen entfernt und mit DNA ersetzt, im Anschluss werden die einzelnen Fragmente durch eine Ligase verbunden (Abbildung 1-1). Die Aktivität der an der Replikation beteiligten Proteine wird stark kontrolliert, um die korrekte Weitergabe der Erbinformationen an die Tochterzellen zu gewährleisten.

Für die Replikation extrachromosomaler DNA (wie Plasmide) werden auch andere Mechanismen eingesetzt. So werden eine Reihe von Plasmiden, Viren und Bakteriophagen mittels *rolling circle* Replikation vervielfältigt. Dabei wird durch eine Endonuklease ein Einzelstrangbruch eingeführt und das entstehende 3'-OH Ende verlängert. Die parentale DNA wird verdrängt und liegt intermediär einzelsträngig vor, bevor sie ebenfalls zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt wird. Zusätzlich existieren noch eine Reihe weiterer Replikationsmechanismen für extrachromosomale Elemente, welche verschieden große Anteile der zellulären Replikationsmaschinerie verwenden.

Bei der genaueren Betrachtung der Proteine, welche an der Replikation chromosomaler DNA beteiligt sind, zeigen sich Unterschiede zwischen Bakterien und Eukaryoten (Übersicht in Tabelle 1-1). Generell lässt sich sagen, dass in Eukaryoten eine größere Anzahl an Proteinen involviert sind. So wird der Replikationsursprung in Bakterien durch das Protein DnaA erkannt, eine Vielzahl davon bindet sequenzspezifisch an verschiedenen Orten des Replikationsursprungs und führt zu einer Entwindung der DNA. In Eukaryoten wird der Ursprung dagegen durch einen *origin recognition complex* (ORC) gebunden, welcher sich aus sechs verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Dabei lässt sich in vielen Fällen keine so starke Sequenzspezifität feststellen, wie für DnaA, die Interaktion mit weiteren Proteinen sowie Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur beeinflussen die Bindung vermutlich mehr (Bell & Dutta, 2002). Der ORC ist auch nicht in der Lage

DNA zu entwinden, sondern interagiert mit Cdc6, um die Beladung der DNA mit Helikase zu veranlassen. In Bakterien wird die Helikase von einem Hexamer des Proteins DnaC an die Replikationsgabel rekrutiert. Die bakterielle Helikase setzt sich aus sechs Untereinheiten von DnaB zusammen, während die vermutete replikative Helikase der Eukaryoten ein hexamerer Komplex der Proteine MCM2-7 ist.

Die Synthese der DNA erfolgt in Bakterien hauptsächlich durch die DNA-Polymerase III, welche sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt, während die initiierenden Primer durch das DnaG-Protein bereitgestellt werden. In Eukaryoten werden die Primer durch einen Komplex aus DNA-Polymerase  $\alpha$  und Primase synthetisiert und durch die Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  verlängert.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Prozesse an einer Replikationsgabel von *E. coli*. Modifiziert nach Cooper & Hausman, 2004.**

In den letzten Jahren zeigten Untersuchungen verschiedener archaealer Mikroorganismen, dass die Mitglieder dieser Domäne eine den Eukaryoten in vielen Aspekten sehr ähnliche Replikationsmaschinerie besitzen. Diese ist aber meist einfacher aufgebaut und bietet damit die Möglichkeit, mit Hilfe der Archaea als Modellorganismen die eukaryotische Replikation einfacher untersuchen zu können. Außerdem lässt sich daraus ableiten, dass die Proteine, welche ebenfalls in den Archaea vorkommen, evolutionär sehr alt sind und im letzten gemeinsamen Vorfahren der Archaea und Eukaryoten bereits existierten.

Wie in Tabelle 1-1 aufgeführt, konnten eine Reihe archaealer Proteine identifiziert werden, welche homolog zu bekannten eukaryotischen Replikationsproteinen sind. So

sind die bisher identifizierten Proteine des archaealen ORC, von welchem eine variable Anzahl in verschiedenen Organismen vorkommt, homolog zum eukaryotischen ORC1 und zu dem Initiatorprotein Cdc6. Ebenso kommt in Archaea mindestens ein Homolog der eukaryotischen MCM-Proteine vor, welches die vermutete replikative Helikase bildet und es lassen sich auch in allen Archaea Gene, welche für Homologe zur eukaryotischen *sliding clamp* (PCNA) zur Fixierung verschiedener Proteine an DNA kodieren, finden.

**Tabelle 1-1: Vergleich einiger an der Replikation beteiligter Proteine in Bakterien, Eukaryoten und Archaea. Die Tabelle wurde nach Kelman & Kelman, 2004 und Dionne *et al.*, 2003b abgewandelt. UE- Untereinheit**

	<b>Bakterien</b>	<b>Eukaryoten</b>	<b>Archaea</b>
<b>Initiation</b>			
Erkennung des Replikationsursprungs	DnaA (1 UE)	ORC (6 UE)	ORC1(1-3 UE)/Cdc6
Ladung der Helikase	DnaC (1 UE)	Cdc6 (1 UE)	ORC1/Cdc6
Replikative Helikase	DnaB (1 UE)	MCM (6 UE)	MCM (1-4 UE)
Einzelstrangbindeprotein	SSB (1 UE)	RPA (3 UE)	RPA/SSB (1 UE)
<b>Elongation</b>			
Primersynthese	DnaG (1 UE)	Pol $\alpha$ /Primase (4 UE)	Primase (2 UE)
Polymerase	Pol III (3 UE) [PolC] <sup>a</sup>	Pol $\delta$ ( $\approx$ 4 UE) Pol $\epsilon$ ( $\approx$ 5 UE) [PolB] <sup>a</sup>	PolB/D <sup>*a</sup>
Ladung der <i>sliding clamp</i>	$\gamma$ -Komplex	RFC (5 UE)	RFC (2 UE)
<i>sliding clamp</i>	$\beta$	PCNA (1 UE)	PCNA (3 UE)
Entfernung der Primer	Pol I RNaseH	Fen-1 RNaseH	Fen-1 RNaseH

\* die genaue Identität der replikativen DNA-Polymerase in Archaea ist nicht geklärt

<sup>a</sup> zeigt die Zugehörigkeit der DNA-Polymerasen zur jeweiligen Familie an

Gleichzeitig verfügen die Archaea aber auch über eine Reihe von Merkmalen, welche bakteriellen Eigenschaften entsprechen. So liegt ihre DNA ebenfalls in einem ringförmigen Genom vor. Die Replikationsursprünge haben keine Ähnlichkeit zu bekannten eukaryotischen Ursprüngen und ähnlich wie bei Bakterien liegen die Gene für die Proteine des ORC oftmals in direkter Nachbarschaft zu ihnen (Kelman & Kelman, 2004). Es zeigte sich aber auch, dass manche Archaea, in starkem Kontrast zu Bakterien, über mehr als einen Replikationsursprung in ihrem Genom verfügen (Robinson *et al.*, 2004; Lundgren *et al.*, 2004). Es wird spekuliert, dass diese mehrfachen Replikationsursprünge durch die Integration extrachromosomal replizierender Elemente

in das Genom entstanden sind (Robinson & Bell, 2007). Dies weist auf eine im Vergleich zu Bakterien erhöhte Komplexität der Informationsverarbeitung hin.

## 1.2. Plasmide als Modell für die Replikation

Um die Replikation verschiedener Systeme zu untersuchen, bieten sich kleine genetische Elemente wie beispielsweise Plasmide oder Bakteriophagen/Viren an. So konnten über den Phagen T7 oder den eukaryotischen Simian Virus 40 eine Fülle an Informationen über die Abläufe der Replikation in bakteriellen oder eukaryotischen Systemen gewonnen werden (Kornberg & Baker, 1992). Für die Untersuchung archaealer Systeme stehen derartige, gut charakterisierte Plasmide oder Viren bisher nicht vergleichbar zur Verfügung.

Es wurden bis jetzt eine Reihe archaealer Plasmide isoliert. In den Euryarchaeota, welche eines der großen Phyla der Archaea darstellen, konnte beispielsweise pGT5 aus *Pyrococcus abyssi*, pTN1 aus *Thermococcus nautilus* oder pNRC100 aus *Halobacterium halobium* isoliert werden (Erauso *et al.*, 1996; Soler *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 1989; Soler *et al.*, 2007). Diese Plasmide sind teilweise charakterisiert, so ist bekannt, dass das Rep75-Protein von pGT5 eine Endonuklease ist und das Plasmid vermutlich ähnlich wie einige bakterielle Plasmide als ein *rolling circle* repliziert wird (Marsin & Forterre, 1999). Außerdem konnten auf Basis dieser Plasmide Shuttlevektoren konstruiert werden (Lucas *et al.*, 2002).

Für das zweite große Phylum, die Crenarchaeota, ist bis jetzt nur eine geringere Anzahl von Plasmiden aus wenigen Organismen untersucht worden. Die Mehrzahl der bisher isolierten Plasmide stammt aus der Gattung *Sulfolobus*. Die in *Sulfolobus* und verwandten Crenarchaeoten entdeckten Plasmide lassen sich in zwei Gruppen einordnen, relativ große (>25 kb) konjugative Plasmide und kleinere (5 – 14 kb) kryptische Plasmide (Lipps, 2006). Die kryptischen Plasmide lassen sich verschiedenen Plasmid-Familien zuordnen. Das Plasmid pRN1 wurde als eines der ersten sequenziert und begründete die pRN-Familie (Keeling *et al.*, 1996). Weitere Plasmide in dieser Familie sind pRN2, pHEN7 und pDL10 aus *Acidianus ambivalens* (Keeling *et al.*, 1998; Kletzin *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2000). Diese Plasmide enthalten alle zwei stark konservierte Bereiche, welche drei offene Leseraster (*open reading frames*, orf) enthalten (Keeling *et al.*, 1998). Außerdem wurden eine Reihe weitere Plasmide identifiziert, welche mit den pRN-Plasmiden nur begrenzte Ähnlichkeit haben und vermutlich eine oder mehrere weitere unabhängige Gruppen bilden (Prato *et al.*, 2006). Dazu gehören die Plasmide pIT3, pTAU4, pORA1 und pTIK4 (Prato *et al.*, 2006; Greve *et al.*, 2005). In *Sulfolobus* wurde auch das Virus-Plasmid-Hybrid pSSVx gefunden, welches mit Hilfe des Fusellovirus SSV2 verbreitet werden kann. Der Plasmidanteil dieses Hybrids zeigt auf Grund der vorhandenen offenen Leseraster ebenfalls eine Zugehörigkeit zur pRN-Familie an (Arnold *et al.*, 1999).

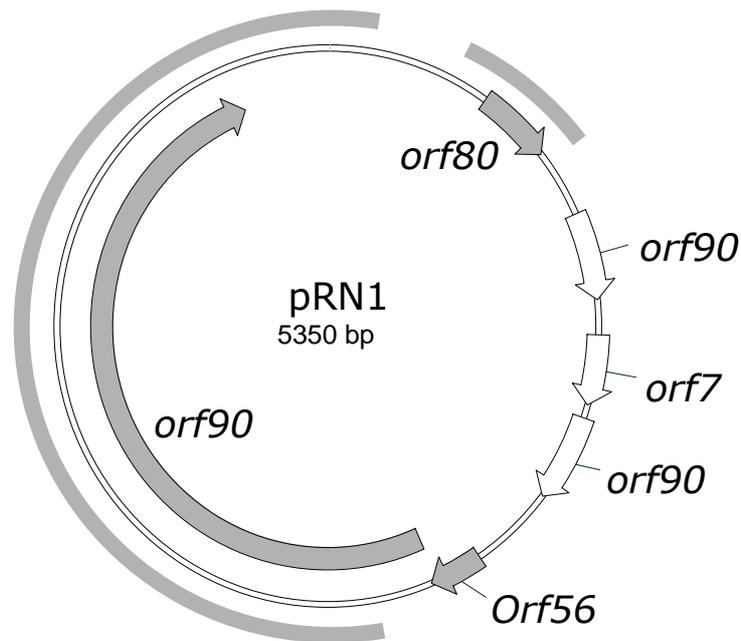
Die crenarchaealen genetischen Elemente wurden bisher kaum biochemisch untersucht. Das bestuntersuchte Plasmid ist pRN1, hier konnten die Produkte der drei konservierten offenen Leseraster charakterisiert und eine Transkriptanalyse durchgeführt werden (Lipps *et al.*, 2001b; Lipps *et al.*, 2001a; Lipps *et al.*, 2003; Berkner & Lipps, 2007). Auf dieses Plasmid wird im Anschluss genauer eingegangen. Zudem wurde die Transkriptionsaktivität von pSSVx und das Replikationsprotein des Plasmids pIT3 untersucht (Contursi *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2008). Es ist aber bisher noch nicht gelungen, die genauen Vorgänge und Mechanismen der Replikation eines der crenarchaealen Plasmide zu identifizieren, ebenso sind die Replikationsursprünge dieser Plasmide nach wie vor nicht eindeutig bestimmt worden.

### 1.3. Das crenarchaeale Plasmid pRN1

Das Plasmid pRN1 wurde aus dem thermoacidophilen Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* REN1H1 isoliert und kommt in diesem zusammen mit dem verwandten Plasmid pRN2 vor. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass beide Plasmide auch allein repliziert werden können (Purschke & Schafer, 2001). Bisher wurden keine pRN-Plasmide außerhalb der Crenarchaea gefunden und es lässt sich keine Verwandtschaft zu anderen Plasmiden feststellen. Die pRN-Plasmide sind kryptisch, d.h. sie verschaffen dem Wirt keinen ersichtlichen Vorteil. Im Gegensatz dazu kodieren viele andere Plasmide beispielsweise für Proteine für den Abbau toxischer Substanzen, für Antibiotikaresistenzen oder für Bakteriozine oder sie enthalten Sequenzen, die den DNA-Transfer mittels Konjugation ermöglichen. Alle Mitglieder der pRN1-Familie zeichnen sich durch drei konservierte offene Leseraster aus. Sequenzvergleiche ergaben für das kleinste der offenen Leseraster (ORF56 in pRN1) eine Ähnlichkeit zu CopG, einem Protein, welches in einer kleinen Gruppe bakterieller Plasmide gefunden wurde und dort vermutlich die Kopienanzahl reguliert (Keeling *et al.*, 1996). Diese Regulation wird durch die Kontrolle der Transkription eines Replikationsproteins erreicht (Delsolar *et al.*, 1990), außerdem befindet sich dieses Protein direkt vor dem Replikationsprotein der bakteriellen Plasmide. Eine vergleichbare Situation wurde für die pRN-Plasmide gefunden, das größte offene Leseraster (ORF904 in pRN1) liegt stromabwärts des vermuteten Regulationsproteins. Es wurden in diesem Leseraster außerdem ein Nukleotidbindemotiv sowie Sequenzähnlichkeiten zu Helikaseproteinen von Bakteriophagen identifiziert (Keeling *et al.*, 1996). Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei diesem größten Leseraster um ein multifunktionelles Replikationsprotein handelt. Das dritte offene Leseraster (ORF80 in pRN1) ist innerhalb der pRN-Plasmide stark konserviert.

Zusätzlich zu dem konservierten Anteil enthalten die pRN-Plasmide einen Anteil, welcher in Sequenz und Länge variiert. An einem oder beiden Enden dieses variablen Anteils konnten Sequenzmotive identifiziert werden, welche möglicherweise durch

Rekombination zu der Vielfalt der Plasmide geführt haben. Außerdem wurden integrierte Plasmide im Genom von *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus tokodaii* gefunden, welche vermutlich durch eine sequenzspezifische Integrase eingefügt wurden (Peng *et al.*, 2000). Die Replikationsursprünge der pRN1-Plasmide konnten bis jetzt nicht eindeutig identifiziert werden und es konnten bisher auch noch keine experimentellen Hinweise auf den Replikationsmechanismus gewonnen werden.



**Abbildung 1-2: Plasmidkarte von pRN1. Die in der pRN-Familie konservierten offenen Leseraster sind dunkelgrau dargestellt, der variable Anteil von pRN1 weiß. Die Bereiche, welche in allen pRN-Plasmiden konserviert sind, sind grau gekennzeichnet. Die Karte wurde entnommen aus Berkner *et al.*, 2007.**

In dieser Arbeit wurde pRN1 als Modell für die pRN-Plasmide eingehender untersucht. Dieses Plasmid ist 5350 bp lang und enthält zusätzlich zu den drei konservierten offenen Leserastern drei weitere nicht-konservierte (*orf72*, *orf90a*, *orf90b*), deren Funktion unklar ist (Abbildung 1-2). Die Produkte der drei konservierten Leseraster konnten bereits in *E. coli* exprimiert und charakterisiert werden (siehe unten). Es gelang außerdem auf Basis von pRN1 *E. coli*-*Sulfolobus*-Shuttlevektoren zu konstruieren. Bei der Konstruktion dieser Vektoren zeigte sich, dass die Unterbrechung von *orf56* und *orf904* nicht toleriert wird, da diese Plasmide nicht repliziert werden. Dieser Bereich ist also essentiell für die Replikation von pRN1 (Berkner *et al.*, 2007).

### 1.3.1. ORF56 und ORF80

Das Protein ORF56 wurde in *E. coli* exprimiert und charakterisiert. Das Protein ist 6,5 kDa schwer und bindet sequenzspezifisch als Tetramer doppelsträngige DNA (Lipps *et al.*, 2001b). Die Analyse der Sequenz von pRN1 zeigte, dass das offene Leseraster von ORF56 teilweise mit dem von ORF904 überlappt und das beide offene Leseraster sich einen Promotor teilen (Keeling *et al.*, 1996). ORF56 bindet an einen *inverted repeat* innerhalb dieses Promotors (Lipps *et al.*, 2001b) und es wurde vermutet, dass es damit die Transkription von ORF904 reguliert, wie auf Grund seiner Sequenzähnlichkeiten mit dem bakteriellen Transkriptionsrepressor CopG vorhergesagt worden war. Die Transkriptionsanalyse von pRN1 bestätigte dann, dass *orf56* und *orf904* als Co-Transkript transkribiert werden und dass ORF56 die Transkription an seinem Promotor reprimiert (Berkner & Lipps, 2007).

ORF80 wurde ebenfalls in *E. coli* exprimiert und ist ein 9,5 kDa schweres Protein. Das Protein bindet ebenfalls sequenzspezifisch an doppelsträngige DNA. Die Sequenz TTAA-N<sub>7</sub>-TTAA, welche von dem Protein gebunden wird, befindet sich zweimal mit einer Distanz von 60 bp oberhalb des *orf80* (Lipps *et al.*, 2001a; Lysetska *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass *orf80* bzw. die vergleichbaren Leseraster in den pRN-Plasmiden am stärksten konserviert sind, führte zu der Annahme, dass diese Proteine eine wichtige Rolle in der Replikation dieser Plasmide spielen. Die Konstruktion der pRN1-basierten Shuttlevektoren führte allerdings zu der Erkenntnis, dass dieses Protein nicht essentiell für die Replikation von pRN1 ist (Berkner *et al.*, 2007). Wenn *orf80* deletiert ist, nimmt allerdings die Langzeitstabilität des Plasmids in *Sulfolobus* ab. Die genaue Funktion dieses Proteins ist derzeit unklar. Die Transkriptionsanalyse von pRN1 zeigte außerdem, dass der Startpunkt der Translation dieses Proteins vermutlich vier Aminosäuren abwärts von der vermuteten Stelle ist. Dies bedeutet, dass das *in vivo* gebildete Protein nur 76 Aminosäuren lang ist (Berkner *et al.*, 2007).

### 1.3.2. ORF904

ORF904 wurde ebenfalls in *E. coli* exprimiert und ist 106 kDa schwer. Untersuchungen des Proteins ergaben, dass es überraschenderweise über eine Vielfalt an Aktivitäten verfügt. So konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist mit Nukleotiden auf einzelsträngiger DNA einen Primer zu formen, also Primaseaktivität besitzt, es kann außerdem als DNA-Polymerase einen existierenden Primer verlängern. Die Polymeraseaktivität ist allerdings relativ niedrig und das Enzym verfügt nicht über eine Exonukleaseaktivität, welche die Korrektur der kopierten DNA ermöglichen würde. Als drittes besitzt ORF904 eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität (Lipps *et al.*, 2003). Sequenzvergleiche ergaben außerdem, dass der C-terminale Teil des Enzyms (Aminosäuren ≈550 - 800) Ähnlichkeit zu Helikasen der Superfamilie 3 hat, welcher

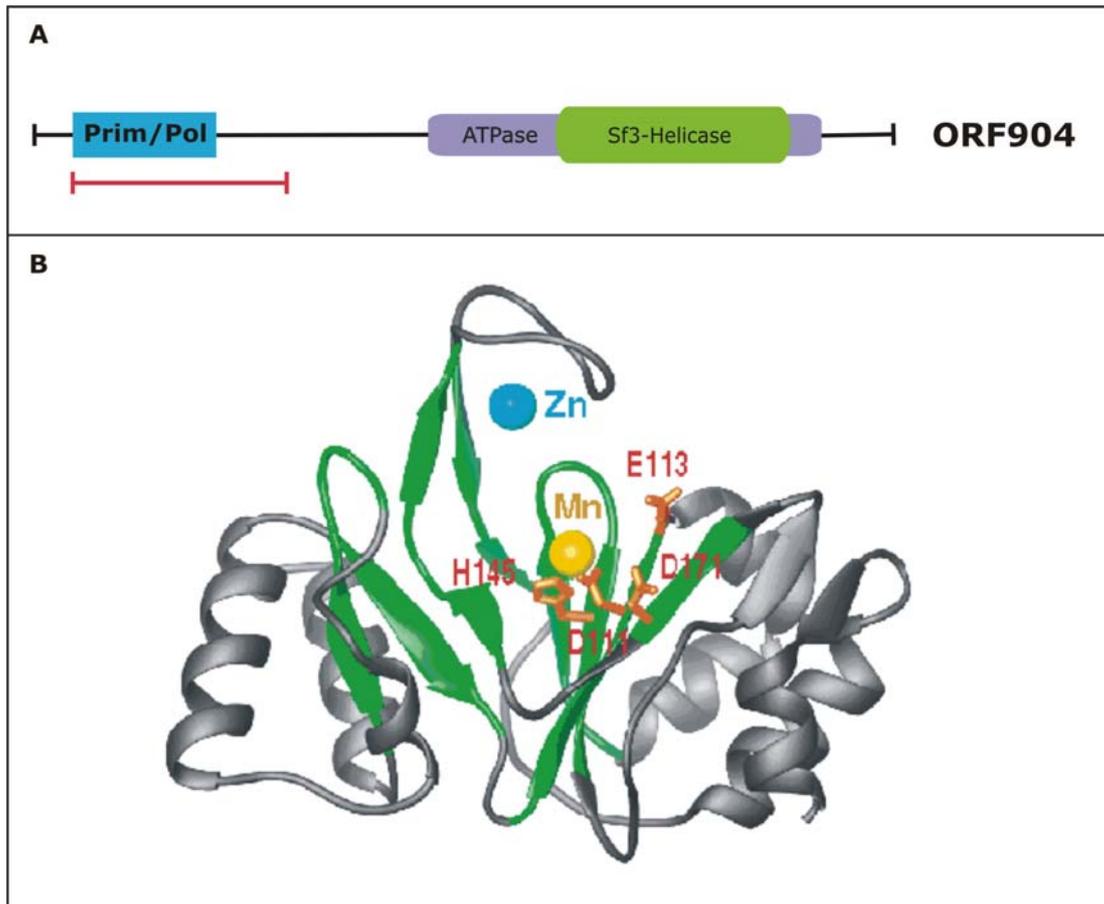
einige virale Helikasen, wie z.B. die des SV 40 angehören. Es konnte auch gezeigt werden, dass dieses Enzym Helikaseaktivität besitzt und in Anwesenheit von DNA und einem ATP-Analogen konnten Hexamere nachgewiesen werden (Sanchez & Lipps, unveröff.).

Die Primase- und Polymeraseaktivität ist im N-terminalen Teil des Proteins lokalisiert. Dieser Bereich hat nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen außerhalb der pRN-Familie. Es konnten nur schwache Ähnlichkeiten im Bereich der Aminosäuren  $\approx 50 - 200$  zu einigen uncharakterisierten Bakteriophagenproteinen festgestellt werden (Lipps *et al.*, 2003). Diese neuidentifizierte Domäne wurde auf Grund der festgestellten Primase- und Polymeraseaktivität Prim/Pol-Domäne getauft. Der zentrale Bereich von ORF904 zwischen der Prim/Pol- und der ATPase/Helikasedomäne hat keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Sequenzen.

Die Prim/Pol-Domäne wurde eingehender untersucht. Der von ORF904 synthetisierte Primer ist 8 nt lang. Die Primaseaktivität von ORF904 ist ungewöhnlich, da dieses Enzym Desoxynukleotide für die Bildung des Primers bevorzugt (Lipps *et al.*, 2003). Vergleichbares wurde auch für andere archaeale Primasen beobachtet, wie beispielsweise die Primasen von *Pyrococcus furiosus* und *Sulfolobus solfataricus* (Bocquier *et al.*, 2001; Lao-Sirieix & Bell, 2004). Die minimale Prim/Pol-Domäne (Aminosäuren 40 - 255), welche in der Lage ist die Verlängerung existierender DNA zu katalysieren, vermag nicht, einen Primer zu synthetisieren. Dazu wird zusätzlich ein Teil des uncharakterisierten, zentralen Teil des Enzyms benötigt, so dass die minimale Domäne, welche Primaseaktivität besitzt, die Aminosäuren 40 - 370 umfasst (Lipps *et al.*, 2004).

Um die bisher uncharakterisierte Prim/Pol-Domäne genauer zu untersuchen, wurde die Röntgenkristallstruktur der Aminosäuren 40 - 255, der minimal aktiven Polymerasedomäne, bestimmt (Abbildung 1-3). Dabei zeigte sich, dass die gesamte Struktur keinem bekannten Enzym ähnelt. Es konnte das aktive Zentrum der Primase- und Polymeraseaktivität identifiziert werden, dieses wird von den Aminosäure D111, E113 und D171 gebildet. Für D111 konnte eine Bindung eines Manganions im Kristall gezeigt werden, vermutlich sind die anderen essentiellen Reste ebenfalls an der Koordinierung dieser katalytischen Metallionen beteiligt. Des Weiteren konnte in der Kristallstruktur ein fest gebundenes Zinkion detektiert werden, welches von den Aminosäuren C191, C196, H141 und H188 in einer Schlaufe in der Nähe des aktiven Zentrums koordiniert wird. In allen anderen Primasen konnten ebenfalls ähnliche Zinkbindemotive identifiziert werden (Frick & Richardson, 2001) und für die Primase von T7 wurde eine Beteiligung dieses Motivs an der Bindung von DNA gezeigt (Kusakabe *et al.*, 1999). Daher lässt sich vermuten, dass in ORF904 die Schlaufe mit dem Zinkion ebenfalls an der Primersynthese bzw. der Bindung der DNA beteiligt ist. Die Kristallstruktur der Prim/Poldomäne hat eine ausschließlich strukturelle Ähnlichkeit der zentralen  $\beta$ -Faltblätter zu einem vergleichbaren Bereich der katalytischen Untereinheit

der Primase des Archaeons *Pyrococcus furiosus*, anhand der Sequenzen lässt sich keine Verbindung zwischen den beiden Enzymen erkennen (Lipps *et al.*, 2004).



**Abbildung 1-3: Domänenorganisation und Struktur von ORF904. (A) Schematische Darstellung von ORF904, zwei große Domänen konnten identifiziert werden, eine N-terminale Primase/Polymerasedomäne und eine C-terminale ATPase/Helikasedomäne. (B) Röntgenkristallstruktur der Prim/Pol-Domäne von ORF904 (rot gekennzeichnet in A). Die Aminosäuren sind des aktiven Zentrums sind eingezeichnet, ebenso wie das katalytische Manganion (gelb) sowie das Zinkion (blau). Grün dargestellt ist die strukturell konservierte Region, welche Ähnlichkeiten mit anderen archaealen Primasen aufweist (aus Lipps *et al.*, 2004).**

Der genauer Startpunkt der Translation von ORF904 ist nicht bekannt. Es zeigte sich, dass die ersten 40 Aminosäuren keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben (Lipps *et al.*, 2004). Es gibt eine Reihe möglicher Startcodons am Beginn des ursprünglich annotierten offenen Leserasters, welche das Enzym um bis zu 24 Aminosäuren am N-Terminus verkürzen würden. Die Transkriptionsanalyse von pRN1 zeigte, dass *orf904* nur als Co-Transkript mit *orf56* transkribiert wird, daraus ist also der Translationsstart nicht ersichtlich. Die Menge an intrazellulärem ORF904 wird vermutlich mit durch den Transkriptionsregulator des Co-Transkripts, ORF56, kontrolliert. Des weiteren wurde in *Sulfolobus* ein *antisense* Transkript identifiziert, welches gegenläufig zum ersten Drittel des *orf56/orf904* Co-Transkripts synthetisiert wird und möglicherweise ebenfalls die Translation dieses Transkripts reguliert (Berkner & Lipps, 2007).

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Primaseaktivität von ORF904 eingehender untersucht.

## 1.4. Primasen

Primasen sind allgemein Enzyme, welche in der Lage sind, komplementär zu einzelsträngiger DNA kurze RNA-Stücke zu synthetisieren. Diese Enzyme werden in allen zellulären Systemen und von einem Großteil der kleineren genetischen Elemente während der Replikation verwendet, da DNA-Polymerasen generell nicht in der Lage sind, DNA *de novo* zu synthetisieren, sondern immer auf das Vorhandensein einer 3' Hydroxylgruppe angewiesen sind. Die meisten Primasen lassen sich anhand ihrer Struktur in eine von zwei großen Gruppen einordnen, die bakteriellen und die archaeo-eukaryotischen Primasesuperfamilien. Diese Gruppenzugehörigkeit kann als ein weiterer Hinweis darauf angesehen werden, dass Teile der archaealen Replikationssysteme den eukaryotischen näher stehen als den bakteriellen.

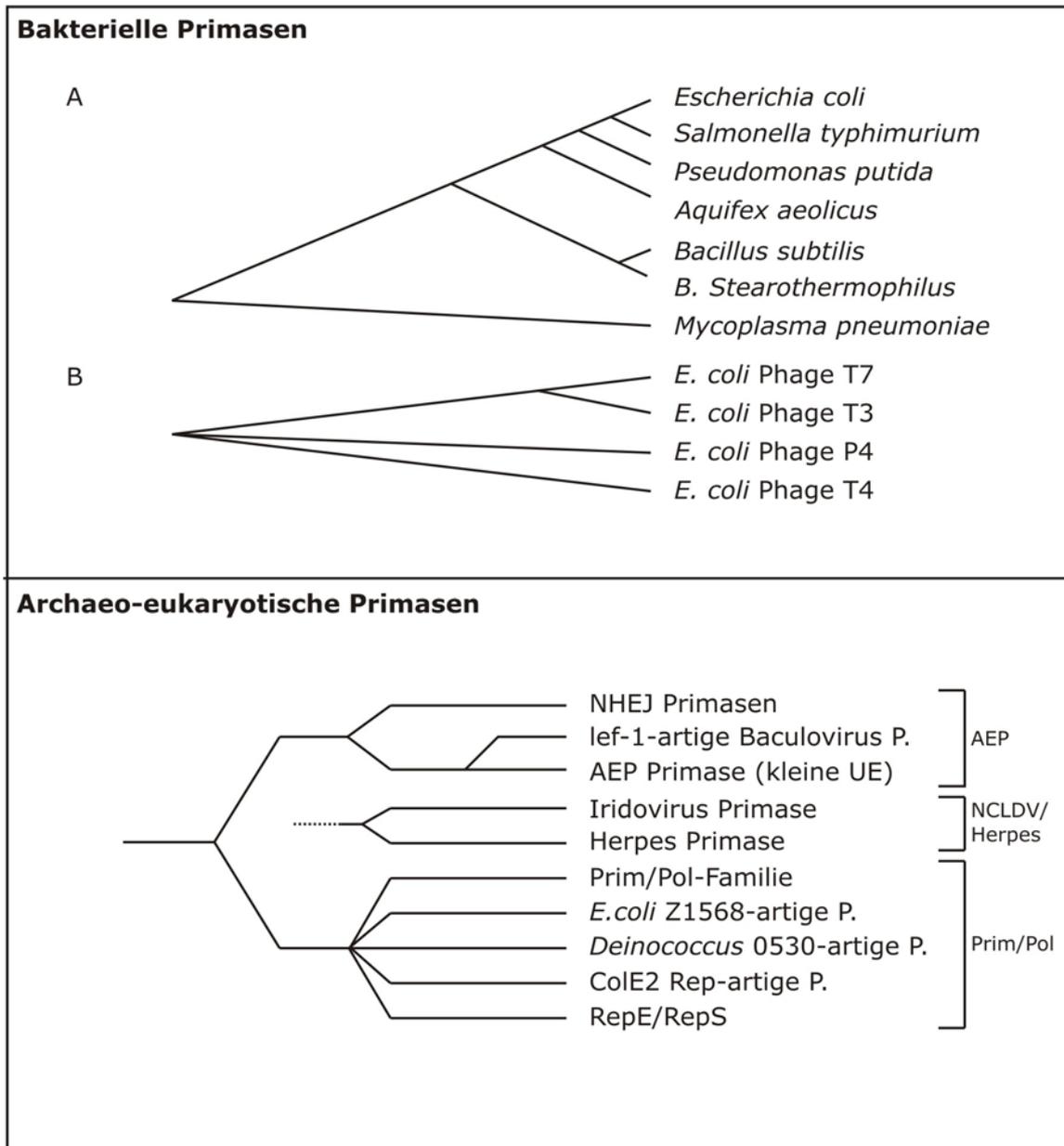
Die bakteriellen Primasen sind durch das Vorhandensein einer Toprim-Domäne in der katalytischen Untereinheit gekennzeichnet. Diese Sequenz kommt auch noch bei Topoisomerasen Ia und II, einigen archaealen und bakteriellen Nukleasen und bakteriellen DNA-Reparaturproteinen vor (Aravind *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass sich diese Enzyme alle aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelten, welcher DNA-modifizierende Eigenschaften besaß. Ein weiteres Kennzeichen der bakteriellen zellulären Primasen ist, dass sie während der Replikation mit der replikativen Helikase (DnaB) assoziiert sind (Aravind *et al.*, 1998; Ilyina *et al.*, 1992). Die bestuntersuchte bakterielle Primase ist DnaG aus *E. coli*, dieses Protein besteht aus drei Untereinheiten, einer N-terminalen Zinkbindedomäne, einer RNA-Polymerasedomäne und einer C-terminalen Domäne, welche die Interaktion mit der Helikase vermittelt (Frick & Richardson, 2001). Die Strukturen der einzelnen Untereinheiten der bakteriellen Primase konnten gelöst werden, es liegen allerdings bis jetzt wenige Informationen über das Zusammenspiel der Untereinheiten vor. Die Zinkbindedomäne ist vermutlich für die Bindung der DNA verantwortlich (Pan & Wigley, 2000; Kato *et al.*, 2003), während in der katalytischen Untereinheit das aktive Zentrum, welches Metallionen komplexiert, identifiziert werden konnte (Keck *et al.*, 2000a).

Die archaeo-eukaryotischen Primasen enthalten dagegen ein anderes Strukturmotiv, ein abgewandeltes RNA-Erkennungsmotiv (RRM, *RNA recognition motif*; Iyer *et al.*, 2005). Andere Proteine, welche ebenfalls ein RRM enthalten, sind beispielweise einige virale RNA-abhängige RNA-Polymerasen, reverse Transkriptasen und einige DNA-Polymerasen der Familien A, B und Y. Diese Primasesuperfamilie wurde, ausgehend von der Struktur des RRM, in drei Stämme unterteilt. Zu den sogenannten eigentlichen archaeo-eukaryotischen Primasen werden die kleine Primaseuntereinheit der Archaea und

Eukaryoten gezählt, sowie Primasen von Baculoviren und mit bakteriellen DNA-Reparaturprozessen (NHEJ - *non-homologous end joining*) assoziierte Primasen. Der Prim/Pol-Stamm umfasst neben den Replikationsproteinen crenarchaealer Plasmide weitere Primasen aus Bakterien und von bakteriellen Plasmiden und Bakteriophagen. Einen dritten Stamm bilden die Primasen eukaryotischer Viren, wie Herpes simplex (Iyer *et al.*, 2005). Die Zugehörigkeit einiger Primasen zu den beiden Superfamilien ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

Des Weiteren sind die zellulären eukaryotischen Primasen durch eine Assoziation mit der DNA-Polymerase  $\alpha$  gekennzeichnet. Diese Polymerase-Primase in Eukaryoten setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die größte davon (165 – 180 kDa) stellt die DNA-Polymerase  $\alpha$  und eine weitere (70 – 79 kDa) ist vermutlich an der Regulation der Polymeraseaktivität beteiligt. Die beiden kleinsten Untereinheiten stellen die Primaseaktivität, die katalytische Untereinheit (48 – 50 kDa) synthetisiert die Primer, während die zweite (58 kDa) ebenfalls zur Stabilisierung und Regulation der Aktivität der katalytischen Untereinheit dient. Es wird vermutet, dass die Polymerase-Primase kurze Primer synthetisiert, welche dann durch den enthaltenen Polymeraseanteil auf ca. 30 nt verlängert werden, woraufhin die Synthese an die replikative DNA-Polymerase übergeben wird (Grabowski & Kelman, 2003; Kornberg & Baker, 1992). In Archaea konnten Homologe zu den beiden eukaryotischen Primaseuntereinheiten identifiziert werden, z.B. in *Pyrococcus furiosus* oder *Sulfolobus solfataricus* (Augustin *et al.*, 2001; Lao-Sirieix & Bell, 2004). Es ist allerdings nicht bekannt, ob die archaealen Primasen ebenfalls mit einer DNA-Polymerase assoziiert sind.

Es sind bis jetzt noch keine Strukturen eukaryotischer Primasen bekannt, es konnten allerdings die Kristallstrukturen einiger archaealer Primasen aufgeklärt werden. Es wurden die Struktur der kleinen, katalytischen Untereinheit der Primase von *Pyrococcus furiosus* (Augustin *et al.*, 2001) und die eines Komplexes aus der kleinen Untereinheit und eines Teils der großen Untereinheit der Primase aus *Sulfolobus solfataricus* (Lao-Sirieix *et al.*, 2005a) gelöst. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten des katalytischen Teils der Prim/Pol-Domäne von ORF904 zu anderen archaealen Primasen wird diese ebenfalls zu den archaeo-eukaryotischen Primasen gezählt. Die Prim/Pol-Domäne kann in weiteren Enzymen identifiziert werden, darunter einer Reihe weiterer kleiner genetischer Elemente, wie Bakteriophagen und Viren. In diesen könnte sie ebenfalls in die Replikation involviert sein.



**Abbildung 1-4: Bakterielle und archaeo-eukaryotische Primasesuperfamilien. Oben- Klassifizierung der bakteriellen Primasen auf Grund von Sequenzvergleichen, A: Zelluläre Primasen B: Primasen von Bakteriophagen, nach Frick & Richardson, 2001. Unten- Klassifizierung der archaeo-eukaryotischen Primasen nach Strukturvergleichen, nach Iyer *et al.*, 2005. NHEJ – *non-homologous end joining*, NCLDV – *nucleocytoplasmic large DNA viruses*.**

Es wird vermutet, dass der Reaktionsmechanismus aller Nukleotid-Polymerasen gleich ist (Steitz *et al.*, 1994; Steitz, 1998). Dabei werden zwei divalente katalytische Metallionen durch zwei saure Aminosäurereste im aktiven Zentrum positioniert und stabilisieren den Übergangszustand bei der Knüpfung der Phosphoesterbindung (dargestellt am Beispiel der T7 DNA-Polymerase in Abbildung 1-5). Dieser Mechanismus wurde auf Grund der Struktur von Kokristallen von DNA-Polymerasen mit DNA-Substrat und Nukleotiden postuliert, es wird aber vermutet, dass Primasen die Katalyse ebenso durchführen, da die



1995). Die Primase-Subdomänen liegen den Helikasen auf, interagieren aber nicht sichtbar miteinander (Toth *et al.*, 2003). Allerdings können sich zwei verschiedene inaktive Primase-Untereinheiten auch gegenseitig komplementieren und die Aktivität des Enzymkomplexes wieder herstellen (Lee & Richardson, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Primaseuntereinheit auch allein in der Lage ist, Primer zu synthetisieren (Frick *et al.*, 1998), wie es auch für ORF904 beobachtet wurde. Außerdem ist die Primase-Untereinheit an der Übertragung des Primers auf die T7 DNA-Polymerase beteiligt (Kato *et al.*, 2004).

Ein weitere, gut untersuchte Fusion einer bakteriellen Primase-Subdomäne mit anderen Aktivitäten ist das P4  $\alpha$  Protein, welches vom Phagen P4 kodiert wird. In diesem Protein ist die Primase mit einer Helikase der Superfamilie III fusioniert und zusätzlich ist dieses Protein in der Lage Sequenzen des Replikationsursprungs spezifisch zu binden (Ziegelin *et al.*, 1993).

Die archaeo-eukaryotischen Primasen können ebenfalls fusioniert mit anderen Enzymen vorkommen, wie im Falle von ORF904 und anderen Replikationsproteinen der pRN-Plasmide. So wurden weitere Fusionen mit MCM-ähnlichen Helikasen oder Homologen zu bakteriellen reversen Transkriptasen in in bakteriellen Genomen integrierten Bakteriophagen gefunden (Lao-Sirieix *et al.*, 2005b). Dies weist darauf hin, dass sich die Verbindung von Primase und Helikase für die Replikation kleiner genetischer Elemente mehrfach etabliert hat. Außerdem zeigt sich, dass die archaeo-eukaryotischen Primasen weiter verbreitet sind als vorher vermutet und vielfach in der Replikation von Phagen und Viren eingesetzt werden.

Des Weiteren sind archaeo-eukaryotische Primasen im Genom oft in direkter Nachbarschaft zu weiteren an der Replikation beteiligten Proteinen gefunden worden, was ebenfalls auf eine funktionelle Interaktion hinweist. Diese Assoziationen liegen mit Helikasen (vom MCM-Typ oder Superfamilie II oder III), DNA-Polymerasen, PCNA oder reverser Transkriptase vor (Iyer *et al.*, 2005). Es ist möglich, dass die Fusionsproteine aus derart assoziierten Proteinen entstanden.

## **1.6. Vorläufiges Modell der Replikation von pRN1**

Ausgehend von den bekannten Funktionen der von pRN1 kodierten Proteine wurde ein Modell aufgestellt, wie die Replikation koordiniert werden könnte (Lipps, 2004). ORF56, welches vermutlich als Transkriptionsrepressor agiert, bindet den Promotor des *orf56/orf904* Co-Transkripts und reguliert dadurch die Expression der beiden Proteine negativ. Auf Grund seiner Helikaseaktivität ist ORF904 möglicherweise in der Lage den plasmidalen Replikationsursprung zu entwinden und dort die Primer zu synthetisieren. Die eigentliche Replikation der DNA kann von ORF904 oder einer zellulären DNA-Polymerase vorgenommen werden. Somit könnten ein Großteil der Reaktionen, die für die Replikation von pRN1 notwendig sind von dem plasmideigenen Protein ORF904

katalysiert werden und die Abhängigkeit von der Replikationsmaschinerie des Wirtes wäre gering. Die genaue Funktion von ORF80 ist dabei unklar, die starke Konservierung dieses Proteins innerhalb der pRN-Plasmide weist allerdings daraufhin, dass es möglicherweise ebenfalls an der Erhaltung des Plasmids beteiligt ist.

## 1.7. Problemstellung

Die vorhandenen Informationen lassen pRN1 als ein geeignetes Modell für die Replikation von crenarchaealen Plasmiden erscheinen. ORF904 steht dabei im Mittelpunkt des Interesses, da es vermutlich ein zentrales Element dieser Replikation ist. Die bisherigen Untersuchungen hatten ergeben, dass dieses Protein über Primase- und Polymeraseaktivität verfügt sowie ATPase- und Helikaseaktivität besitzt. Die eingehendere Analyse dieser Aktivitäten würde es ermöglichen, weitere Aussagen über die genaue Funktionsweise des Enzyms zu machen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Primaseaktivität von ORF904 genauer untersucht. Es war bekannt, dass dieses Enzym in der Lage ist, kurze Primer auf einzelsträngiger M13-Virus DNA zu synthetisieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Protein für die Primersynthese sowohl Ribonukleotide als auch Desoxynukleotide benötigt. Allerdings war mit dem vorhandenen M13-Virus Templat keine eingehende Analyse der Primersynthese möglich. Dazu mussten definierte, kurze Substrate gefunden werden, welche eine vergleichbare Primersynthese durch ORF904 ermöglichen. Mit Hilfe dieser Substrate sollten dann die Anforderungen von ORF904 an das DNA-Templat und die Nukleotide einfacher untersucht werden können.

Die Kristallstruktur der minimal für die Verlängerung von DNA notwendigen Prim/Pol-Domäne von ORF904 konnte bereits aufgeklärt werden. Dieser Teil des Proteins ist allerdings nicht ausreichend, um einen Primer zu synthetisieren. In dieser Arbeit sollte versucht werden, die Röntgenkristallstruktur eines größeren Abschnitts des Proteins und möglicherweise in Komplex mit einem DNA-Templat zu ermitteln. Dies würde weitere Aussagen über die Interaktionen des Proteins mit der DNA und den Reaktionsmechanismus zu ermöglichen.

Um die Einzelheiten der Replikation des Plasmids pRN1 genauer untersuchen zu können sollte außerdem versucht werden, ein *in vitro* Replikationssystem für pRN1 aufzubauen. Für diese Untersuchung ist die Auflösung des Replikationsursprungs sowie die Identifikation von zellulären Proteinen, welche an der Replikation beteiligt sind, nötig.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Bakterienstämme

*E. coli* XL1-Blue  
Stratagene, La Jolla, USA  
(*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ.M15 Tn10* (Tetr)])

*E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS  
Novagen, Darmstadt  
(F' *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pLysSRARE2 (Cam<sup>R</sup>))

#### 2.1.2. Nährmedien

2xYT: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton

Psi: 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 5 g/l MgSO<sub>4</sub>, pH7.6 mit NaOH

Alle Medien wurden vor der Verwendung 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Nährböden wurden vor dem Autoklavieren noch 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium je nach Bedarf Antibiotika zugesetzt (Chloramphenicol 34 mg/l, Kanamycin 50 mg/l oder Ampicillin 100 mg/l).

#### 2.1.3. Plasmide

pET28c  
Novagen, Darmstadt

pET33b-PCNA1  
pET30a-PCNA2  
pET30a-PCNA3  
pET30a-MCM  
Vektoren zur Expression  
C-terminal his-getaggtter Proteine,  
zur Verfügung gestellt von  
Stephen Bell, Oxford

pBluescript II(SK+)  
pGEM-T  
Stratagene, La Jolla, USA  
promega, Madison

#### 2.1.4. Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide, die für Klonierungen oder als Substrat in Primaseexperimenten oder für die Fluoreszenzanisotropie eingesetzt wurden, wurden in entsalzter Qualität von metabion (Martinsried) bezogen. Die Oligodesoxynukleotide, welche für die Kokristallisation eingesetzt wurden, wurden HPLC-gereinigt von biomers (Ulm) bezogen. Die Sequenzen aller verwendeten Oligodesoxynukleotide sind im Anhang (9.1) aufgeführt.

## 2.1.5. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.1.5.1. Chromatographiematerialien

Talon™	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankr.
StrepTactin	IBA, Göttingen
Ni-NTA	Qiagen, Hilden
Fractogel EMD-SO <sup>3-</sup>	Merck, Darmstadt

### 2.1.5.2. Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dGTP	
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP	

### 2.1.5.3. Allgemeine Chemikalien

IPTG, Kanamycin, Chloramphenicol, Ampicillin, Hefeextrakt, Pepton	Gerbu, Gaiberg
Acrylamid/N,N- Metylen-bis-acrylamid (29:1) NEEO & GTQ Agarose, Agar Ribonukleotide, Harnstoff, Rotiphorese Sequenziersystem p-Nitrotetrazoliumblausulfat APS, TEMED, Tris, Tricin, EDTA, Borat, Essigsäure, 2-Mercaptoethanol, Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth, Karlsruhe
ADP, AMP, $\alpha$ , $\beta$ -Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat $\beta$ , $\gamma$ -Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat Adenosin-5'-( $\beta$ , $\gamma$ -Imido)Triphosphat Adenosin-5' [ $\gamma$ -thio]Triphosphat	Sigma-Aldrich, München
Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix	Roche, Mannheim

Alle weiteren nicht erwähnten Chemikalien wurden in der Qualität p.A. von Merck, Darmstadt bezogen. Alle Puffer etc. wurden mit doppeldestilliertem Wasser hergestellt.

**2.1.5.4. Enzyme**

<i>Taq</i> Polymerase, Desoxynukleotide	peqlab, Erlangen
<i>Pfu</i> Polymerase	promega, Madison, USA
Restriktionsendonukleasen, Ligase, Klenow $exo^-$ , T4-Polynukleotidkinase, Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNase A, DNase II,	Roth, Karlsruhe

**2.1.5.5. Längenstandards**

10 bp Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
SmartLadder DNA Standard	Eurogentec, Köln
Peqqold Protein Marker I	peqlab, Erlangen

**2.1.5.6. Antikörper**

StrepTactin-Alkalische Phosphatase	IBA, Göttingen
$\alpha$ -His6-Antikörper aus Maus	Sigma-Aldrich, München
Kaninchen- $\alpha$ -Maus-alkalische Phosphatase Konjugat	Jackson Immunoresearch, West Grove, USA

**2.1.5.7. Verbrauchsmaterialien**

Spin columns	mobitec, Göttingen
Ultrafiltrationssäulen	Sartorius, Göttingen
Immulon 2HB Elisa 96 well Platten	Millipore, Schwalbach
Nitrocellulosemembran, 0,2 $\mu$ m	Thermo, Waltham, USA
Ultrazentrifugationsröhrchen (Polyallomer)	Kisker Biotech, Steinfurt Herolab, Wiesloch

**2.1.5.8. Software**

VectorNTI Suite7	InforMax, USA
Origin 7.5	Originlab, USA
KC4	BioTek, USA
UCSF Chimera	Pettersen <i>et al.</i> , 2004
blastn	NCBI

Mfold	Zuker, 2003
UNAFold	Markham & Zuker, 2005
Multalin	Corpet, 1988

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Elektrophoretische Methoden

#### 2.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

<b>1x TBE-Puffer:</b>	90 mM Tris/Borat, pH 8.3, 1 mM EDTA
<b>1x TAE-Puffer:</b>	40 mM Tris/AcOH, pH 7.5, 1 mM EDTA
<b>Probenpuffer:</b>	75% (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Xylencyanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA

Die analytische und präparative Auftrennung großer DNA-Fragmente erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurde für analytische Gele TBE als Laufpuffer und NEEO Agarose (Roth, Karlsruhe) verwendet, für präparative Gele zur Isolierung von DNA-Fragmenten TAE-Puffer und GTQ Agarose (ebenfalls Roth). In Abhängigkeit von den darzustellenden Fragmentgrößen wurden 0,7 – 2 prozentige Lösungen von Agarose in Laufpuffer angesetzt und durch Erhitzen in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach dem Abkühlen der Lösungen auf ca. 45 °C wurden die Gele in der Gellaufkammer gegossen.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Ethidiumbromid-Färbung (2.2.2.1).

Für die Präparation von DNA-Fragmenten wurden die jeweiligen Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert wie in 2.2.5.4.

#### 2.2.1.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<b>Probenpuffer:</b>	80% (v/v) Formamid, 10 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Xylencyanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
----------------------	---

Zur Darstellung kurzer (2 – 200 nt), radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurden Polyacrylamidgele, welche Harnstoff zur Denaturierung der DNA bzw. der DNA-Protein-Komplexe enthielten, verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde das Sequenziersystem von Roth (Karlsruhe) benutzt, welches zur Herstellung der Acrylamid-Lösungen in 1xTBE und 8,3 M Harnstoff diente. Die Stärke der Gele variierte von 6 bis 20 % Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente.

Die Gele wurden entweder in einer *mighty small*-Apparatur (100 x 160 mm, Hoefer) oder in einer größeren Apparatur (200 x 200 mm) bereit. Mit der größeren Apparatur konnten Gele mit einer Dicke von 1,2 mm oder mit 0,3 mm hergestellt werden. Die dünneren Gele wurden eingesetzt, wenn eine erhöhte Auflösung gewünscht war. Nach

der Polymerisation wurde eine 30-minütige Vorelektrophorese bei 15 bzw. 50 W und 50°C durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/3 Volumen des Probenpuffers versetzt und 5 min bei 50°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 15/50 W und 50 °C für ca. 1 h durchgeführt. Als Standard wurde ein [5'-<sup>32</sup>P]-markierter 10 bp-Standard (Invitrogen, siehe 2.2.7.3) verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele autoradiographisch im InstantImager 2024 analysiert (2.2.2.2).

### 2.2.1.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schaeffer und von Jagow

<b>3x Gelpuffer:</b>	3 M Tris/HCl, pH 8.45, 0,3 % (w/v) SDS
<b>Kathodenpuffer:</b>	0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8.25
<b>Anodenpuffer:</b>	0,2 M Tris/HCl, pH 8.9
<b>2x Probenpuffer:</b>	0,1 M Tris/HCl, pH 6.8, 8 % (w/v) SDS, 24 % (v/v) Glycerin, 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,05 % (v/v) Coomassie 250 G

Die SDS-Gelelektrophorese nach Schaeffer und von Jagow (1987) wurde zur Analyse von Proteinen nach der Aufreinigung und während der *pull-down* Experimente durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 9 bis 15-prozentiges Acrylamid/Bisacrylamid-Trenngel (in Abhängigkeit von der erwarteten Proteingröße) und ein 6-prozentiges Sammelgel verwendet. Die Proben wurden mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese erfolgte in einer *mighty small*-Apparatur (Hoefer, San Francisco, USA) bei 10 W für ca. 1 h.

### 2.2.1.4. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

<b>4xTrenngelpuffer:</b>	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8, 0,4 % (w/v) SDS
<b>4xSammelgelpuffer:</b>	0,5 M Tris/HCl, pH 6.8, 0,4 % (w/v) SDS
<b>Laufpuffer:</b>	25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 0,2 % (w/v) SDS
<b>2xProbenpuffer:</b>	100 mM Tris/HCl, pH 6.8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 200 mM DTT, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Es wurden auch SDS-Gelelektrophoresen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dafür enthielt das Trenngel 15 % Acrylamid/Bisacrylamid, das Sammelgel enthielt 8%. Die Proben wurden ebenfalls vor dem Auftragen mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde in einer Mini Protean-Apparatur (Biorad, München) durchgeführt.

## 2.2.2. Detektion von Nukleinsäuren in Gelen

### 2.2.2.1. Detektion unmarkierter DNA mittels Ethidiumbromid

Doppelsträngige DNA kann durch die Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Dabei fluoresziert das Ethidiumbromid bei einer Anregungswellenlänge von ca. 320 nm orange. Die Agarosegele wurden für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt und im Anschluss für einige Sekunden in ddH<sub>2</sub>O entfärbt. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA erfolgte auf einem Transilluminator (Gel iX, Intas, Göttingen). Eine semiquantitative Abschätzung der DNA-Konzentration ist dabei über einen Vergleich mit dem verwendeten Standard möglich.

### 2.2.2.2. Detektion radioaktiv markierter DNA

Radioaktiv markierte DNA wurde mit einem Flächenzählgerät (InstantImager 2024, Canberra Packard, Schwadorf, Österreich) visualisiert. Dazu wurden die Gele entweder direkt nach der Elektrophorese „nass“ gemessen (nach Abschätzung der vorhandenen Radioaktivität) oder wenn eine längere Messung nötig war, wurden die Gele mit einer Geltrocknungsapparatur (Biorad, München) getrocknet und dann gemessen. Die Messung und Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte mit der Geräte-Software.

## 2.2.3. Detektion von Proteinen in Gelen

### 2.2.3.1. Coomassie-Färbung

**Färbelösung:** 10 % Essigsäure, 30 % Ethanol, 0,2 % Coomassie 250 G

**Entfärber:** 10 % Essigsäure, 30 % Ethanol

Die Coomassie-Färbung ist geeignet, höhere Mengen an Protein (>100 ng) sichtbar zu machen.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für etwa eine Stunde unter Schütteln in der Färbelösung gefärbt und im Anschluss daran unter mehrmaligem Wechseln mit dem Entfärber entfärbt, bis der Gelhintergrund fast farblos war. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Flachbettscanner oder mit einem Geldokumentationssystem (Gel iX, Intas, Göttingen).

### 2.2.3.2. Silberfärbung

Fixierer I: 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig

Fixierer II: 30 % (v/v) Ethanol

Sensitizer: 1 % (w/v) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

Färbelösung: 1 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>

Entwickler: 3 % (w/v) CaCO<sub>3</sub>, 0,05 (v/v) % Formaldehyd

Stopplösung: 1 % (v/v) Essigsäure

Um geringe Mengen an Protein sichtbar zu machen, die unterhalb der Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegen, wurde eine abgewandelte Methode des PageSilver-Kits (Fermentas, St. Leon-Rot) zur Silberfärbung von Proteinen genutzt. Dabei wurden die Proteine durch jeweils 10 min Schwenken in Fixierer 1 und 2 fixiert. Nach zweimaligem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel dann 1 min in Sensitizer inkubiert. Daraufhin wurde der Waschschrift wiederholt und eine 20-minütige Inkubation in Färbelösung folgte. Nach kurzem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurde Entwickler dazugegeben und unter Schwenken inkubiert, bis Banden deutlich sichtbar waren. Dann wurde die Entwicklung der Färbung durch einen Transfer in Stopplösung unterbrochen. Die Dokumentation der Gele erfolgte wie in 2.2.3.1.

## 2.2.4. Westernblot

Westernblots wurden durchgeführt um geringe Proteinmengen nachzuweisen oder um die Anwesenheit von Tags an exprimierten Proteinen (z.B. nach Klonierungen) zu verifizieren.

### 2.2.4.1. Transfer mittels *semi-dry blotting*

**Transferpuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8.6, 192 mM Glycin

Proteine aus ungefärbten Schaegger/v. Jagow-Gelen wurden durch *semi-dry blotting* auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Blotting wurde in einer Apparatur (HEP-1 Panther, Owl Separation Systems) mit geringer Puffermenge (= *semi dry*) durchgeführt. Dazu wurden 4 Filterpapiere, das Gel und die Membran kurz in Transferpuffer äquilibriert und dann in der Reihenfolge 2 Filterpapiere – Gel – Membran – 2 Filterpapiere auf der Blotapparatur angeordnet. Das Blotting erfolgte bei 1-2 mA/cm<sup>2</sup> für mindestens 1,5 h.

### 2.2.4.2. Antikörperreaktion

**PBS-T:** 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 0,02 % Tween 20

**AP-Puffer:** 100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Apparatur entnommen und zum Blockieren aller noch vorhandenen Proteinbindungsstellen mit 5 % (w/v) Milchpulver bzw. BSA in PBS-T inkubiert. BSA wurde für den Nachweis des strep-Tags verwendet, da dieses System empfindlich für in der Milch enthaltenes Biotin ist. Danach wurde die Membran mit PBS-T gewaschen und dann mit dem ersten Antikörper (1:3000 in PBS-T) für mindestens 2 h inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen. Falls ein zweiter Antikörper verwendet wurde, wurde die Membran wieder mit diesem (auch 1:3000 in PBS-T) für 1 h inkubiert und dann gewaschen. Im Falle des strep-Tag-Antikörpers war die Inkubation mit einem zweiten Antikörper nicht notwendig, da der Primärantikörper mit alkalischer Phosphatase

konjugiert war. Zur Farbentwicklung wurde die Membran in 20 ml AP-Puffer transferiert und es wurden jeweils 100 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (15 mg/ml in DMF) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (30 mg/ml in 70% (v/v) DMF) zugegeben. Die Membran wurde bis zur Entwicklung gut sichtbarer Banden lichtgeschützt inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Waschen mit H<sub>2</sub>O unterbunden und die Membran getrocknet.

## **2.2.5. Isolierung und Reinigung von DNA**

### **2.2.5.1. Phenol/Chloroform-Präparation von Plasmid-DNA**

**TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA

Zur schnellen Kontrolle neuer Plasmide nach Ligationen wurde eine Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA angewendet. Dazu wurden nach der Transformation einer Ligation (2.2.6.4) in *E. coli* XL1Blue 3-6 Klone in jeweils 750 µl 2xYT plus jeweilige Antibiotika bei 37°C über Nacht geschüttelt. Dann wurden 500 µl der Kultur entnommen und mit 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gut gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben dann bei 15000 g 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation (13000 g, 10 min) wurden die Pellets mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurden sie in 20 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A resuspendiert und mit Restriktionsenzymen geschnitten.

### **2.2.5.2. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Kit**

Für die Isolierung größerer Mengen doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde das peqGold Plasmid Miniprep Kit II (peqlab, Erlangen) verwendet. Die DNA wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamatrix adsorbiert und mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert. Dafür wurden 4 bis 10 ml einer *E. coli*-Kultur eingesetzt und nach Vorschrift des Herstellers bearbeitet.

### **2.2.5.3. Isolierung einzelsträngiger Plasmid-DNA**

Um einzelsträngige Plasmid-DNA zu gewinnen wurde der pBluescriptII-Vektor (Stratagene) benutzt. Die gewünschte DNA-Sequenz kann in die *multiple cloning site* dieses Vektors kloniert werden und nach Infektion der *E. coli* - Kultur mit einem Helferphagen wird verpackte, einzelsträngige DNA sekretiert.

Zuerst wurden 100 ml LB-Medium mit einem Klon *E. coli* XL1Blue mit dem gewünschten Plasmid inokuliert. Außerdem wurden 10<sup>8</sup> pfu/ml (MOI≈10) des Helferphagen R408 (promega, Madison, USA) zugegeben. Daraufhin erfolgte eine ca. 20-stündige Inkubation bei 37°C bis die Kultur die stationäre Phase erreicht hatte. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 4°C) abgetrennt und die einzelsträngige pBluescript-DNA aus dem Überstand mittels 20% (w/v) PEG8000, 2,5 M NaCl präzipitiert. Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgte die Fällung der DNA über Nacht bei 4°C. Danach

wurde die DNA bei 21500 g 20 min pelletiert und in 0,3 M NaOAc, pH 6.0 gelöst. Abschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-Fällung um vorhandene Verunreinigungen zu entfernen, danach konnte die DNA in 500 µl TE-Puffer (2.2.5.1) gelöst und verwendet werden.

#### 2.2.5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde das peqGold Gel Extraction Kit (peqlab, Erlangen) verwendet. Dieses Kit nutzt ebenfalls die Adsorption von DNA an eine Silikamatrix. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

#### 2.2.5.5. Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentration isolierter DNA wurde photometrisch bestimmt. Die DNA wurde passend verdünnt und in einer Quarzküvette in einem Beckman DU640-Spektrophotometer vermessen. Es wurden die Extinktionen bei 260 und 280 nm aufgenommen. Die Konzentrationen wurde aus  $OD_{260}$  nach folgenden Formeln für einzelsträngige (Gleichung 1) und doppelsträngige (Gleichung 2) DNA berechnet

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33 \mu\text{g} / \text{ml} \quad \text{Gleichung 1}$$

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \quad \text{Gleichung 2}$$

Zusätzlich wurde das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  berechnet, welches sich idealerweise 2,0 nähern sollte.

### 2.2.6. Klonierung

#### 2.2.6.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 2.2.6.1.1. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

**Reaktionspuffer:** 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA

Bei der PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde ein Gemisch aus *Taq* und *Pfu* DNA-Polymerase (25:1 U:U) verwendet, da die 3'-5' Exonuclease-Aktivität der *Pfu* Polymerase zu einer verminderten Fehleranzahl gegenüber der *Taq* Polymerase allein führt. Die verwendeten Primer sind im Anhang (9.1) aufgeführt. In einem Reaktionsansatz von 10 µl wurden 1 x Reaktionspuffer, 200 µM dNTPs, 1 µM je Primer und ca. 2 ng Templat-DNA eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur der Primer (meist zwischen 45 und 60°C) und die Verlängerungszeit der Primer (ca. 1 min/kb Templat) wurden für jede PCR individuell optimiert. Nach der PCR wurde die amplifizierte DNA nach Bedarf über ein Agarose-Gel gereinigt (siehe 2.2.5.4).

Alle mit PCR erstellten DNA-Fragmente durch Sequenzierung durch die Firma MWG (Ebersberg) auf Korrektheit überprüft.

#### **2.2.6.1.2. Quikchange-Mutagenese**

Die Quikchange-Mutagenese wurde in Anlehnung an das Protokoll von Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt, um spezifische Mutationen in das Gen von ORF904 einzuführen. Dabei wurden 2 komplementäre Primer eingesetzt, welche beide die gewünschte Veränderung der Sequenz enthielten (siehe Anhang, Tabelle 9-8). Zur Verlängerung der Primer wurde in diesem Falle nur *Pfu* Polymerase verwendet, welche im Reaktionspuffer von 2.2.6.1 eingesetzt wurde. Für diese Art der Amplifikation wurde eine höhere Menge DNA-Matrize (ca. 25 ng) und eine verminderte Anzahl von Zyklen (16) benutzt, was zusammen mit der Verwendung der *Pfu* Polymerase die Anzahl der Fehler im Produkt verringert.

Nach der PCR wurde der parentale DNA-Strang mittels *DpnI* Restriktion zerstört, da *DpnI* seine Erkennungssequenz GATC nur schneidet wenn das Adenosin methyliert vorliegt. Die verbleibende neusynthetisierte DNA wurde in *E. coli* XL1Blue transformiert (2.2.8).

#### **2.2.6.2. Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Alle Restriktionen wurden nach Angaben des Herstellers in den jeweils vorgesehenen Puffern und evtl. mit Zugabe von BSA angesetzt. Die Inkubationstemperatur war abhängig vom verwendeten Enzym, allerdings betrug sie in den meisten Fällen 37°C. Im Falle von präparativen Restriktionen wurden die DNA-Fragmente im Anschluss mit Hilfe eines Agarose-Gels aufgetrennt und das gewünschte Fragment isoliert und aufgereinigt (2.2.5.4).

#### **2.2.6.3. Enzymatische Dephosphorylierung**

**AP-Puffer:** 50 mM Bis-Tris-Propan/HCl, pH 6.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>

Für die Dephosphorylierung des 5'-Terminus von DNA-Molekülen wurde antarktische Phosphatase (AP, New England Biolabs) eingesetzt. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Nach der Dephosphorylierung wurde das Enzym durch eine 15-minütige Inkubation bei 60°C inaktiviert. Plasmide wurden vor dem Einsatz in Ligationen stets dephosphoryliert, um die Möglichkeit einer Selbstligation zu verringern.

#### **2.2.6.4. Ligation**

**Ligasepuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP

Ligationen wurden mit T4 DNA Ligase in 1x Ligasepuffer durchgeführt. Alle Ligationen wurden bei ca. 15 °C für mindestens 12 h inkubiert.

### 2.2.6.5. Verwendung von Klonierungsvektoren

Zur Vereinfachung der Klonierung wurden PCR-Fragmente, welche durch Reaktionen mit *Taq*- und *Pfu*-Polymerase gewonnen wurden, im Anschluss in den Klonierungsvektor pGEM-T (promega, Madison, USA) ligiert. Dieser Vektor liegt linear vor und besitzt an beiden Enden einen einfachen T-Überhang. Da mit *Taq*-Polymerase synthetisierte PCR-Fragmente einen A-Überhang besitzen, können diese direkt in der Ligation eingesetzt werden. Dabei wurde nach den Vorschriften des Herstellers verfahren, es wurde allerdings nur 1/5 der angegebenen Plasmidmenge (10 ng) eingesetzt. Diese Plasmide konnten dann sequenziert werden und wurden weiter für die Klonierung verwendet.

### 2.2.7. Phosphorylieren und Hybridisieren von DNA

#### 2.2.7.1. Enzymatische Phosphorylierung

**T4-PNK-Puffer:** 70 mM Tris/HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT

Mit der T4 Polynukleotidkinase kann das  $\gamma$ -Phosphat von ATP auf das 5' Ende von DNA übertragen werden. Dies wurde zum einen genutzt um kommerziell synthetisierte Desoxynukleotide, welche in Ligationen eingesetzt wurden, zu phosphorylieren. Außerdem wurden Desoxynukleotide mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP radioaktiv markiert.

Die Phosphorylierung erfolgte gemäss den Angaben des Herstellers. Wenn mit „kaltem“ ATP phosphoryliert wurde, wurden 10 mM ATP zugegeben. Für die radioaktive Markierung wurden 150 bis 300 nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP eingesetzt.

#### 2.2.7.2. Hybridisierung

Die Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers. Dabei wurden die Proben zuerst auf 95°C erhitzt um alle Sekundärstrukturen zu lösen. Danach erfolgte ein langsames Abkühlen (0,02 K/s) bis auf 4 °C.

#### 2.2.7.3. Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Standards

Zuerst wurde der 10bp-Standard dephosphoryliert. Dafür wurden 5  $\mu$ l Standard (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) mit 1  $\mu$ l Puffer, 3,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 0,5  $\mu$ l Antarktischer Phosphatase inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 min. Danach wurde die Phosphatase 15 min bei 60°C inaktiviert. Für die radioaktive Markierung wurden dann 2  $\mu$ l des dephosphorylierten Standards mit 6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l Puffer, 0,5  $\mu$ l T4-PNK und 150 nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz mit 35  $\mu$ l denaturierendem Gelpuffer (siehe 2.2.1.2) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Auf ein Gel wurden dann 1 bis 2  $\mu$ l des Standards aufgetragen.

## 2.2.8. Transformation von *E. coli*

### 2.2.8.1. Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli* – Zellen

**TfbI:** 30 mM KOAc, pH 5.8, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 (v/v) % Glycerin

**TfbII:** 10 mM NaMOPS, pH 6.5, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* – Zellen wurden 100 ml Psi-Medium, welches für plasmidtragende Zellen mit den entsprechenden Antibiotika versehen worden war, mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Daraufhin erfolgte eine mehrstündige Inkubation bei 37°C und beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde das Wachstum unterbrochen und die Kultur auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen pelletiert (4000 g, 5 min, 4°C) und in 0,4 Ausgangsvolumen TfbI resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen in 0,04 Ausgangsvolumen TfbII aufgenommen, in Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem N<sub>2</sub> gefroren. Die Aufbewahrung bis zur Verwendung erfolgte dann bei -70°C.

### 2.2.8.2. Transformation

Um Plasmide oder Ligations-/Quikchange-Produkte zu transformieren, wurden die RbCl-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder ca. 1-10 ng Plasmid-DNA oder der gesamte Ligations- bzw. Quikchange-Ansatz zugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde ein 45-sekündiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 10 Volumen LB-Medium gemischt und zur Regeneration 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 g, 2 min) und auf 2xYT-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

## 2.2.9. Expression und Aufreinigung von Proteinen

Für die Überexpression aller Proteine wurde der Stamm *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS benutzt. Dieser Stamm wurde für die Expression nichtbakterieller Proteine entwickelt, er enthält ein Plasmid (pLysSRARE) welches tRNAs für folgende, in *E. coli* selten genutzte Codons bereitstellt: AUA (*ileX*), AGG, AGA (beide *argU*), CUA (*leuW*), CCC (*proL*), CGG (*proK*), und GGA (*glyT*). Außerdem ist er ein Lysogen des Phagen λDE3 und enthält somit eine Kopie der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das ermöglicht eine Nutzung des pET-Systems (Studier & Moffatt, 1986) zur Überexpression von Proteinen nach Induktion mit IPTG. Überdies befindet sich auf dem pLysSRARE-Plasmid das Gen für T7-Lysozym, welches die Transkription der T7-RNA-Polymerase vor der Induktion verringert, was sich günstig auf die Expression großer oder toxischer Proteine auswirkt.

### 2.2.9.1. Test auf Überexpression

Um die Überexpression der verschiedenen Proteine zu überprüfen, wurden jeweils drei Klone von *E. coli* Rosetta2plys, transformiert mit dem jeweiligen Plasmid, getestet. Dazu wurden Kulturen von je 750 µl angesetzt und bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,6$  bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 200 µl der Kultur abgenommen, mit 20 µl 80% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Zu den restlichen 550 µl wurde IPTG (Endkonzentration 1mM) gegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Nach 4 h wurden 100 µl jeder Kultur abzentrifugiert (15000g, 1 min, 4°C) und das Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellen wurden durch 5-minütige Inkubationen bei 95°C und im Ultraschallbad aufgeschlossen. Daraufhin wurden sie mit 20 µl SDS-Probenpuffer mit 6 M Harnstoff versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine Kultur, welche nicht induziert worden war. Die Überexpression konnte durch das Auftreten einer verstärkten Bande des entsprechenden Molekulargewichts nach der Induktion visualisiert werden. Im Falle einer Überexpression wurden die Glycerinkulturen bei -70°C gelagert und als Ausgangskultur für die folgenden Fermentationen genutzt.

### 2.2.9.2. Fermentation und Aufschluss der Zellen

Die Fermentation der Zellen erfolgte für alle Proteinvarianten von ORF904 bei Raumtemperatur ( $\approx 22^\circ\text{C}$ ), da hierbei die Menge und Qualität des exprimierten Proteins optimal waren. Bei allen anderen Proteine wurden die Zellen bei 37°C fermentiert.

Die Fermentation erfolgte in 2 l 2xYT-Medium welches mit den notwendigen Antibiotika versetzt worden war. Zur Inokulation wurden 10 ml einer über Nacht bei 37°C gewachsenen Vorkultur genutzt. Bei einer  $OD_{600} \approx 0,6$  wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach ca. 4 h (37°C) bzw. 20 h (Raumtemperatur) wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000g, 10 min, 4°C) geerntet und bei -20°C gelagert.

Für den Aufschluss wurden die Zellen in 40 ml Puffer (25 mM Na-Phosphat, pH 7.0 für Talon; 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 für Ni/NTA) aufgetaut und resuspendiert. Um einen möglichen proteolytischen Abbau des Proteins zu verhindern, wurden ½ Tablette Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix (Roche, Mannheim) oder 1 mM PMSF zugesetzt und alle folgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt.

Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Sonifier B15, Branson) in mehreren Zyklen (5 min Ultraschall, Stufe 4, 40% Leistung und 5 min Abkühlphase) aufgeschlossen. Danach wurden die größeren Zellbruchstücke durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4°C) pelletiert.

### 2.2.9.3. Affinitätschromatographie

#### 2.2.9.3.1. Talon

**Puffer A:** 25 mM Na-Phosphat, pH 7.0, 300 mM NaCl, (evtl. 2 – 6 M Harnstoff), 6 mM Imidazol

**Puffer B:** 25 mM Na-Phosphat, pH 7.0, 300 mM NaCl, (evtl. 2 - 6 M Harnstoff), 150 mM Imidazol

His-getaggte Varianten von ORF904 und ORF80 wurden in *E. coli* exprimiert und mittels IMAC mit Talon aufgereinigt. Je nach Variante und Zugänglichkeit des His-Tags wurden dabei native Puffer verwendet oder eine leichte Denaturierung des Proteins durch Zugabe von 2 M Harnstoff erreicht.

Der Rohextrakt (2.2.9.2) wurde durch Zugabe von NaCl und Imidazol (und evtl. Harnstoff) auf die Bedingungen der Chromatographie eingestellt und erneut zentrifugiert (20000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Filter passiert und auf eine mit Puffer A äquilibrierte Talon-Tropf-Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit ca. 5 - 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B, für die ersten 3 Säulenvolumen wurden Fraktionen aufgefangen und auf einem Proteingel analysiert.

#### 2.2.9.3.2. Ni-NTA

**Puffer A:** 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl

**Puffer B:** 10 mM tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazol

Die Proteine PCNA1, PCNA2, PCNA3 und MCM aus *Sulfolobus solfataricus* wurden ebenfalls heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels eines His-Tags über Ni/NTA aufgereinigt. Dazu wurde der Rohextrakt auf 150 mM NaCl eingestellt und erneut zentrifugiert (20000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde filtriert und auf eine Ni/NTA-Tropf-Säule aufgetragen, welche vorher mit Puffer A äquilibriert worden war. Danach wurde die Säule mit 5 - 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Elution mit 3 Säulenvolumen Puffer B, welcher fraktioniert aufgefangen und mittels eines Proteingels analysiert wurde.

#### 2.2.9.3.3. StrepTactin

**Puffer A:** 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

**Puffer B:** 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin

Die Aufreinigung von bestimmten ORF904-Varianten mittels strep-Tag (am jeweils anderen Terminus des Proteins) erfolgte als zweiter Schritt nach einer Aufreinigung mittels His-Tag um eine höhere Reinheit des Proteins bzw. einen höheren Anteil an Vollängenprotein zu erzielen. Dafür wurden die proteinhaltigen Fraktionen nach der

Talonsäule vereinigt und mit Puffer A 1:1 verdünnt. Das Protein wurde auf eine StrepTactin-Tropfsäule gegeben. Waschen und Elution erfolgten analog zu 2.2.9.3.1.

#### **2.2.9.4. FPLC-gestützte Kationenaustauscherchromatographie**

**Puffer A:** 25 mM Na-Phosphat, pH variabel, (1 – 6 M Harnstoff)

**Puffer B:** 25 mM Na-Phosphat, pH wie A, 1 M NaCl, (1 – 6 M Harnstoff)

Alle Varianten von ORF904 und ORF80 wurden als letzten Schritt mit einer  $\text{SO}_3^-$ -Kationenaustauscherchromatographie gereinigt und aufkonzentriert. Dabei wurde der pH-Wert der Puffer für jede Proteinvariante auf 1 pH-Einheit unter dem theoretisch ermittelten pI (bestimmt mit VectorNTI) eingestellt, um die Bindung des Proteins an die Säulenmatrix auf Grund seiner positiven Ladung zu gewährleisten. Je nach Protein wurden native oder denaturierende (durch Zugabe von Harnstoff) Bedingungen für die Chromatographie gewählt. Die Chromatographie wurde an einem FPLC-Gerät (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die proteinhaltigen Fraktionen nach der Talon- bzw. StrepTactinsäule wurden mit Puffer A 1:1 verdünnt. Die Säule mit EMD- $\text{SO}_3^-$  (Merck, Darmstadt) wurde mit 10 % Puffer B in A äquilibriert. Das Protein wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgegeben. Nach dem Waschen mit dem Auftragspuffer wurde die Säule mit einem Gradienten von 100 bis 1000 mM NaCl entwickelt. Dabei wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen und die Absorption dieser Fraktionen bei 280 nm wurde aufgezeichnet. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem Proteingel analysiert.

#### **2.2.9.5. Ultrafiltration zur Konzentrierung**

Nach der Aufreinigung wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Dazu wurden Ultrafiltrationssäulen mit einem MWCO von 10 kDa verwendet und nach Angabe des Herstellers vorgegangen. Wenn nötig wurde auch ein Pufferwechsel vorgenommen, indem die Säule am Ende des Konzentrationsvorganges dreimal erneut mit Puffer (25 mM Na-Phosphat pH7.0, 300 mM NaCl) gespült wurde.

#### **2.2.9.6. Dialyse der Proteine**

**Dialysepuffer:** 25 mM Na-Phosphat, pH 7.0, 40 % (v/v) Glycerin, 100 mM NaCl, 0,01 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Proteine nach der Aufreinigung gegen einen glycerinhaltigen Puffer dialysiert. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.2.9.7. Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationen aller Proteine wurde spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proteine verdünnt und es wurde mit einem Beckman DU640-Spektrophotometer ein

UV-Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Als Referenz diente der entsprechende Puffer. Aus der Absorption bei 280 nm konnte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration berechnet werden. Die notwendigen Extinktionskoeffizienten wurden für jedes Protein mit dem Programm VectorNTI ermittelt. Da die Mehrheit der untersuchten Proteine mit DNA interagieren kann, wurde außerdem das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt. Wenn dieses unterhalb von 0,6 lag, wurden die Proteine ohne weitere Aufreinigung verwendet.

### 2.2.9.8. Gelfiltration

**Gelfiltrationspuffer:** 10 mM HEPES, pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT

Zur Vorbereitung für die Kristallisation wurde die Deletionsmutante N40-C370 zusätzlich mittels Gelfiltration gereinigt. Dafür wurden ca. 100 mg aufkonzentriertes Protein in ca. 0,7 ml auf eine Superose6-Säule (96,5 ml Gesamtvolumen) aufgetragen. Die Chromatographie wurde an einem ÄKTapurifier (GE, Freiburg) durchgeführt, die Flussrate betrug 0,7 ml/min. Es wurden von 1,2 Säulenvolumen Fraktionen gesammelt und auf einem Proteingel analysiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden dann mittels Ultrafiltration erneut aufkonzentriert.

### 2.2.10. Untersuchungen der Proteinaktivität

#### 2.2.10.1. Primaseaktivitätsassay

**ORF904-Reaktionspuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$

**Denaturierender Ladepuffer:** 80% (v/v) Formamid, 10 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Xylencyanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Die Primaseaktivität wurde untersucht indem in (gewöhnlich) 10  $\mu$ l Reaktionsvolumen 0,4  $\mu$ M Protein mit 4  $\mu$ M DNA-Substrat und Nukleotiden inkubiert wurden. Die Sequenzen der als Substrate verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 9-1 aufgeführt. Wenn ein radioaktiv markiertes Desoxynukleotid verwendet wurde, wurden 1 mM Ribonukleotide und 10  $\mu$ M Desoxynukleotide (dNTPs) mit 0,6 nM des radioaktiv markierten Desoxynukleotids supplementiert zugegeben. Wenn ein Ribonukleotid radioaktiv markiert war, wurden 10  $\mu$ M „kalte“ Desoxynukleotide und 6 nM des radioaktiv markierten Ribonukleotids zugegeben.

Die Inkubation der Reaktionen erfolgte für 10 min bei 50°C. Danach wurden sie durch Zugabe von 4  $\mu$ l des Ladepuffers gestoppt und 5 min auf 95°C erhitzt. Dann wurden 6  $\mu$ l jeder Reaktion auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel gegeben.

Um den Einfluss des Einzelstrangbindepoteins aus *Sulfolobus solfataricus* auf die Primaseaktivität zu untersuchen, wurden 4  $\mu$ M ein 20 nt langen DNA-Substrat mit 16, 12, 8 und 4  $\mu$ M RPA einige Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert, um eine theoretische Bedeckung der DNA von 100, 75, 50 und 25 % mit RPA zu erreichen (das

Einzelstrangbindeprotein wurde von Dr. Dong Han bereitgestellt). Danach wurden die Substrate wie beschrieben in Primaseaktivitätsassays eingesetzt.

#### **2.2.10.2. Polymeraseaktivitätsassay**

Die Bestimmung der Polymeraseaktivität erfolgte analog zu 2.2.10.1. Als Substrat wurden hybridisierte Oligodesoxynukleotide, bestehend aus einem 42 nt langen Templat und einem 5' radioaktiv markierten 21 nt langen Primer, verwendet (pol\_1 und pol\_2, siehe Tabelle 9-4). Durch die Zugabe von dNTPs kam es dann zur Verlängerung des Primers durch das Enzym.

Für die Reaktionen wurden 5 nM des Substrats in ORF904-Reaktionspuffer mit 0,4  $\mu$ M Protein gemischt. Dann wurden 100  $\mu$ M dNTP-Mix zugegeben und die Reaktion wurde bei 50°C für 30 min inkubiert. Danach wurde sie durch die Zugabe von 4  $\mu$ l Ladepuffer gestoppt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Zur Auswertung wurden 2  $\mu$ l auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### **2.2.10.3. Bestimmung von $K_m$ und $V_{max}$**

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ( $V_{max}$  und  $K_m$ ) für dATP, ATP und das DNA-Substrat während der Primersynthese wurde mit einem abgewandelten Primaseaktivitätsassay durchgeführt. Es wurden dafür Reaktionen angesetzt, welche 40 nM Protein enthielten, außerdem wurden 1 mM ATP, 100  $\mu$ M dNTPs mit 6 nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP und 6  $\mu$ M DNA-Substrat zugesetzt, diese Konzentrationen lagen im Sättigungsbereich für die jeweilige Substanz und wurden vorher bestimmt. Um die Enzymparameter zu bestimmen wurde jeweils die Konzentration von ATP, dATP oder dem DNA-Substrat variiert. Alle Reaktionen wurden 45 min bei 50°C inkubiert, dann zum Stoppen der Reaktion auf Eis transferiert, mit Ladepuffer versetzt und auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Danach konnte das Verhältnis von freiem zum inkorporierten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP bestimmt werden, woraus die Geschwindigkeit der Primasereaktion berechnet wurde. Diese Bestimmung wurde für jeden Parameter der Primasereaktion dreimal vorgenommen.

Mit Origin (OriginLab, Northampton, USA) wurden die Werte dann mittels nichtlinearer Regression an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst und  $V_{max}$  und  $K_m$  berechnet.

#### **2.2.10.4. Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_d$**

**Reaktionspuffer:** 12,5 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,01% Tween

Um die Affinität eines Proteins für ein Oligodesoxynukleotid zu bestimmen wurden Fluoreszenzanisotropiemessungen eingesetzt.

Wenn kleine Fluorophore in Lösung mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, kommt es auf Grund der ständigen Rotation während der Lebensdauer des angeregten Zustandes zu einer messbaren Depolarisation des emittierten Lichtes. Wenn die

Bewegungsfähigkeit des Fluorophors allerdings eingeschränkt wird, nimmt der Anteil des emittierten Lichtes, welches in der gleichen Ebene wie das Anregungslicht ist, wieder zu, die Fluoreszenz des Moleküls wird anisotrop. Die Bewegungsfähigkeit des Fluorophors wird zum Beispiel durch eine Bindung an Makromoleküle eingeschränkt. In diesem Versuch wurde ein DNA-Substrat verwendet, an dessen 3' Ende Fluorescein gebunden war. Diese Bindung an ein Oligodesoxynukleotid führte zu einer messbaren Anisotropie. Wenn nun eine Interaktion der DNA mit einem Protein stattfand, erhöhte sich diese noch einmal. Die Messung dieser Erhöhung der Anisotropie kann genutzt werden, um einen DNA-Protein-Komplex zu charakterisieren.

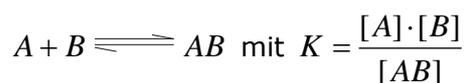
Die Anisotropie ( $r$ ) wurde bestimmt, indem die emittierte Fluoreszenz parallel ( $I_{\parallel}$ ) und senkrecht ( $I_{\perp}$ ) zum eingestrahlten Licht gemessen wurde.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

**Gleichung 3**

Die Experimente wurden in einem Spektrofluorometer LS50B (Perkin-Elmer) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 120  $\mu\text{l}$  in einer 2x10 mm großen Küvette und die Küvette wurde auf 25°C temperiert. Die Isotherme der Proteinbindung an die eingesetzte DNA wurden mittels reverser Titration bestimmt. Dafür wurden 120  $\mu\text{l}$  40 nM DNA-Substrat in Reaktionspuffer ca. 6  $\mu\text{l}$  einer hochkonzentrierten Proteinlösung (ca. 200  $\mu\text{M}$ ), welche gegen den Reaktionspuffer dialysiert worden war, zugesetzt. Dann wurde die Anisotropie dieser Lösung gemessen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration graduell erniedrigt, indem jeweils 30 % des Reaktionsgemisches entnommen und durch DNA-Substrat in Reaktionspuffer ersetzt wurden. Für die Messung der Anisotropie wurde die Probe mit 495 nm angeregt, die Emission wurde bei 526 nm gemessen. Es wurde außerdem ein Filter eingesetzt, der die Emissionsstrahlung unter 515 nm blockierte. Die Integrationszeit für jeden Messpunkt betrug 10 s, es wurden mindestens 3 Messpunkte für jede Proteinkonzentration aufgenommen.

Zur Auswertung wurden die Anisotropiewerte gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Zur Charakterisierung der Bildung des Protein-DNA-Komplexes wurde ein einfaches 1:1 Bindungsmodell angenommen:



**Gleichung 4**

In dieser Gleichung sind [A] und [B] die Konzentrationen des freien Proteins und der freien DNA und [AB] ist die Konzentration des Protein-DNA-Komplexes.

Die Anisotropie kann daraus mit folgenden Formeln berechnet werden:

$$[AB] = \frac{[A_0] + [B_0] + K - \sqrt{([A_0] + [B_0] + K)^2 - 4[A][B]}}{2} \quad \text{Gleichung 5}$$

$$r = \frac{[AB]}{[B_0]} r_{AB} + \frac{[B_0] - [AB]}{[B_0]} r_B \quad \text{Gleichung 6}$$

Dabei sind  $[A_0]$  und  $[B_0]$  die Ausgangskonzentrationen von Protein und DNA,  $r_B$  und  $r_{AB}$  die Anisotropiewerte der freien DNA und des Protein-DNA-Komplexes.

Da es allerdings bei allen Experimenten nach Bindung des Proteins zu einer Abnahme der Gesamtintensität des emittierten Lichtes kam, mussten die fraktionalen Fluoreszenzintensitäten ( $f_B$  und  $f_{AB}$ ) der freien DNA und des DNA-Proteinkomplexes berücksichtigt werden. Die Anisotropie berechnet sich damit wie folgt:

$$r = f_{AB} r_{AB} + f_B r_B \quad \text{Gleichung 7}$$

$$f_B = \frac{([B_0] - [AB])}{([B_0] - [AB]) + [AB]_s} \quad \text{Gleichung 8}$$

$$f_{AB} = \frac{[AB]_s}{([B_0] - [AB]) + [AB]_s} \quad \text{Gleichung 9}$$

Die Intensitätsänderung  $s$  ist das Verhältnis der Intensität der freien gegenüber der gebundenen DNA.

Die Datenpunkte wurde mit Origin (Originlab) durch lineare Regression an die Gleichung 5 sowie 7 bis 9 angepasst. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und die Standardabweichungen dieser Messungen sind in der graphischen Darstellung mit angegeben.

### 2.2.10.5. Terminale Transferase-Assays

Für die Untersuchung der terminalen Transferaseaktivität wurden radioaktiv markierte Oligodesoxynukleotide mit „kalten“ dNTPs verlängert. Die verwendeten Nukleotide sind in Tabelle 9-2 aufgeführt. Zuerst wurden, wie beschrieben, die Desoxynukleotide mit radioaktivem Phosphat phosphoryliert (2.2.7.1). Zur Verlängerung der DNA durch ORF904 wurden 5 nM des Oligodesoxynukleotids mit 0,4  $\mu$ M Protein und 100  $\mu$ M dNTPs in ORF904-Reaktionspuffer inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 50°C. Dann wurden 4  $\mu$ l Gelpuffer dazugegeben und die Probe für 5 min auf 95°C erhitzt. Zur

Analyse der Reaktionsprodukte wurden dann 4  $\mu\text{l}$  auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

## **2.2.11. Kristallisation und Strukturbestimmung**

### **2.2.11.1. Kristallisation von N40-C370**

Zur Kristallisation wurde das Protein nach der Gelfiltration auf ca. 200 mg/ml aufkonzentriert. Dann wurde es mit einem 1,2-fachen molaren Überschuss verschiedener Oligodesoxynukleotide und eventuell 10 mM Nukleotid (ATP oder dGTP) bei einer Endkonzentration von 60 mg/ml Protein gemischt (für die Sequenzen der eingesetzten Oligodesoxynukleotide siehe Tabelle 9-3). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 20°C wurden durch eine Zentrifugation (13000 g, 5 min, 4°C) eventuelle aufgetretene Aggregate entfernt. Für das Finden der optimalen Kristallisationsbedingungen wurden die Proteintropfen in 96well-Platten als *sitting drops* angesetzt. Das Screenen der Bedingungen erfolgte nach der Methode von Jancarik & Kim (1991). Es wurden kommerziell erhältliche Screens verwendet, welche eine Vielzahl Präzipitanten enthielten. Diese Screens wurden in 96well-Platten vorgelegt. Mit einem Roboter (HydraII, Thermo, Waltham, USA) wurden dann in jedes *well* der Kristallisationsplatte 50  $\mu\text{l}$  Kristallisationslösung und 0,5  $\mu\text{l}$  0,5 M TCEP pipettiert. Danach wurden 0,5  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit dem gleichen Volumen Kristallisationslösung im jeweiligen Proteinreservoir gemischt (ebenfalls durch den Roboter) und die Platte wurde luftdicht verschlossen. Zur Kristallisation wurden die Platten bei 20°C aufbewahrt. Die Kontrolle der Kristallisation erfolgte in regelmäßigen Abständen mit dem Stereomikroskop.

Zur Verfeinerung der in den Screens identifizierten Kristallisationsbedingungen wurden selbst hergestellte Lösungen verwendet, welche in Konzentration bzw. pH-Wert leicht von den Ausgangsbedingungen abwichen. Von diesen Lösungen wurden 0,5 ml in die *wells* einer 24well-Platte pipettiert, zusätzlich wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  1 M TCEP zugefügt. Dann wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit 1  $\mu\text{l}$  der Kristallisationslösung auf einem Schraubdeckel vermischt. Mit diesem Deckel wurde dann das *well* geschlossen. Die Inkubation erfolgte wieder bei 20°C. Nach einer Woche wurden die Kristalle geerntet und in eine Cryolösung überführt, welche sich aus der jeweiligen Kristallisationslösung mit 15 % (v/v) Glycerin zusammensetzte. Danach wurden sie schockgefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Für das *Soaken* mit Desoxynukleotiden wurden die geernteten Kristalle in die Kristallisationslösung mit 10 mM der jeweiligen DNA transferiert und kurz inkubiert.

### **2.2.11.2. Messen der Kristalle und Bestimmung der Struktur**

Die Messung der Kristalle erfolgte mit Synchrotron-Strahlung in der Strahlenquelle ID14-H1 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, Frankreich. Die

Messung der Kristalle und die Auswertung der Daten wurden von Dr. Alessandro Vannini (LMU München) durchgeführt. Die Daten wurden mit MOSFLM (Leslie, 2006) prozessiert und mit SCALA (Evans, 2006) skaliert.

Die Struktur wurde mit AMoRe (Navaza, 2001) durch *molecular replacement* mit der bereits gelösten Struktur der Deletionsmutante N40-C255 (pdb R102) gelöst. Die Verfeinerung der Datensätze wurde mit REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) durchgeführt. Zur Erstellung des Modells wurde Coot (Murshudov *et al.*, 1997; Emsley & Cowtan, 2004) benutzt. Die Abbildungen wurden mit Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

## **2.2.12. Bestimmung des Replikationsursprungs von pRN1**

### **2.2.12.1. Ligation-mediated PCR (LMPCR)**

#### **2.2.12.1.1. Gradient zur Gewinnung der Replikationsintermediate**

Um die kurzen einzelsträngigen Replikationsintermediate, welche bei der Replikation von pRN1 entstehen, anzureichern, wurde eine Ultrazentrifugation über einen alkalischen Saccharosegradienten durchgeführt.

Die Zellen von *Sulfolobus islandicus*, welche die beiden Plasmide pRN1 und pRN2 enthielten, wurden von Dr. Silvia Berkner bereitgestellt. Diese Zellen wurden in der exponentiellen Phase ihres Wachstums geerntet, um sicherzustellen, dass die Replikationsaktivität der Zellen auf dem Höhepunkt war. Es wurden für jeden Gradienten 0,1 bis 0,2 g Zellen (Feuchtgewicht) eingesetzt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von ca. 300 µl 0,2 M NaOH lysiert und die enthaltene DNA wurde dadurch denaturiert. Danach wurden die lysierten Zellen zentrifugiert (14000 g, 2 min, 4°C) und der Überstand wurde auf einen Saccharosegradienten aufgegeben. Die linearen Saccharosegradienten (13 ml) bestanden aus 5-20 % (w/v) Saccharose in 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA und wurden mit einem Gradientenmixer linear in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben.

Als Standard wurden parallel 3 PCR-Fragmente hergestellt, welche ca. 200, 600 und 800 bp lang waren (jeweils 20 µl). Diese wurden gemischt und mit einem gleichen Volumen 0,2 M NaOH denaturiert und ebenfalls auf einen Saccharosegradienten aufgegeben. Die Gradienten wurden dann ultrazentrifugiert (150000g, 18 h, 10°C).

Im Anschluss wurden die Gradienten geerntet, dabei wurden vom unteren Ende Fraktionen von ≈300 µl aufgefangen. Die DNA in diesen Fraktionen wurden dann durch die Zugabe von jeweils 1000 µl Ethanol präzipitiert. Um die DNA zu pelletieren wurden die Proben 10 min bei 4°C und 14000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Pellets einmal mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurden die Pellets in 20 µl TE-Puffer (siehe 2.2.5.1) aufgenommen. Die Fraktionen des Standardgradienten wurden im Anschluss auf einem Agarosegel analysiert. Für die LM-

PCR wurden dann die entsprechenden Fraktionen des anderen Gradienten eingesetzt in denen Fragmente <800 bp erwartet wurden.

#### **2.2.12.1.2. LM-PCR**

Die Sequenzen der Oligodesoxynukleotide welche zur Herstellung des Linkers und für die LM-PCR eingesetzt wurden, sind in Tabelle 9-5 aufgeführt. Die Desoxynukleotide für den Linker wurden phosphoryliert und hybridisiert (2.2.7). Für die Verlängerung des ersten Primers wurden Reaktionen angesetzt, welche PCR-Reaktionen entsprachen (2.2.6.1). In 10 µl Reaktionen wurden PCR-Reaktionspuffer mit 1,5 µM des jeweiligen Primers, 1,2 µl der Fraktionen des Gradienten und 0,3 µl Pfu-Polymerase (1 U) angesetzt. Danach erfolgte die Verlängerung des Primers im Thermocycler. Zuerst wurde die DNA 3 min bei 95°C denaturiert, danach erfolgte die Hybridisierung des Primers für 30 min bei 50°C und zuletzt eine Verlängerung bei 68°C für 10 min.

Für die Ligation mit dem Linker wurden den PCR Reaktionen 2 µl Ligasepuffer, 0,5 µl Ligase, 2 µl 10 mM ATP, 1,3 µl 50 µM hybridisierter Linker und 4,3 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 16°C für 12 h. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 3 µl 3 M Na-Acetat und 100 µl Ethanol präzipitiert. Nach der Zentrifugation (14000g, 10 min, 4°C) wurde den Pellets 14 µl PCR-Reaktionspuffer, jeweils 1 µl des Ausgangs- und des Linkerprimers sowie 3,8 µl H<sub>2</sub>O und 0,2 µl Taq-Polymerase (1 U) zugegeben. Die Amplifizierung der DNA erfolgte im Thermocycler. Es wurden dabei 35 Zyklen durchgeführt, die Hybridisierung der Primer erfolgte bei 50°C für 1 min 15 s und die Elongation für 3 min bei 72°C. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel analysiert.

Wenn amplifizierte Produkte auftraten, wurden diese in den pGEM-T Klonierungsvektor ligiert und dann sequenziert (2.2.6.5).

#### **2.2.12.2. Bestimmung des Startpunkts auf einzelsträngigem Plasmid**

Für dieses Experiment wurde zuerst ein Primer durch ORF904 auf einzelsträngiger Plasmid-DNA synthetisiert. Dafür wurden 5 µg der jeweiligen Plasmid-DNA in ORF904-Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 0,4 µM Protein, 1 mM rNTPs und 10 µM dNTPs ohne dATP sowie 0,6 nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 50°C. Im Anschluss wurden die Proben kurz abgekühlt, dann wurden 1 mM dNTPs und 2,5 U Klenow exo<sup>-</sup>-Polymerase zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Danach wurde die DNA durch die Zugabe von 1 ml Ethanol präzipitiert und pelletiert (14000 g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die Restriktionsanalyse wurden jeweils 5 µl dieser Lösung mit dem entsprechenden Puffer und Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei der optimalen Temperatur des jeweiligen Enzyms. Danach wurden 4 µl denaturierender Gelpuffer zugegeben und die Proben wurden für 5 min auf 95°C

erhitzt. Die anschließende Analyse der Proben erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel.

### **2.2.12.3. Primaseaktivität mit putativem Replikationsursprung**

#### **2.2.12.3.1. Herstellung eines DNA-freien Proteinextrakts**

**Lyse-Puffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

Zur Herstellung eines *Sulfolobus*-Proteinextraktes wurden Zellen von *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 verwendet, welche von Dr. Silvia Berkner bereitgestellt wurden. Der Rohextrakt wurde hergestellt wie von Hüdepohl (1990) beschrieben; es wurden ≈0,2 g Zellpellet (Feuchtgewicht) in 0,5 ml Lyse-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 0,1 % (v/v) Triton X-100 bei 0°C für 30 min lysiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 14000g und 4°C für 10 min um Zellbestandteile zu pelletieren. Da sich im Überstand noch DNA befand, wurden 1 mg/ml DNase II zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Diese DNase wurde abschließend durch Erhitzen des Proteinextraktes auf 85°C für 10 min inaktiviert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden dem Rohextrakt 20 % (v/v) Glycerin zugesetzt.

#### **2.2.12.3.2. Aktivitätsassay mit Replikationsursprung**

Die Sequenz des vermuteten Replikationsursprungs wurde mittels PCR amplifiziert. Ebenfalls amplifiziert wurde eine Kontrollregion aus pRN1 welche auch ≈200 bp lang war (Sequenz aller Primer siehe Tabelle 9-6). Die DNA wurde aus den PCR-Reaktionen mittels peqGold Gel Extraction Kit (2.2.5.4) aufgereinigt und auf ≈4 μM doppelsträngige DNA konzentriert. Ein Teil der so gewonnen DNA wurde denaturiert, indem sie für 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt wurde.

Die Primaseaktivitätsassays wurden angesetzt wie in 2.2.10.1, in 10 μl Reaktionen wurden 0,4 μM Protein mit 0,8 μM des DNA-Substrats, 1 mM rNTPs und 10 μM dNTPS mit 0,6 nM [<sup>32</sup>P]dATP inkubiert. Diese Reaktionen wurden mit der doppelsträngigen und der denaturierten DNA parallel durchgeführt. Danach wurden 4 μl denaturierender Gelpuffer zugegeben und die Proben wurden für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Analyse der Proben erfolgte auf einem denaturierende Polyacrylamidgel.

Außerdem wurden der Einfluss des DNA-freien Proteinextraktes (2.2.12.3.1) und von *Sulfolobus solfataricus* Einzelstrangbindeprotein (RPA) auf die Primaseaktivität untersucht. Dafür wurden die DNA-Substrate wie beschrieben (2.2.10.1) mit den Proteinen vorinkubiert. Es wurden 1 μl des Rohextrakts bzw. 15 μM RPA zu 0,8 μM und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden diese Substrate in den beschriebenen Primaseaktivitätsassays eingesetzt.

## 2.2.13. Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen

### 2.2.13.1. Dot Blot

**PBS:** 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5

Für die Durchführung des Dot-Blots wurden alle eingesetzten Proteine auf 7,5 µg/ml in PBS verdünnt. Zum Auftragen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde ein Dot-Blotter (Roth, Karlsruhe) verwendet. Es wurden jeweils drei *wells* für jedes Protein mit 100 µl der Lösung befüllt und dann ein Vakuum angelegt. Zur Kontrolle wurden außerdem drei *wells* ausschließlich mit PBS befüllt. Danach wurde die Membran mit 5 % (w/v) BSA in PBS-T für 30 min blockiert. Nachdem das überschüssige BSA mit PBS-T abgewaschen worden war, wurde eine Inkubation mit 15 µg des interagierenden Proteins in 5 ml PBS-T für 2 h bei Raumtemperatur schüttelnd durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen. Für die Inkubation mit dem Antikörper wurde die StrepTactin-Alkalische Phosphatase 1:3000 in PBS-T verdünnt und die Membran darin für 2 h inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte wie für den Westernblot beschrieben (2.2.4). Zur Kontrolle wurde eine weitere Membran identisch behandelt, es wurde allerdings die Inkubation mit dem interagierenden Protein ausgelassen.

### 2.2.13.2. Plattenbasierter Interaktionsassay

Für diesen Assay wurden von allen Proteinen Verdünnungsreihen von 20 bis 0,3 µg/ml in PBS hergestellt. Jeweils 50 µl dieser Lösungen wurden in ein *well* der Mikrotiterplatte gegeben, für jede Verdünnung jedes Proteins wurden drei *wells* verwendet. Als Kontrolle wurden jeweils drei *wells* mit 5 % (w/v) BSA in PBS befüllt. Zum Binden des Proteins an die Oberfläche wurden die Platten abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die *wells* zweimal mit jeweils 100 µl PBS-T gewaschen und mit je 100 µl 5 % (w/v) BSA in PBS zum Blockieren der freien Proteinbindungsstellen befüllt. Die Inkubation mit BSA erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur bevor erneut zweimal mit 100 µl PBS-T gewaschen wurde. Im Anschluss wurden dann die interagierenden Proteine auf 94 nM in PBS verdünnt und jeweils 50 µl in die einzelnen *wells* gegeben. Außerdem wurden, falls erforderlich, 1 mM ATP oder 1 µM eines Oligodesoxynukleotids dem interagierenden Protein zugegeben (die Sequenz des verwendeten Oligodesoxynukleotids ist in Tabelle 9-7 aufgeführt). Danach wurden die Platten erneut abgedeckt über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde erneut fünfmal mit 100 µl PBS-T gewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit 1:5000 StrepTactin-Alkalische Phosphatase in PBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Alle *wells* wurden nochmals fünfmal mit jeweils 100 µl PBS-T gewaschen, dann wurden 100 µl 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in PBS dazugegeben. Die Inkubation mit dieser Detektionslösung erfolgte für ≈12 bis 14 h bei

Raumtemperatur. Die  $OD_{405}$  wurde einmal  $\approx 2$  h nach Zugabe der Detektionslösung und dann am Ende der Inkubationszeit gemessen. Die Messung erfolgte mit einem Mikrotiterplattenlesegerät  $\mu$ Quant und der dazugehörigen Software KC4 (Biotek Instruments, Winooski, USA). Zur Auswertung wurde die zuletzt gemessene Extinktion verwendet.

### **2.2.13.3. Pull-down Assay**

Für den *pull-down* Assay wurden je 100  $\mu$ g der strep-getaggten ORF904-Variante und des untersuchten Proteins in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu$ l in PBS gemischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Für die Kontrollen wurden von beiden Proteinen außerdem separate entsprechende Verdünnungen in PBS hergestellt. Drei Spincolumns wurden mit jeweils 75  $\mu$ l StrepTactin-Säulenmaterial befüllt und mit 2 ml PBS-T gewaschen. Dann wurden die Proteinlösungen 30 min mit StrepTactin inkubiert. Im Anschluss wurden die Säulchen mit 3 ml PBS-T gewaschen. Die Elutionen wurden durchgeführt mit jeweils 150  $\mu$ l 0,5 M NaCl in PBS, zweimal 1 M NaCl in PBS, zweimal 2,5 mM Desthiobition in PBS und 0,5 % (w/v) SDS in PBS. Danach wurden die Proteine in den Elutionsfraktionen durch Zugabe von 900  $\mu$ l Ethanol und 12 h Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (15000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt, getrocknet und in 20  $\mu$ l denaturierendem Probenpuffer (Schaegger/Jagow-Probenpuffer mit 6 M Harnstoff) gelöst. Danach wurden die Elutionsfraktionen auf einem SDS-Proteingel (2.2.1.3) analysiert.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Aktivitäten der Prim/Pol-Domäne

Das Replikationsprotein ORF904 des Plasmids pRN1 verfügt über DNA-Polymerase- und Primaseaktivität (Lipps *et al.*, 2003). Es konnte durch die Analyse verschiedener Mutanten gezeigt werden, dass diese Aktivitäten von einem aktiven Zentrum katalysiert werden (Lipps *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde versucht, verschiedene Aspekte dieser Aktivitäten, vor allem der Primaseaktivität, genauer zu charakterisieren.

#### 3.1.1. Charakterisierung der Primaseaktivität

##### 3.1.1.1. Die Primase ist sequenzspezifisch

###### 3.1.1.1.1. Hinweise auf Sequenzabhängigkeit

Primasen sind spezialisierte Enzyme, welche in der Lage sind mit einzelsträngiger DNA als Matrize kurze Oligoribonukleotide *de novo* zu synthetisieren, welche dann von den DNA-Polymerasen verlängert werden, um die Replikation zu ermöglichen.

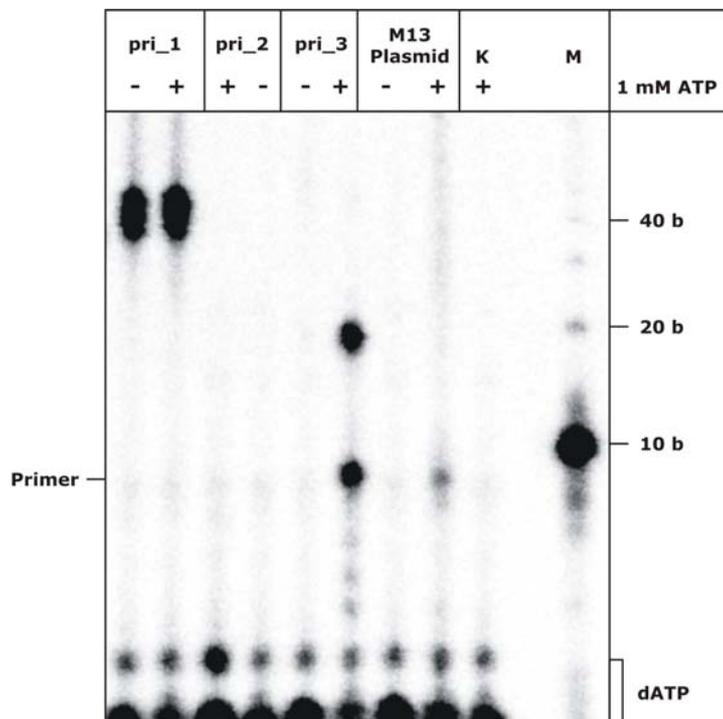
Über die Primaseaktivität von ORF904 war bereits bekannt, dass das Enzym mit einzelsträngiger, zirkulärer Virus-DNA (verwendet wurde der Phage M13) in der Lage ist, Primer zu synthetisieren, welche ca. 8 nt lang sind. Darüber hinaus war bekannt, dass diese Primer ungewöhnlicherweise Desoxynukleotide enthalten und dass zusätzlich ATP zur Synthese erforderlich ist (Lipps *et al.*, 2003).

Da die einzelsträngige Virus-DNA ein undefiniertes Substrat darstellt, wurde versucht, ein geeigneteres DNA-Substrat für das Enzym zu finden, um die Anforderungen an die Matrize, die Zusammensetzung des Primers und den Mechanismus der Primersynthese besser untersuchen zu können. Dafür wurden verschiedene einzelsträngige Oligodesoxynukleotide, welche in Länge und Sequenz variierten, in Primaseaktivitätsassays daraufhin getestet, ob sie ORF904 in gleicher Weise wie einzelsträngige Virus-DNA als Substrat für die Synthese eines kurzen Primers dienen konnten. In diesen Experimenten wurden ebenfalls ATP und dNTPs eingesetzt, die dNTPs wurden mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP supplementiert und die synthetisierten Primer konnten mittels Radiographie visualisiert werden.

Die Ergebnisse für die verschiedenen eingesetzten Oligodesoxynukleotide lassen sich in drei Gruppen einordnen. Getestete Homopolymere (z.B. A<sub>40</sub>, C<sub>40</sub>, G<sub>40</sub>, T<sub>40</sub>) und andere repetitive Sequenzen wie Oligo pri\_2 (Tabelle 9-1) wurden von ORF904 nicht als Substrat benutzt und es ist demzufolge auch kein Produkt detektierbar (Abbildung 3-1, Spur 3 und 4). Eine größere Gruppe getesteter Oligodesoxynukleotide mit zufälligen Sequenzen (als Beispiel pri\_1, Spur 1 und 2) führte in diesem Experiment zu einem Produkt, welches

augenscheinlich länger als das eigentliche Substrat ist und unabhängig von ATP synthetisiert werden kann. Diese Reaktion wird in 3.1.3 eingehender behandelt.

Zuletzt konnte mit diesem Experiment auch ein 42 nt langes Substrat identifiziert werden (pri\_3), welches ORF904 zur Synthese eines ca. 8 nt langen Primers befähigte (Spur 6), welcher vergleichbar war mit dem Primer, der mit einzelsträngiger Plasmid-DNA (hier pBluescriptIISK(+)-pRN1, Spur 8) synthetisiert wurde. Dieser Primer wurde ebenfalls nur bei Vorhandensein von ATP im Reaktionsansatz synthetisiert. Zusätzlich war eine weitere Bande bei ca. 20 nt zu beobachten. Es wurde angenommen, dass diese Bande aus einer Verlängerung des Primers bis zum Ende des Templats resultierte und nicht aus einer anderen spezifischen Reaktion, da ORF904 zum einen über DNA-Polymerase Aktivität verfügt und zum anderen in der Bahn mit einzelsträngiger Plasmid-DNA vergleichbare Verlängerungsprodukte sichtbar waren.

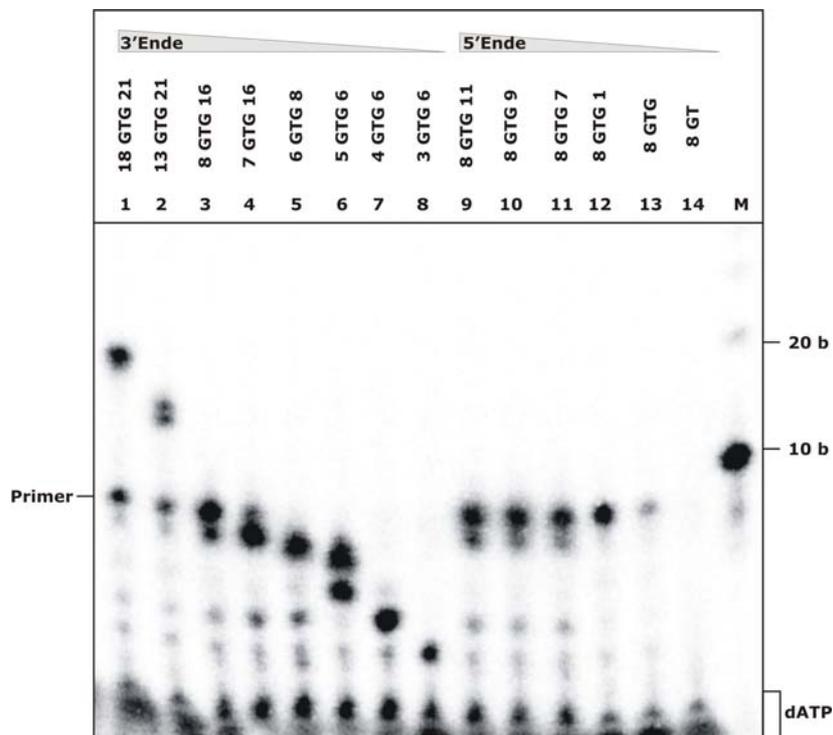


**Abbildung 3-1: Primaseaktivität von ORF904 mit verschiedenen DNA-Substraten.** Die Primasereaktionen setzten sich zusammen aus 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904, 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ , außerdem 1 mM ATP wenn angegeben. Von den Substraten pri\_1 bis pri\_3 wurden 4  $\mu\text{M}$  eingesetzt, vom Plasmid pBluescriptIISK(+)-pRN1 40 nM. K war die Kontrolle ohne DNA, M der Standard. Der 8 nt Primer wird nur mit einzelsträngiger Plasmid-DNA und mit Substrat pri\_3 gebildet, wenn ATP vorhanden ist.

Die Tatsache, dass nur eines der gestesteten Oligos als Substrat für die Primersynthese diente, ließ die Schlussfolgerung zu, dass das Enzym bestimmte Anforderungen an das DNA-Substrat stellt, welche nur von pri\_3 und der verwendeten Plasmid-DNA erfüllt werden können. Um diese Anforderungen besser zu verstehen, wurde pri\_3 als Ausgangspunkt für weitere Experimente genutzt.

### 3.1.1.1.2. Das minimale Substrat

Zuerst wurde versucht mit pri\_3 als Basis ein kleinstmögliches Oligodesoxynukleotid zu finden, welches noch die Synthese des 8 nt Primers ermöglicht. Wenn man, wie erwähnt, annimmt, dass das in Abbildung 3-1 beobachtete Verlängerungsprodukt auf einer Verlängerung des Primers bis zum 5'-Ende des Substrats beruht, wäre der Anfang des Primers ungefähr in der Mitte des Substrats, geschätzt in der Nähe der Sequenz GTG. Um das zu überprüfen, wurden verschiedene Varianten von pri\_3 mit Deletionen am 5'- bzw. 3'-Ende eingesetzt (pri\_4 bis pri\_16, Tabelle 9-1). Aus Abbildung 3-2 ist ersichtlich, dass das Verkürzen des 5'-Endes des Templates zuerst zu einer Verkürzung des vermuteten Verlängerungsproduktes führte und dann (Bahn 4 bis 8) zu einer Verkürzung des eigentlichen Primers.



**Abbildung 3-2: Identifizierung des minimalen Primase-Substrats.** Die Reaktionen enthielten 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP, 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904, 1 mM ATP und 4  $\mu\text{M}$  der angegebenen DNA-Substrate. Substrat pri\_3 (dessen Sequenz 18 Nukleotide, gefolgt von GTG und weiteren 21 Nukleotiden ist) wurde vom 5'-Ende (Spuren 2-8) bzw. vom 3'-Ende (Spuren 9-14) verkürzt. Dabei führte das Verkürzen des 5'-Endes zu einer Verkürzung des Verlängerungsproduktes (vgl. Spur 1 und 2) und weiter zu einer Verkürzung des Primers (Spuren 3-8). Die Verkürzung des 3'-Endes führte nicht zu einer Verkürzung der Polymerisationsprodukte, Verkürzung des Ausgangssubstrats um mehr als 21 nt reduzierte die synthetisierte Primermenge allerdings stark (Spur 13 und 14). Das minimale Substrat, welches die Synthese eines 8 nt Primers ermöglichte, war pri\_14 (Spur 12).

Dies unterstützte die Annahme, dass die Synthese des Primers in der Mitte des Oligos begonnen wird und das eine Verlängerung bis zum 5'-Ende des Oligos erfolgt. Bei den 3'-Deletionen zeigte sich, dass es nicht zu einer Verkürzung des Primers kam, dafür aber,

dass eine Verkürzung um 21 nt oder mehr zu einem starken Rückgang der Primaseaktivität führte (Bahn 12 und 13/14).

Aus diesen Ergebnissen konnte ein minimal notwendiges Substrat für die Synthese eines Volllängenprimers definiert werden: 5'-CTTCTTCTGTGC-3' (pri\_14), welches weitere Experimente zur Primersynthese erleichterte. Außerdem zeigte das Experiment, dass die Sequenz 5'-GTGC-3' am 3'-Ende des Substrates notwendig ist für eine effiziente Primersynthese, während Verkürzungen der 5'-Seite die Primaseaktivität nicht beeinflussen, nur die Länge des Primers bzw. der Verlängerungsprodukte.

### **3.1.1.1.3. Identifizierung der Erkennungssequenz**

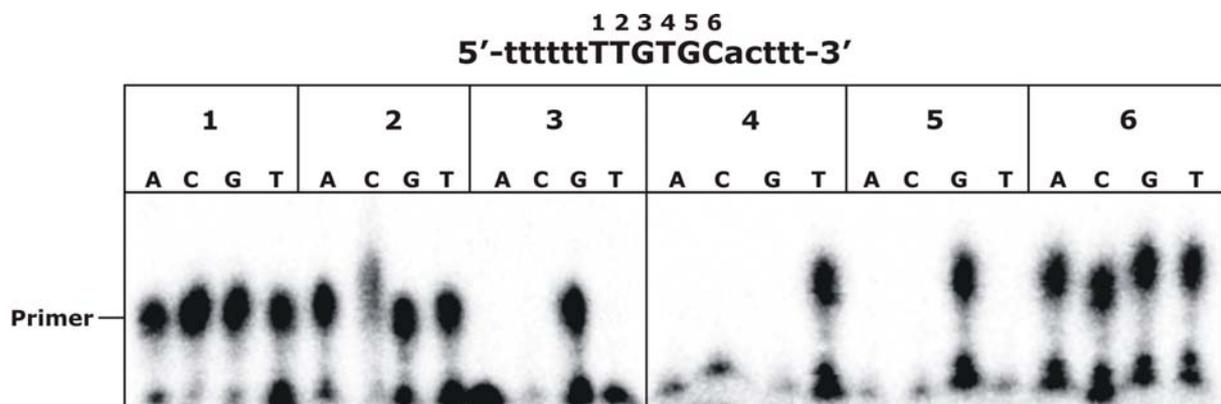
Für viele Primasen konnte bisher eine so genannte Erkennungssequenz identifiziert werden, also eine Sequenz, an welcher die Primersynthese bevorzugt initiiert wird (Frick & Richardson, 2001). Die vorangegangenen Experimente deuteten darauf hin, dass ORF904 auch eine solche Erkennungssequenz besitzt. Um diese zu bestimmen, wurde vom minimalen Substrat (pri\_14) ausgehend Oligodesoxynukleotid pri\_17 entwickelt, indem die acht Basen am 5'-Ende, welche vermutlich als Templat für den neusynthetisierten Primer dienen, in Thymidin umgewandelt wurden, um einen maximalen Einbau des als Label verwendeten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP zu ermöglichen. Am 3'-Ende wurden fünf Nukleotide mehr als minimal notwendig belassen, um eventuelle Effekte einer verringerten Primaseaktivität ausschließen zu können.

Wie in Abbildung 3-3 dargestellt, wurden nun die mittleren Positionen dieses Substrates gegen alle vier möglichen Basen ausgetauscht und in Primaseassays eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass Änderungen an den Positionen 1 und 2 keinen Einfluss auf die Primersynthese hatten. Dagegen waren an Positionen 3, 4 und 5 nur die Basen G, T und G in der Lage als Primasesubstrat zu dienen. Alle Template mit anderen Basen an den Positionen 3, 4 und 5 wurden von ORF904 nicht zur Synthese von Volllängenprimern verwendet. Für die Base an Position 6 konnte wiederum keine Bevorzugung festgestellt werden, hier führten alle eingesetzten Substrate zu einer vergleichbaren Primersynthese. Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass ORF904 die Sequenz 5'-GTG-3' strikt benötigt, um einen 8 nt langen Primer zu synthetisieren, was erklärt, warum andere getestete Oligodesoxynukleotide nicht als Substrat für die Primase geeignet waren.

Ein derartiges Trinukleotid als Erkennungssequenz für die bevorzugte Initiation der Primersynthese wurde bereits für eine Anzahl weiterer, vor allem bakterieller Primasen gefunden. So hat die zelluläre Primase von *E. coli* (DnaG) 5'-CTG-3' als Erkennungsmotiv (Swart & Griep, 1993), für die T7-Primase konnte 5'-GTC-3' identifiziert werden (Mendelman & Richardson, 1991) und für die SP6-Primase 5'-GCA-3' (Tseng *et al.*, 2000). Die Primase des ebenfalls hyperthermophilen *Aquifex aeolicus* initiiert Primer bevorzugt an den Sequenzen 5'-CCC-3' oder 5'-GCC-3' (Larson *et al.*, 2008). Für eukaryotische Primasen wurden bisher keine so eindeutigen Erkennungsmotive gefunden,

die Initiation des Primers scheint zwar auch sequenzabhängig zu erfolgen, aber spezifische Sequenzen konnten nur selten und in bestimmten Systemen identifiziert werden. Für die Initiation der Replikation eines Maus-Virus durch die Maus-Primase konnte z.B. gezeigt werden, dass die Sequenz 5'-CCA/C-3' erkannt wird (Davey & Faust, 1990) und für die Primase des Herpes simplex Virus 1 ist eine unspezifischere Sequenz von 5'-Pyr-Pyr-G-3' notwendig für die effiziente Synthese längerer Primer (Ramirez-Aguilar *et al.*, 2002). Die Sequenzanforderungen anderer archaer Primasen wurden bis jetzt noch nicht untersucht, es liegen nur Hinweise vor, dass die Primase von *Sulfolobus solfataricus* doppelsträngige Substrate mit thymidin-haltigem, ungepaarten Bereich gegenüber cytidinreichen Substraten für die Primersynthese bevorzugt (De Falco *et al.*, 2004).

Ferner konnten mit den getesteten Substraten keine Sequenzanforderungen außerhalb des GTG-Tripletts festgestellt werden. An den Positionen 3' und 5' von GTG führten alle Basen zu einer effizienten Primersynthese. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen mit einigen anderen Primase-Enzymen, so konnte z.B. für die T7-Primase gezeigt werden, dass zusätzlich für eine effiziente Primersynthese ein Thymidin oder ein Guanin 5' der Erkennungssequenz vorhanden sein muss, andere Basen an dieser Stelle reduzieren die Primersynthese auf 10% (Tabor & Richardson, 1981). Auch für die Herpes simplex Virus 1 Primase wurde beobachtet, dass die Sequenz der Region um die Erkennungssequenz nicht nur die Länge, sondern auch die Rate der Initiation des Primers beeinflusst (Ramirez-Aguilar *et al.*, 2002).



**Abbildung 3-3: Bestimmung der Erkennungssequenz der Primase. Variationen von Substrat pri\_17 wurde in Primasereaktionen eingesetzt. Die gekennzeichneten Positionen wurden mit allen vier Basen ersetzt. Primasereaktionen mit 0,4 µM ORF904, 10 µM dNTPs mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, 1 mM rNTPs und 0,4 µM Substrat (Nummer 1-6 zeigen die Position, Buchstaben A, C, G, T die Identität der getesteten Base).**

#### 3.1.1.1.4. Abweichungen von der Erkennungssequenz

Nach der Identifizierung der Erkennungssequenz von ORF904 wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei Substraten mit unvollständiger Erkennungssequenz möglicherweise andere Produkte als Vollängenprimer gebildet

werden. Dazu wurden Primaseassays durchgeführt mit Substraten (basierend auf pri\_17 wie im vorherigen Experiment), bei denen jeweils eine Base des Erkennungstripletts verändert war. Die Inkubation erfolgte für 30 min und die Gelelektrophorese der Produkte erfolgte im Gegensatz zum vorherigen Experiment mittels eines größeren und damit besser auflösenden Gels.

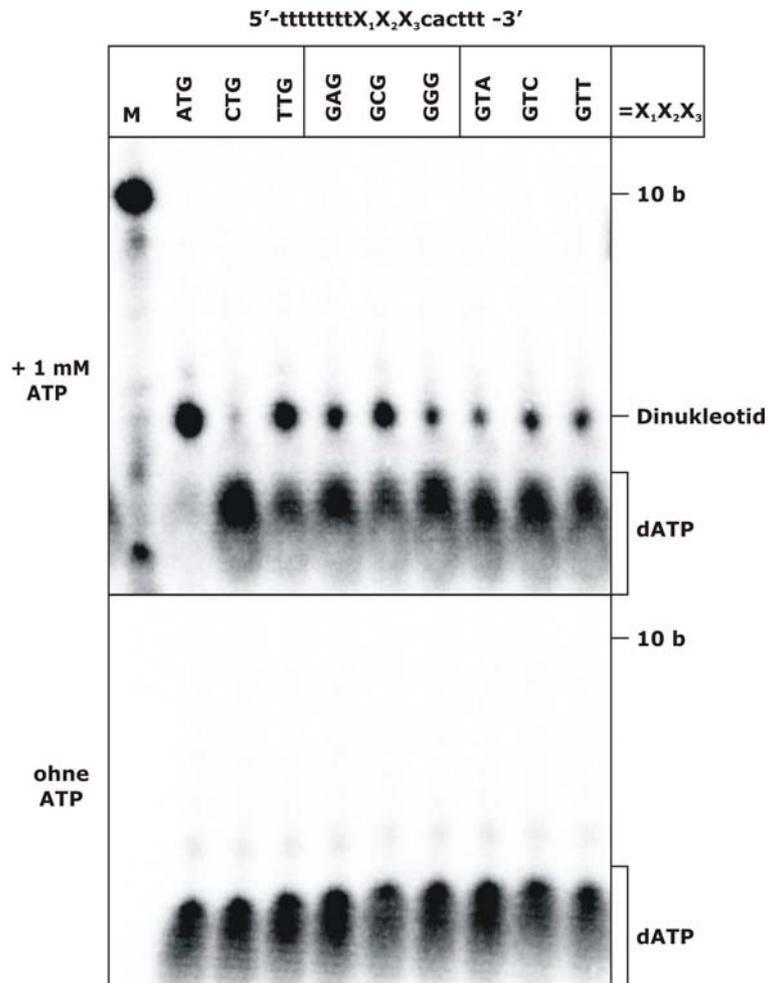
Zuerst wurden die Aktivitätsassays wie bisher unter Zugabe von 1 mM ATP durchgeführt (Abbildung 3-4, oberer Teil), dabei ist ersichtlich, dass es zwar, wie bereits gezeigt, nicht zur Synthese von Vollängenprimern kam, allerdings traten sehr kurze Produkte auf, welche durch einen Vergleich mit radioaktiv markierten Standardoligonukleotiden als Dinukleotide identifiziert werden konnten. Die Synthese dieser Dinukleotide war sequenzabhängig, der stärkste Einbau von Radioaktivität konnte beobachtet werden, wenn das 5' Guanosin der Erkennungssequenz gegen ein Adenosin ausgetauscht wurde. Dies könnte auf die Ähnlichkeit der beiden Purinbasen zurückzuführen sein. Dagegen wird mit einem Cytidin an dieser Stelle kein sichtbares Polymerisationsprodukt synthetisiert. Änderungen der mittleren Position des Erkennungsmotivs führten zu einer abgeschwächten Dinukleotidsynthese, hier war das Pyrimidin Cytidin das effektivste Substrat. Wenn das 3' Guanosin verändert wurde, war die Synthese des Dinukleotids am schwächsten.

Um zu überprüfen, ob die Synthese der Dinukleotide auf einer tatsächlichen Primaseaktivität beruht oder Ergebnis einer Nebenreaktion des Enzyms ist, wurde das Experiment ohne die Zugabe von ATP wiederholt (ATP ist notwendig für die Synthese des Vollängenprimers, 3.1.1.2). Dabei wurde mit keinem Substrat ein Dinukleotid oder längeres Polymerisationsprodukt synthetisiert (Abbildung 3-4, unter Teil). Dies spricht dafür, dass die beobachteten Dinukleotide das Ergebnis einer zumeist abgeschwächten Primaseaktivität mit den verwendeten suboptimalen Substraten sind. Zusätzlich spricht die Tatsache, dass mit verschiedenen Templaten verschiedene Mengen an Produkt synthetisiert wurden, dafür, dass es sich um eine substratabhängige Aktivität des Enzyms handelt.

Es ist auch zu erkennen, dass Veränderungen der beiden Nukleotide der 3'-Seite des Erkennungsmotivs (v.a. des 3' Guanosins) zu einer sehr reduzierten Synthese des Dinukleotidprimers führten, während die Austausch des 5' Guanosins zu Adenosin oder Thymin eine relativ hohe Dinukleotidsynthese ermöglichen konnten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Basen am 3'-Ende des Erkennungsmotivs eine größere Rolle bei der Interaktion mit dem Protein spielen. Möglicherweise spielen dabei aber auch nur übergeordnete Effekte der umgebenden Sequenz eine Rolle.

Dieses Experiment zeigte, dass ein Vollängenprimer nur synthetisiert wird, wenn das Erkennungsmotiv vollständig vorhanden ist. Ein verändertes Triplet wird vermutlich erkannt, aber die Verlängerung des initiierenden Dinukleotids ist nicht möglich. Die

Erkennungssequenz beeinflusst also nicht nur den Start des Primers, sondern ist auch notwendig, damit die Elongation zur vollständigen Länge durchgeführt wird.



**Abbildung 3-4: Veränderungen der Primase-Erkennungssequenz können zur Synthese von Dinukleotid-Primern führen. Primaseassays wurden durchgeführt mit 0,4  $\mu$ M ORF904 und 10  $\mu$ M dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. Als Substrat wurde das abgebildete Oligodesoxynukleotid pri\_17 mit den angegebenen Veränderungen des GTG-Motivs eingesetzt. Im oberen Teil erfolgten die Reaktionen mit der Zugabe von 1 mM ATP, im unteren ohne. In Gegenwart von ATP wurden mit einigen Substraten Dinukleotid-Primer synthetisiert, ohne ATP wurden keine Produkte gebildet.**

Ein vergleichbares Verhalten wurde beobachtet für die Primase von Herpes simplex Virus 1, dabei führte die Änderung des 3' Guanosins der Erkennungssequenz zu einer Verkürzung der synthetisierten Primer auf 2 bis 4 Nukleotide von  $\approx$ 10 nt eines Vollängenprimers (Ramirez-Aguilar *et al.*, 2002). Ähnliches wurde für die T7-Primase beobachtet, allerdings führte hier die Änderung des 3' Cytosins oder des zentralen Thymins zu einer drastischen Reduzierung der Primersynthese auf unter 0,1% (Frick & Richardson, 1999).

Bei anderen untersuchten Primasen kam es durch Veränderungen dagegen eher zu Einschränkungen der normalen Primersynthese, z.B. führen Punktmutationen in der

Erkennungssequenz der Maus-Primase zu einer Verringerung der Affinität für das DNA-Substrat und zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit (Davey & Faust, 1990).

### **3.1.1.2. Zusammensetzung des Primers**

#### **3.1.1.2.1. Der Primer besteht aus Desoxy- und Ribonukleotiden**

Die vorangegangenen Experimente ergaben, dass ORF904 in der Lage ist, mit einem einzelsträngigen DNA-Substrat, welches die Sequenz GTG enthält aus ATP und dNTPs einen 8 nt langen Primer zu synthetisieren. Dabei war unklar, weshalb sowohl Ribonukleotide als auch Desoxynukleotide notwendig sind. Es wäre möglich, dass ATP genutzt wird, um Energie für die Reaktion/Initiation bereitzustellen, es einen allosterischen Effekt auf die Enzymaktivität hat oder aber auch, dass beide Nukleotidarten in den Primer inkorporiert werden.

Um zu untersuchen, ob es zu einem Einbau des ATP kommt, wurden Primasereaktionen entweder mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP oder [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP als Label durchgeführt. Um wieder einen größtmöglichen Einbau von Label zu ermöglichen, wurde Substrat pri\_17 verwendet. Zusätzlich wurden entweder 10  $\mu$ M rNTPs, 10  $\mu$ M dNTPs oder beides zu den Reaktionen gegeben.

Aus den Reaktionen in Abbildung 3-5, in denen [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP zur Markierung eingesetzt wurde, ist ersichtlich, dass ein Primer nur gebildet wurde, wenn Ribo- und Desoxynukleotide vorhanden waren. In den ersten beiden Spuren waren entweder nur 6 nM [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP oder zusätzlich 10  $\mu$ M unmarkierte dNTPs vorhanden, beides reichte nicht aus, um einen deutlich sichtbaren Primer zu synthetisieren. Dagegen ist in Spur 3 und 4 zu erkennen, dass das Vorhandensein von zusätzlichen Ribonukleotiden zur Synthese des 8 nt Primers führte. Dabei fällt auf, dass in Spur 3 nur sehr wenig radioaktiv markiertes dATP eingebaut wurde und der Großteil der gebildeten Produkte sehr kurz (vermutlich Di- und Trinukleotide) war. Ein Grund dafür könnte sein, dass die in dieser Reaktion vorliegende Konzentration von insgesamt nur 6 nM [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP zu niedrig war für eine effiziente Primersynthese.

In Übereinstimmung mit diesem Experiment sind in den Reaktionen mit markiertem ATP nur Primer sichtbar wenn zusätzlich dNTPs vorhanden waren. In Spur 5 und 7 waren nur Ribonukleotide vorhanden, was nicht ausreichte um einen Primer zu synthetisieren. Dagegen waren in Spur 6 und 8 jeweils 10  $\mu$ M dNTPs vorhanden, dies genügte für die Synthese eines Primers. Die zusätzlichen Ribonukleotide in Spur 4 beeinflussten die Effizienz der Primersynthese nicht, im Gegensatz zu dem entsprechenden Ansatz mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (Spur 3), was darauf hinweist, dass beide Nukleotide distinkte Funktionen erfüllten.

Die Tatsache, dass in diesem Experiment auch mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP als Label sichtbarer Primer gebildet wurde, wies darauf hin, dass sowohl ATP als auch dATP in den Primer inkorporiert wurden.

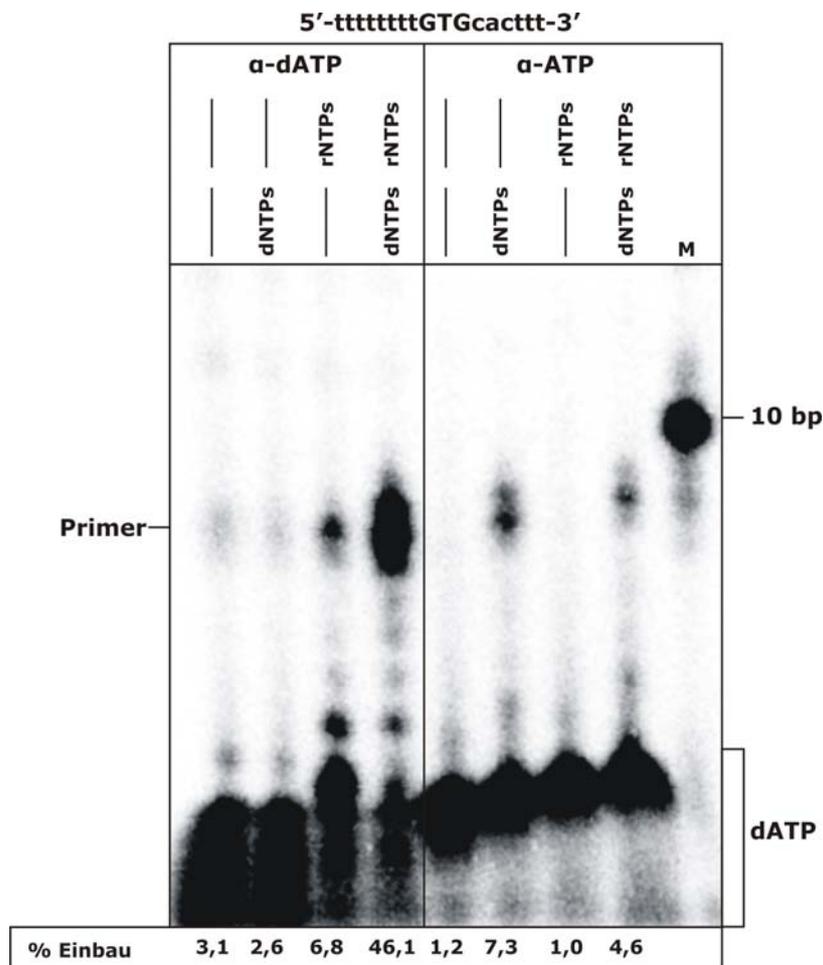
Um genauere Informationen über die Zusammensetzung des Primers zu erhalten, wurde das Verhältnis von eingebauten zu freien Nukleotiden für alle Ansätze bestimmt. Wie erkennbar ist, wurde in den vergleichbaren Ansätzen (Spur 4 und 8) wesentlich weniger [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP eingebaut als [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (5% gegenüber 50% Einbau, Abbildung 3-5). Dies zeigte klar, dass der Primer nur zu ca. 1/10 aus Ribonukleotid (in diesem Fall ATP) bestand und der Großteil Desoxynukleotide waren. Diese ungleiche Verteilung und die strikte Anforderung für beide Nukleotidarten während der Primersynthese schloss im Prinzip aus, dass es zu einem zufälligen Einbau der beiden verschiedenen Nukleotide kam.

Ausgehend von diesen Resultaten erschien wahrscheinlich, dass ATP nur an einer Position des neusynthetisierten Primers verwendet wird. Da das erste Nukleotid bei der Primersynthese seinen 5'-Triphosphat-Anteil vollständig beibehält, wurde zu diesem Zweck [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP als Label in einem Primaseaktivitätsassay eingesetzt (Abbildung 3-6, unteres Feld), welcher analog zu den vorherigen durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Markierung des  $\gamma$ -Phosphates im Primer vorhanden war (Abbildung 3-6, Spur 1). Dies bestätigte die Vermutung, dass als erstes Nukleotid ATP von der Primase eingebaut wird. Die Tatsache, dass in den Versuchen mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP als Label in Abwesenheit von Desoxynukleotiden keine Polymerisationsprodukte sichtbar waren, zeigte, dass die Verknüpfung von zwei Ribonukleotiden durch das Enzym nicht möglich ist. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass ORF904 jeden Primer mit ATP begann und danach die Elongation ausschließlich mit Desoxynukleotiden erfolgte.

Diese Zusammensetzung des Primers aus initiiertem Ribonukleotid und Desoxynukleotiden ist ungewöhnlich. Die meisten bisher untersuchten Primer beginnen zwar auch mit einem Purin, da Primasen die Initiation der Primersynthese gegenüber Pyrimidinbasen bevorzugen (Frick & Richardson, 2001; Arezi & Kuchta, 2000; Yamaguchi *et al.*, 1985), aber für die Elongation werden keine Desoxynukleotide verwendet. Es wurde allerdings gezeigt, dass DnaG aus *E. coli* in der Lage ist, mit relativ geringer Effizienz Desoxynukleotide für die Elongation eines Primers zu nutzen (Rowen & Kornberg, 1978).

Dagegen konnte für die archaealen Primasen von *Sulfolobus solfataricus* (Lao-Sirieix & Bell, 2004), *Pyrococcus horikoshii* (Matsui *et al.*, 2003) und *Pyrococcus furiosus* (Bocquier *et al.*, 2001), welche auch die Fähigkeit haben, Primer aus dNTPs zu synthetisieren, keine Notwendigkeit für Ribonukleotide beobachtet werden. Diese Primasen können *in vitro* reine DNA-Primer synthetisieren und RNA-Primer werden nur mit wesentlich geringerer Effizienz hergestellt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei aber nur um eine zusätzliche Fähigkeit des aktiven Zentrums, die eventuell in der evolutionären Herkunft dieser

Enzyme begründet liegt. Andere Experimente geben zumindest Hinweise darauf, dass diese Enzyme *in vivo* eher Ribonukleotid-Primer synthetisieren. Die *Sulfolobus*-Primase hatte in kinetischen Experimenten eine wesentlich höhere Affinität für rNTPs als für dNTPs (Lao-Sirieix & Bell, 2004) und für die Primase von *P. furiosus* wurde beobachtet, dass die Zugabe der größeren Untereinheit zur katalytischen Primase-Untereinheit zu einer Zunahme der Synthese von RNA-Primern *in vitro* führte (Liu *et al.*, 2001a).



**Abbildung 3-5: Zusammensetzung des Primers.** Die Primasereaktionen enthielten 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904 und 6 nM [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]dATP bzw. [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP. Zusätzlich enthielten die Ansätze 10  $\mu\text{M}$  dNTPs bzw. 10  $\mu\text{M}$  rNTPs, wie angegeben. Als Substrat wurden 4  $\mu\text{M}$  pri\_17 verwendet. Die Zahlen unter den Spuren zeigen den prozentualen Anteil der Radioaktivität, welche in den Primer inkorporiert wurde, an.

### 3.1.1.2.2. Andere Ribonukleotide können ATP ersetzen

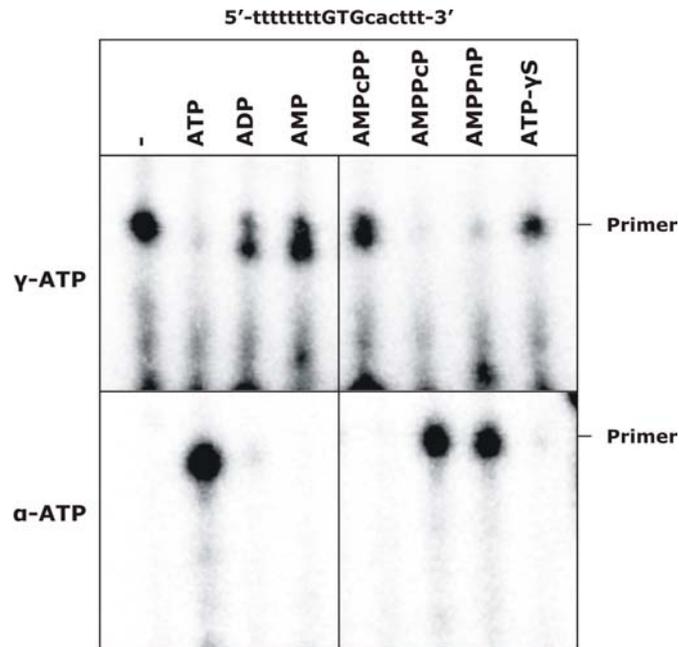
Primasen stellen oft relativ geringe Ansprüche an die 5'-Gruppen der an erster Stelle inkorporierten Ribonukleotide (Frick & Richardson, 2001). So konnte gezeigt werden, dass von *E. coli* DnaG und der T7-Primase eine Reihe von ATP-Analoga an erster Stelle des Primers eingebaut werden können (Rowen & Kornberg, 1978; Frick *et al.*, 1999).

Um zu überprüfen, ob ORF904 auch diese Eigenschaft besitzt, wurden eine Reihe verschiedener Nukleotide auf ihre Fähigkeit getestet, die Primersynthese initiieren zu können. Zuerst waren das Adenosindi- und monophosphat als weitere natürlich vorkommende Adeninnukleotide. Außerdem wurden mit AMPcPP ( $\alpha,\beta$ -Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat), AMPPcP ( $\beta,\gamma$ -Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat), AMPPnP (Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -Imido)Triphosphat) und  $\gamma$ -S-ATP (Adenosin-5' [ $\gamma$ -thio]Triphosphat) eine Reihe nicht-hydrolysierbarer ATP-Analoga getestet.

Dafür wurden zum einen Primaseaktivitätsassays durchgeführt, in denen [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP als Markierung eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden jeweils 1 mM des zu testenden Ribonukleotides und 10  $\mu$ M dNTPs zugesetzt. Als DNA-Matrize wurde wieder pri\_17 verwendet. Dabei wurde wie erwartet mit ATP und zusätzlich mit AMPPcP und AMPPnP ein Primer synthetisiert, was zeigt, dass diese Nukleotide an erster Stelle des Primers eingebaut werden können (Abbildung 3-6 oben). Dagegen kam es mit ADP, AMP und den Analoga AMPcPP und  $\gamma$ -S-ATP nicht zur Synthese eines Primers.

Außerdem wurde in einem zweiten Versuch [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP als Markierung eingesetzt. Wie vorher wurden hier auch 1 mM des jeweiligen Ribonukleotides und 10  $\mu$ M dNTPs verwendet. Wenn kein weiteres Ribonukleotid zugesetzt wurde, entstand in diesem Versuch ein sichtbarer Primer, da das radioaktiv markierte Phosphat des [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP in den Primer eingebaut wurde (s.o. 3.1.1.2.1). Dagegen sollte das Signal verschwinden, wenn eines der getesteten Ribonukleotide auch in der Lage ist, als erstes Nukleotid des Primers verwendet zu werden, da es die geringe Menge an [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (6nM vs. 1 mM) verdrängt. Es bestätigten sich die Ergebnisse des ersten Experiments, Zugabe von ATP führte wie zu erwarten zu einem Verschwinden des Primers (Abbildung 3-6 unten, Spur 2), gleiches galt außerdem wieder für AMPPcP und AMPPnP. Einen sehr schwachen Effekt auf den Einbau von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP hatten dagegen ADP und AMP, außerdem auch AMPcPP und  $\gamma$ -S-ATP, was dafür spricht, dass diese Nukleotide nicht an erster Position des Primers an Stelle des markierten ATP eingebaut werden.

Die Tatsache, dass die nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga AMPPcP und AMPPnP die Primersynthese ermöglichten, unterstrich noch einmal das Ergebnis, dass das Enzym keine ATP-Hydrolyse durchführt, sondern dass die Triphosphate der Ribonukleotide strukturell am Primer beteiligt sind. Weshalb die recht ähnlichen Nukleotide AMPcPP und  $\gamma$ -S-ATP dagegen nicht benutzt wurden, blieb unklar. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass bestimmte Anforderungen an das erste Nukleotid bestehen, möglicherweise vorgegeben durch strukturelle Eigenschaften des aktiven Zentrums des Enzyms.



**Abbildung 3-6: ATP und weitere Ribonukleotide können an erster Stelle eingebaut werden. Primasereaktionen enthielten 0,4  $\mu$ M ORF904, 10  $\mu$ M dNTPs und außerdem 1 mM des angegebenen Ribonukleotids. Als Substrat wurden 4  $\mu$ M pri\_17 verwendet. Im oberen Teil der Abbildung war [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP die Markierung, im unteren [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. AMPPcP und AMPPnP führten ebenso zur Primersynthese wie ATP (oben). Im oberen Teil zeigte der sichtbare Primer mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, dass ATP das erste Nukleotid des Primers war. ATP, AMPPcP und AMPPnP konnten hierbei [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP verdrängen. Die anderen Nukleotide wurden nicht eingebaut.**

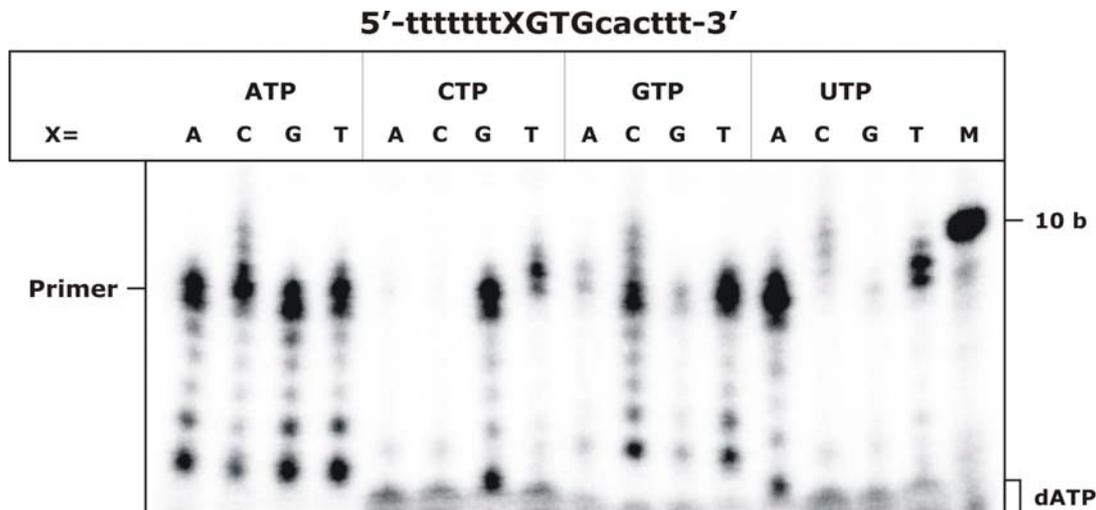
### 3.1.1.2.3. Startpunkt des Primers und Anforderungen an das erste Nukleotid

Ausgehend von den vorangegangenen Experimenten wurde dann versucht herauszufinden, an welchem Nukleotid des Templates die Primersynthese initiiert wird und ob die Art dieses Nukleotids die Auswahl des ersten Ribonukleotids beeinflusst. Bei den bisher benutzten Oligodesoxynukleotiden fiel auf, dass bei den Templates, welche zur Synthese von 8 nt Primern führten, 8 Nukleotide 5' der notwendigen GTG-Sequenz waren. Dies führte zu der Annahme dass die Primersynthese am ersten Nukleotid 5' des GTG initiiert wird, wenn man davon ausgeht, dass die Polymerisationsprodukte die Länge des Templates widerspiegeln.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine Reihe von Oligonukleotiden, welche auf dem bereits verwendeten Substrat pri\_17 basierten (5'-T<sub>7</sub>XGTGCACTTT-3') in Primaseaktivitätsassays eingesetzt. Dabei war X die vermutete Startstelle der Primersynthese und wurde in diesem Experiment durch jeweils eine der vier Basen ersetzt. Zusätzlich wurden die zugesetzten Ribonukleotide in jedem Ansatz variiert, um zu überprüfen ob verschiedene Basen an Position X zum Einbau verschiedener Ribonukleotide an erster Stelle des Primers führen. Als Label diente [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP.

In den Reaktionen mit ATP wurden mit jedem Substrat mit ungefähr gleicher Effizienz Primer gebildet (Abbildung 3-7), dagegen waren mit CTP und UTP die Primer am

deutlichsten, bei denen das jeweilige Ribonukleotid mit der Base an der Position X eine Watson-Crick-Basenpaarung eingehen konnte. Einzig GTP wich davon etwas ab, hier war die Primersynthese bei beiden Pyrimidinbasen an der Position X ungefähr gleichstark, eine eindeutige Bevorzugung des komplementären Cytidins war nicht zu erkennen. Bei allen anderen Substraten war die Primersynthese ineffizienter.



**Abbildung 3-7: Substratabhängige Auswahl des ersten Ribonukleotids. In den Primasereaktionen wurden 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904, 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP und jeweils 1 mM des angegebenen Ribonukleotids eingesetzt. Außerdem 4  $\mu\text{M}$  des Substrats, welches die angegebenen Basen an Position X enthielt. Synthese eines Primers zeigte an, dass dieses Ribonukleotid an erster Stelle des Primers eingebaut werden kann. Für ATP war keine Präferenz sichtbar, dagegen wurden CTP und UTP nur gegenüber G bzw. A eingebaut. GTP zeigte eine schwächere Diskriminierung, beide Pyrimidinbasen führte zu einer ähnlichen Primersynthese.**

Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass der Primer 5' vom Erkennungsmotiv GTG initiiert wird, da die Sequenz an dieser Stelle einen Einfluss auf das erste Nukleotid des Primers hat. Die Erkennungssequenz an sich wird also nicht in den Primer kopiert; sie ist kryptisch. Diese Tatsache ist ungewöhnlich. Bei allen untersuchten bakteriellen Primasen wurde bis jetzt gezeigt, dass die Initiation des Primers am zentralen Nukleotid des Erkennungstripletts beginnt (Frick & Richardson, 2001), nur das 3' Nukleotid ist in diesen Fällen kryptisch. Für eukaryotische Primasen wurde dagegen beobachtet, dass die Primerinitiation  $\approx 10$  nt in 5' Richtung vom Erkennungsmotiv entfernt stattfindet (Davey & Faust, 1990).

In diesem Versuch wurde gezeigt, dass ORF904 als erstes Nukleotid ATP stark bevorzugt und dass kein Zusammenhang zwischen der Sequenz des Templates und dem inkorporierten Nukleotid bestehen muss. Andere bakterielle Primasen zeigten eine ähnliche Bevorzugung für eines der beiden Purinnukleotide an erster Stelle des Primers, allerdings ist die Templat-Abhängigkeit nicht vergleichbar, da die Primersynthese wie erwähnt immer an dem zentralen Pyrimidin der jeweiligen Erkennungssequenz beginnt.

Für eukaryotische Primasen wurde gezeigt, dass die Primersynthese auch bevorzugt mit ATP oder GTP initiiert wird, welches Templat-abhängig eingebaut wird (Davey & Faust, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1985).

Außerdem unterstrich dieses Experiment, dass der hauptsächlich synthetisierte Primer tatsächlich 8 nt lang ist, da der Abstand zwischen dem 5'-Ende des verwendeten Oligodesoxynukleotides und dem Startpunkt des Primers 8 Nukleotide betrug und ein Primer synthetisiert wurde, der auf der gleichen Höhe wie ein vergleichbarer mit einem längeren Substrat (z.B. pri\_3 und pri\_13, Abbildung 3-2) führte. Wie schon in Experiment 3.1.1.1.2 vermutet, führt eine Verkürzung des Templats vom 5' Ende her zu einer Verkürzung des Primers, die Initiation erfolgte immer 5' des GTG-Motivs. Längere Produkte resultierten aus einer Verlängerung des Volllängenprimers und sind keine spezifischen Primaseprodukte. Sogenannte Primer-Multimere, das sind Primer, die durch die Synthese mehrerer Einzelprimer hintereinander entstehen (Frick & Richardson, 2001), konnten nicht beobachtet werden. Die Länge der Primer, welche die bisher untersuchten Primasen synthetisieren, schwankt von 5 oder weniger Nukleotiden für einige virale Enzyme bis zu 10-12 nt für zelluläre Primasen von Eukaryoten und Bakterien (Frick & Richardson, 2001) und ähneln damit der für ORF904 ermittelten Länge.

### **3.1.2. Mechanismus der Primersynthese**

Nach Identifizierung des notwendigen Templats und der Zusammensetzung des Primers wurden weitere Experimente durchgeführt, um den Mechanismus der Primersynthese genauer zu untersuchen.

Die bisherigen Experimente ergaben, dass das Hauptprodukt der Primersynthese durch ORF904 ein 8 nt langer Primer ist. Dieser Primer wird aus einem initiierten Ribonukleotid gebildet, welches mit 7 Desoxynukleotiden verlängert wird. Dabei kann die Natur des Ribonukleotides variabel sein, außer ATP können noch verschiedene andere natürlich vorkommende Ribonukleotide und ATP-Analoga genutzt werden. Außerdem kann der spezifische Primer im Anschluss noch bis zum 5'-Ende des Substrats verlängert werden. ORF904 ist bei der Primersynthese strikt auf die Sequenz GTG angewiesen, und der Primer wird an dem Nukleotid welches in 5'-Richtung an die Erkennungssequenz angrenzt, initiiert, die Erkennungssequenz wird nicht kopiert.

#### **3.1.2.1. Genauigkeit der Primersynthese**

##### **3.1.2.1.1. Zweite Position des Primers**

ORF904 zeigte im Experiment 3.1.1.2.2, dass ATP an erster Stelle des Primers gegenüber jeder möglichen Base mit ungefähr gleicher Effizienz eingebaut wird, eine Watson-Crick-Basenpaarung ist für dieses Nukleotid während der Primersynthese nicht nötig. Zusätzlich ist eine relativ hohe Fehlerrate während der Elongationsphase der Primersynthese ein

Kennzeichen vieler Primasen, sowohl bakterieller als auch archaeal-eukaryotischer. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die Primase aus Kalbsthymus und die *Drosophila*-Primase während der Elongation des Primers mit hoher Frequenz nicht-komplementäre Nukleotide inkorporieren (Cotterill *et al.*, 1987; Sheaff & Kuchta, 1994). Die Primase aus Herpes simplex baut nicht-komplementäre Nukleotide mit einer Frequenz von 0,14 bis 0,01 in einen Primer ein (Ramirez-Aguilar & Kuchta, 2004). Auch für DnaG aus *E. coli* wurde eine relativ hohe Fehlerfrequenz von  $\approx 0,1$  bestimmt (Swart & Griep, 1995b). Dagegen hat z.B. die RNA-Polymerase aus *E. coli*, welche ein vergleichbares RNA-synthetisierendes Enzym ohne Korrekturlesefähigkeit ist, eine Fehlerrate von nur  $\approx 10^{-4}$  (Springgate & Loeb, 1975) und ist damit wesentlich genauer als eine typische Primase. Ein Grund für die vergleichsweise hohe Fehlerrate, die bisher bei Primasen beobachtet wurde, könnte eine gewisse Instabilität des Primer-Templat-Komplexes sein, vor allem wenn der Primer nur wenige Basen lang ist (dieser Effekt sollte durch eine hohe Temperatur noch verstärkt werden). Da der Ribonukleotid-Primer in der Mehrzahl der untersuchten Systeme während oder nach der Replikation entfernt und durch DNA mittels einer genaueren DNA-Polymerase ersetzt wird, kann vermutlich normalerweise auch auf eine sehr hohe Genauigkeit der Primase verzichtet werden.

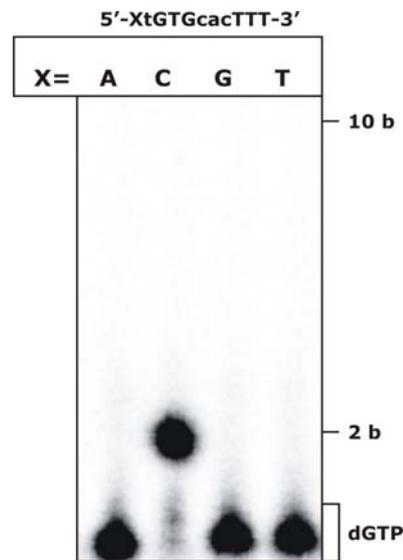
Da der von ORF904 synthetisierte Primer, welcher hauptsächlich aus Desoxynukleotiden besteht, möglicherweise nach der Replikation nicht erkannt und entfernt werden kann, wurde untersucht wie groß die Fehleranfälligkeit des Enzyms ist.

Zuerst wurde dabei getestet, ob die Auswahl des zweiten Nukleotids des Primers ähnlich unabhängig von der Sequenz des Substrats geschehen kann, wie für das initiiierende Ribonukleotid beobachtet. Dazu wurde ein Oligodesoxynukleotid eingesetzt, welches nur die Synthese eines Dinukleotid-Primers erlaubte (5'-XTGTGGCTTTTTT-3', pri\_18). Bei diesem Substrat wird der Primer zwei Nukleotide vom 5'-Ende entfernt initiiert und dann mit einem Desoxynukleotid verlängert. Die Base an Position X wurde in diesem Versuch variiert. Um zu überprüfen, ob das zweite Nukleotid des Primers komplementär zur Substratsequenz sein muss, wurden alle vier Template mit 6 nM [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dGTP und 1 mM ATP getestet.

Wie in Abbildung 3-8 zu sehen ist, kam es nur zur Bildung des Dinukleotids, wenn das entsprechende Nukleotid des Substrats komplementär zum eingesetzten dGTP (also C) war. Für alle anderen Template kam es dagegen nicht zur Bildung sichtbarer Dinukleotide, welche auf einer Misinkorporation des dGTPs gegenüber nicht komplementären Basen beruhen würden.

Die quantitative Auswertung des Gels dieses Versuchs und weiterer vergleichbarer mit anderen markierten Desoxynukleotiden ergab, dass mit diesem Aufbau ein fehlerhafter Einbau von ca. 1/100 des korrekten Nukleotids nachzuweisen wäre.

Dieses Experiment zeigte also, dass ORF904 an der zweiten Stelle des Primers wesentlich genauer diskriminiert als an der ersten und das korrekt paarende Nukleotid bevorzugt inkorporiert.



**Abbildung 3-8: Genauigkeit beim Einbau des zweiten Nukleotids.** Primasereaktionen wurden angesetzt mit 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904 und 4  $\mu\text{M}$  des gezeigten Substrats pri\_18, welches an Position X die jeweils angegebene Base enthielt, außerdem wurden für die Primersynthese 1 mM ATP und 6 nM [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dGTP zugegeben. Ein Dinukleotid-Primer wurde nur mit dem Templat mit dem komplementären Cytidin synthetisiert.

### 3.1.2.1.2. Weitere Positionen des Primers

Zusätzlich zur zweiten Position des Primers sollte die Kopiergenauigkeit des Enzyms an weiteren Positionen des Primers überprüft werden. Dafür wurde Substrat pri\_19 (5'-AGCTTAGCTTGTGTTTTT-3') verwendet. Als Markierung wurden [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP eingesetzt, welches an zweiter Stelle des Primers eingebaut werden konnte und damit den Primer sichtbar machte. Die Sequenzabhängigkeit der Primase an den drei folgenden Positionen des Substrats konnte durch sukzessive Zugabe der einzelnen erforderlichen Desoxynukleotide analysiert werden.

Wie in der ersten Spur in Abbildung 3-9 ersichtlich, wurde bei ausschließlicher Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  dATP ein Dinukleotid (pppAdA) synthetisiert, es kam nicht zu einer Verlängerung dieses kurzen Primers durch Misinkorporation des dATP gegenüber den folgenden Basen. Wenn außerdem eine gleiche Menge dGTP zugesetzt wurde (Spur 2), wurde ein Trinukleotid (pppAdAdG) synthetisiert, es erfolgte wieder keine Verlängerung dieses Primers durch Misinkorporation von dATP bzw. dGTP. Die zusätzliche Zugabe von dCTP (Spur 3) zur Reaktion führte dann zum Großteil zur Synthese eines 4 nt langen Primers (pppAdAdGdC), allerdings trat hierbei auch ein geringer Anteil an ca. 8 nt langem Produkt auf (in der Abbildung nicht zu erkennen). Die quantitative Auswertung des Gels zeigte in diesem Ansatz eine Verlängerung von  $\approx 4\%$  des komplementären Primers. Wenn alle vier Desoxynukleotide in der Reaktion vertreten waren, wurde der

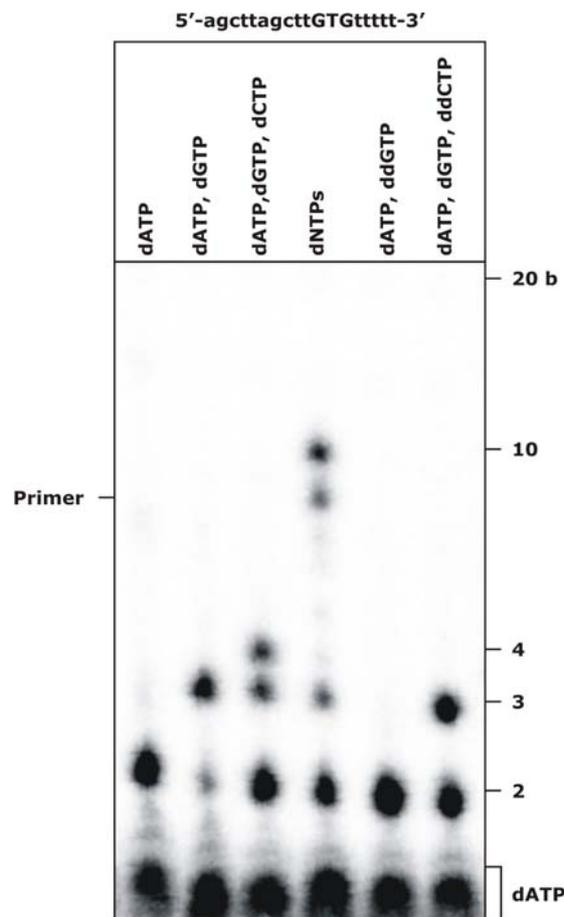
erwartete Vollängenprimer und das Verlängerungsprodukt (10 nt) bis zum 5'-Ende des Substrates synthetisiert (Spur 4).

Dieser Versuch zeigte, dass ORF904 auch an der 3. bis 5. Position des Primers das Templat relativ genau kopiert. Sichtbare Verlängerungen des komplementären Primers finden bei Anwesenheit von nur ein oder zwei verschiedenen Desoxynukleotiden nicht statt, nur bei dem Ansatz mit drei verschiedenen Desoxynukleotiden wurde ein minimaler Anteil des Primers verlängert. Die möglichen Gründe für diese Verlängerung wurden später untersucht (siehe 3.1.2.1.3).

Weiterhin wurde mit diesem Versuchsansatz überprüft, ob ORF904 in der Lage ist Didesoxynukleotide in den Primer zu inkorporieren, wie es z.B. für DnaG aus *E. coli* gezeigt werden konnte (Swart & Griep, 1993). Dazu wurde wieder Substrat pri\_19 verwendet und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP als Label eingesetzt. Ähnlich wie im oberen Versuch wurde überprüft, ob ein komplementärer kurzer Primer durch Zugabe eines paarenden Didesoxynukleotids verlängert wird (Abbildung 3-9). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von 10  $\mu$ M ddGTP nicht zu einer Verlängerung des Dinukleotid-Primers (pppAdA) führte (Spur 5), daraus folgt, dass ddGTP anders als dGTP nicht gegenüber dem Cytidin des Substrats eingebaut werden kann (vgl. Spur 2). Das Ergebnis für die darauf folgende Position des Primers war vergleichbar, die Zugabe von ddCTP führte nicht zu einer Verlängerung des Primers pppAdAdG, also wurde dieses Didesoxynukleotid ebenfalls nicht gegenüber dem komplementären Guanosin inkorporiert. In weiteren Versuchen wurde versucht den Einbau der Didesoxynukleotide zu forcieren, indem komplementäre ddNTPs mit einem 25-fachen Überschuss gegenüber dem korrespondierenden dNTP verwendet wurden (nicht gezeigt). Dies führte allerdings auch nicht zum sichtbaren Einbau der Didesoxynukleotide.

Es lässt sich also schließen, dass der von ORF904 synthetisierte Primer ab der zweiten Position mit einer relativ hohen Genauigkeit als Kopie des Templates erstellt wird, weder nicht-komplementäre Desoxynukleotide noch die natürlich nicht vorkommenden Didesoxynukleotide werden vom Enzym effizient eingebaut. Es muss allerdings beachtet werden, dass mit den durchgeführten Experimenten nur begrenzte Aussagen zur Genauigkeit der Primersynthese von ORF904 getroffen werden können, da die Nachweisbarkeit von Produkten mittels der Gelelektrophorese limitiert ist. Es lässt sich aber sagen, dass die Fehlerrate, die bestimmt werden kann mit  $\approx 0,01$ - $0,02$  niedriger als die vieler anderer Primasen ist.

Beim zweiten Experiment kam es zusätzlich zur Verlängerung eines kleinen Teils des komplementären Primers, wenn nur ein Desoxynukleotid im Ansatz fehlte. In diesem Fall musste nur ein nicht-komplementäres Nukleotid eingebaut werden. Diese Verlängerung passierte anscheinend mit niedriger Frequenz und wurde mit dem nächsten Experiment genauer untersucht.



**Abbildung 3-9: Einbau von nicht-komplementären dNTPs und ddNTPs.** Primasereaktionen wurden angesetzt mit 8  $\mu\text{M}$  des abgebildeten Substrats pri\_19, 0,6 nM [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]dATP, 1 mM ATP und 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904. Außerdem wurden jeweils 10  $\mu\text{M}$  der angegebenen Desoxynukleotide bzw. Didesoxynukleotide zugesetzt. Die aus komplementären dNTPs gebildeten kurzen Primer in Spur 1 bis 3 werden nicht durch Misinkorporation verlängert. In Spur 5 und 6 werden die aus Desoxynukleotiden gebildeten Primer nicht mit ddNTPs verlängert.

### 3.1.2.1.3. „Rutschen“ des Enzyms ist verantwortlich für mögliche Fehler

Die Tatsache, dass die Primersynthese im vorherigen Experiment mit einer geringen Rate zu einem Volllängenprimer führen konnte, obwohl eines der notwendigen Nukleotide fehlte, wurde genauer analysiert.

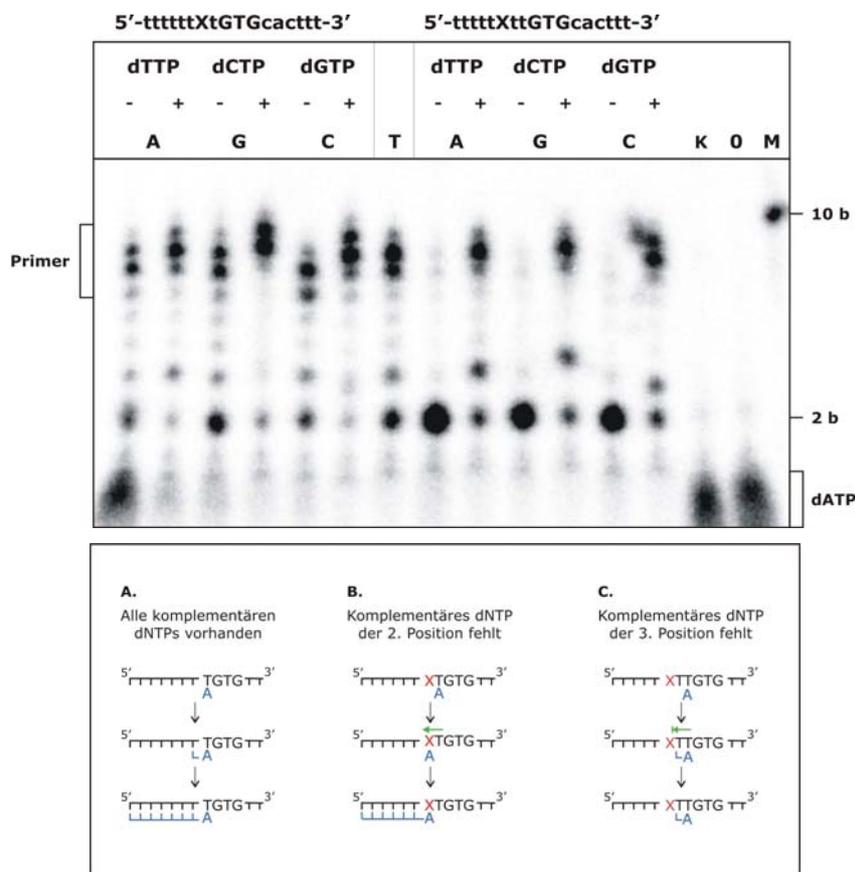
Zum einen wäre es möglich, dass es doch zu einer geringen Misinkorporation eines Nukleotides gegenüber einer nicht-komplementären Base kommt. Allerdings weisen die vorangegangenen Experimente darauf hin, dass dies weniger wahrscheinlich ist. Außerdem bestehen die Möglichkeiten, dass es zum einen zu einem Rutschen des naszierenden Primers mit dem Enzym entlang an der Templat-DNA kommt oder dass die Dislokation einer nicht komplementären Templatbase die Verlängerung des Primers darüber hinaus ermöglicht. Um das zu untersuchen, wurden zwei Substrate ( $\text{T}_6\text{XTGTGCACTTT}$  und  $\text{T}_5\text{XTTGTGCACTTT}$ , pri\_20 und pri\_21) eingesetzt, bei denen das Nukleotid, welches der 2. bzw. 3. Position des Primers gegenüber steht, variierte. Die

restlichen Basen des Templates 5' der GTG-Sequenz waren Thyminde, also sollte das Vorhandensein von dATP und des komplementären Nukleotids zu X zu einem Vollängenprimer führen können, ohne dass Misinkorporation auftritt. Damit konnte überprüft werden, ob ORF904 in Abwesenheit des komplementären Desoxynukleotids für eine Position des Primers, in der Lage ist, trotzdem einen Primer zu synthetisieren.

Im Versuch wurden alle Substrate mit ORF904, 1 mM ATP und 10  $\mu$ M dATP mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP inkubiert, zusätzlich wurden Ansätze mit 10  $\mu$ M des jeweiligen komplementären Desoxynukleotids eingesetzt (Abbildung 3-10). Dabei zeigte sich, dass die Effizienz der Primersynthese mit den Substraten, bei denen die zweite Position des Primers variiert wurde, auch in Abwesenheit der komplementären Desoxynukleotide erstaunlich hoch war (Spur 1,3 und 5). Gleichzeitig fiel auf, dass die Primer, welche nur mit dATP synthetisiert wurden, etwas kürzer waren als die entsprechenden komplementären Produkte.

Im Gegensatz dazu konnte die Primersynthese nur zu einem vergleichsweise geringen Teil stattfinden, wenn das Desoxynukleotid für die 3. Position des Primers im Ansatz fehlte. In diesen Fällen wurden nur mit großer Effizienz Dinukleotide synthetisiert, was mit dem vorhandenen dATP möglich war (Spur 8,10 und 12). Eine Verlängerung dieser Dinukleotide fand aber fast nicht statt (vergleichbar mit 3.1.2.1.2).

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Diskrepanzen zwischen beiden Substrattypen ist, dass ORF904 eine gewisse Freiheit bei der Auswahl des genauen Startpunktes des Primers hat. Möglicherweise kann das Enzym also, wenn das komplementäre Desoxynukleotid für die zweite Position des Primers fehlt, in 5'-Richtung rutschen und den Primer am darauf folgenden Nukleotid beginnen. Das scheint in diesem Experiment der Fall gewesen zu sein, wie die verkürzten Primer in Abwesenheit der komplementären Desoxynukleotide zeigen. Die Art des benutzten Startpunkt-Nukleotids sollte dabei nicht entscheidend sein, da das initiierte ATP, wie gezeigt, sequenzunabhängig eingebaut werden kann. Wie allerdings bei den Substraten mit variabler 3. Primer-Position ersichtlich, ist die Möglichkeit der Auswahl eines geeigneten Startpunktes begrenzt. Es werden keine Primer an diesem 3. Nukleotid initiiert (es treten keinerlei Verlängerungsprodukte in Höhe von ca. 6 nt auf), alle vorhandenen langen Produkte haben ungefähr die selbe Größe wie vergleichbare Vollängenprimer. Der Großteil der Produkte bei diesem Versuch sind Dinukleotidprimer, welche direkt 5' der GTG-Sequenz initiiert wurden und deren Synthese auf Grund der fehlenden komplementären Base abgebrochen wurde. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die kleine Menge der beobachteten Vollängenprimer aus einem Rutschen des Enzyms mitsamt dem gebildeten Dinukleotid-Primers entstanden. Allerdings scheint die Möglichkeit dazu eingeschränkt zu sein, wenn bereits das Dinukleotid gebildet worden ist.



**Abbildung 3-10: Fehlende Desoxynukleotide beeinflussen die Primersynthese. (Oben) Primasereaktionen wurden angesetzt mit 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904, 1 mM ATP und 4  $\mu\text{M}$  der jeweils angegebenen Substrate. Dabei wurden die mit X gekennzeichneten Positionen mit den oben stehenden Nucleotide ersetzt. Außerdem enthielten die Ansätze 10  $\mu\text{M}$  dATP mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP und 10  $\mu\text{M}$  des angegebenen weiteren Desoxynucleotids. K ist eine Kontrolle ohne Enzym, O enthielt kein Templat. (Unten) Schema der Reaktionen. Wenn das komplementäre dNTP vorhanden ist, kommt es zur Synthese des 8 nt Primers (A), wenn das komplementäre dNTP zur zweiten Position fehlt, kommt es zur Synthese eines um 1 nt verkürzten Primers (B) und wenn die dritte Position fehlt, werden zum Großteil Dinucleotide synthetisiert (C).**

Im Ganzen zeigte ORF904 in diesem Experiment eine hohe Kopiergenauigkeit, der Einbau nichtkomplementärer Desoxynucleotide tritt, wie schon gezeigt, nur mit sehr niedrigen Raten auf. Dagegen besteht scheinbar eine gewisse Flexibilität des Komplexes aus Enzym, Nucleotiden und DNA am Startpunkt des Primers, allerdings ist diese Flexibilität auf die Base, welche dem eigentlichen Startpunkt benachbart ist, beschränkt. Mögliche Fehler der Primersynthese sind also vermutlich eher auf ein Rutschen des Enzyms zurückzuführen. Andere Primasen, für welche die Ursache der Misinkorporation von Nucleotiden untersucht wurde, zeigten dagegen, dass der Einbau von nichtkomplementären Nucleotiden wohl eher auf einer schwachen Diskrimination des Enzyms beruht und nicht auf einem Rutschen des Primers (Herpes simplex Primase, Ramirez-Aguilar & Kuchta, 2004)

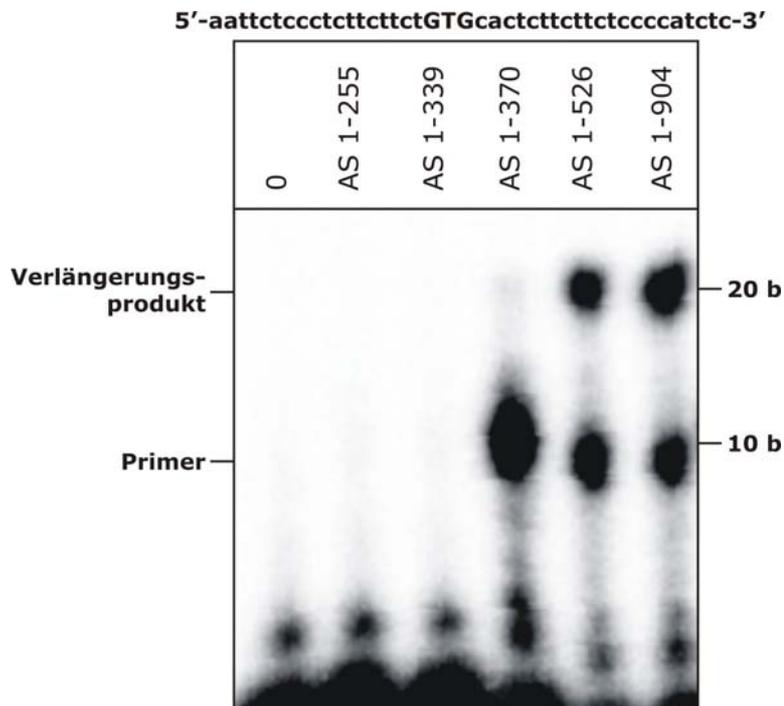
### 3.1.2.2. Weitere Untersuchungen der Primaseaktivität

#### 3.1.2.2.1. Welcher Teil des Proteins bindet die Erkennungssequenz?

ORF904 enthält zwei bekannte Domänen, zum einen eine N-terminale sogenannte Prim/Pol-Domäne und zum anderen eine C-terminale Helikasedomäne (Abbildung 3-11A). Dazwischen befindet sich ein Bereich von ca. 350 Aminosäuren, dessen genaue Funktion nicht geklärt war. Die Prim/Pol-Domäne umfasst die Aminosäuren 40 bis 190 und wurde durch Sequenzhomologien identifiziert. Durch proteolytische Behandlung wurde gefunden, dass der Bereich der Aminosäuren 40 – 255 im Protein vermutlich eine stabil gefaltete Domäne innerhalb des Proteins bildet. Dort befindet sich das aktive Zentrum für die Primase- und Polymeraseaktivität, welches durch die Untersuchung der Aktivität von Punktmutanten identifiziert werden konnte. Allerdings war auch bekannt, dass dieser Teil des Proteins nicht ausreicht, um einen Primer mit einzelsträngiger Plasmid-DNA als Substrat zu synthetisieren. Der minimale Proteinanteil, der zur Synthese eines Primers mit M13-DNA fähig ist, umfasst die Aminosäuren 1 bis 370 (Lipps *et al.*, 2004).

Es wurde nun mit einem Substrat mit GTG-Motiv (pri\_3) untersucht, welcher Bereich des Proteins für die Erkennung der Sequenz und die Synthese eines Primers mit einer einzelsträngigen, kurzen DNA notwendig ist. Dafür wurden eine Reihe von Deletionsmutanten in Primaseassays mit Substrat pri\_3 eingesetzt (Abbildung 3-11B). Die gestesteten Deletionsmutanten AS 1-255 (C255) und AS 1-339 (C339) umfassten die Prim/Pol-Domäne und kleine Teile des unbekanntes Bereichs. Wie bereits mit M13-DNA zuvor zeigten sie keinerlei Primaseaktivität. Dagegen war AS 1-370 (C370) in der Lage, sehr effizient einen Vollängenprimer zu synthetisieren. Im Gegensatz zu AS 1-526 (C526), welche keinen Teil der Helikasedomäne enthalten und dem Vollängenprotein (AS 1-904) konnte dieser Primer allerdings nicht bis zum Ende des Templats verlängert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der vollständige Bereich 255-370 zum Erkennen der DNA-Sequenz oder zur Primersynthese notwendig sind, während AS 370-526 zusätzlich nötig sind, um diesen Primer zu verlängern. Möglicherweise erhöht dieser Bereich des Proteins die Bindung an Templat oder Primer und führt damit zu einer effizienteren Elongation. Die Deletionsmutante C526 zeigte das gleiche Verhalten wie das Vollängenprotein, was zusätzlich darauf hinweist, dass die Helikasedomäne an der Primersynthese und –verlängerung keinen Anteil hat. Für das Gen 4-Protein von T7, welches eine vergleichbare Organisation mit der N-terminalen Primase- und einer C-terminalen Helikase-Domäne hat, konnte gezeigt werden, dass eine Deletionsmutante welche nur die Primase-Domäne enthält, ebenfalls eine dem Vollängenprotein vergleichbare Primaseaktivität hat. Außerdem verfügt die Helikasedomäne dieses Proteins, ebenso wie vermutlich die von ORF904, über die Fähigkeit zu hexamerisieren.

Die Primaseaktivität kann allerdings in beiden Fällen auch von monomeren Enzymen katalysiert werden (Frick *et al.*, 1998).



**Abbildung 3-11: Primaseaktivität von Deletionsmutanten. (A) Aufbau von ORF904 und den Deletionsmutanten, Prim/Pol- und Helikasedomäne sind gezeigt (B) Primaseaktivität der Deletionsmutanten mit Substrat pri<sub>3</sub>. Reaktionen wurden durchgeführt mit 0,4 µM des jeweiligen Proteins sowie 4 µM Substrat, 1 mM ATP und 10 µM dNTPs mit [α-<sup>32</sup>P]dATP. Angegeben sind die Aminosäuren, welche die jeweilige Deletionsmutante umfassen. Die ersten 370 Aminosäuren sind für die Synthese eines Primers notwendig, für die Verlängerung sind die ersten 526 Aminosäuren erforderlich.**

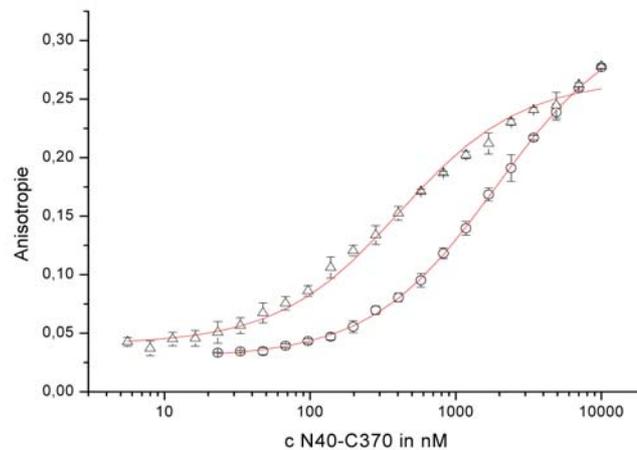
### 3.1.2.2.2. Bindung von Substraten mit Erkennungssequenz

Die Erkennung der spezifischen GTG-Sequenz durch das Protein könnte durch eine erhöhte Affinität für DNA mit dieser Sequenz gekennzeichnet sein. Dies wurde mittels Fluoreszenzanisotropiemessungen untersucht. Verwendet wurden dafür zwei einzelsträngige Oligodesoxynukleotide, welche am 3'-Ende mit Fluorescein markiert waren (pri<sub>22</sub> und pri<sub>23</sub>). Beide waren 17 nt lang, Oligo pri<sub>22</sub> enthielt das GTG-Motiv und konnte deshalb vom Enzym als Substrat für die Primersynthese genutzt werden (pri<sub>7</sub>, Spur 5, Abbildung 3-2). Die Sequenz des zweiten verwendeten Oligodesoxynukleotids war identisch, bis auf die Tatsache, dass GTG in GAG verändert wurde und dass dieses Oligo demzufolge nicht als Primase-Templat dienen kann.

Das Protein, welches in diesem Experiment eingesetzt wurde, war eine Deletionsmutante, welche die Aminosäuren 40 bis 370 umfasste. Dieser Bereich ist ausreichend für die volle Primersynthese. Damit erlaubte es dieses Protein, die Bindung der Primasedomäne an DNA zu messen. Eventuelle störende Effekte der C-terminalen Helikasedomäne, welche

relativ stark unspezifisch DNA bindet, wurden damit ausgeschlossen. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Diese Temperatur liegt zwar unter der optimalen Reaktionstemperatur von ORF904 (60 bis 70 °C), allerdings war die Bindung bei dieser Temperatur ausreichend stark und die Durchführung des Versuchs vereinfacht.

Die Messungen ergaben für das Substrat mit dem Erkennungsmotiv einen  $K_d$  von  $225 \pm 5$  nM (siehe auch Abbildung 3-12). Wenn die Erkennungssequenz in einer Base verändert war, sank die Affinität für das DNA-Substrat etwa um das fünffache, der  $K_d$  betrug jetzt  $1200 \pm 80$  nM.



**Abbildung 3-12: DNA-Bindung. Die Bindung der ORF904-Deletionsmutante N40-C370 an Substrate pri\_22 (Dreiecke) und pri\_23 (Kreise) wurde mit Fluoreszenzanisotropiemessungen bestimmt. Zu sehen sind die Datenpunkte aus jeweils drei unabhängigen Messungen und die ermittelte Regressionskurve. Aus diesen Daten wurden die Dissoziationskonstanten ermittelt (siehe Text).**

Daraus ist ersichtlich, dass die korrekte Erkennungssequenz zu einer höheren Affinität des Proteins für die DNA führt, DNA ohne dieses Sequenzmotiv wird deutlich schwächer gebunden. Da Substrat pri\_23 aber trotzdem noch relativ gut gebunden wird, ist es wahrscheinlich, dass das Enzym zusätzliche Möglichkeiten hat, DNA zu binden, welche nicht von dem Erkennungsmotiv abhängen.

Für die Primase DnaG aus *E. coli* wurden vergleichbare Messungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei dieser Primase die Affinität für eine DNA, welche die Erkennungssequenz enthält nur leicht erhöht war gegenüber der für ein  $(dT)_{25}$ -Substrat. Der  $K_d$  für diese Substrate betrug 120 bzw. 140 nM (Khopde *et al.*, 2002). Vermutlich ist die erhöhte Affinität zur Erkennungssequenz nur ein Faktor, der die Initiierung der Replikation reguliert.

### 3.1.2.2.3. Kinetische Untersuchungen der Primersynthese

Um den Mechanismus der Primersynthese besser zu verstehen, wurde die Kinetik der von ORF904 katalysierten Reaktion untersucht. Dazu wurde erneut die Sequenzspezifität des Proteins genutzt. Es wurden zwei Substrate eingesetzt (pri\_17 und pri\_24), diese wurden so gewählt, dass durch Zugabe von dATP und ATP Primer mit definierter Länge synthetisiert werden. Mit Substrat pri\_17 wurde ein Volllängenprimer (8 nt) synthetisiert und für diese Reaktion wurden der apparente  $K_m$  und  $V_{max}$  für den Einbau von ATP und dATP sowie für Templat-DNA bestimmt. Die Verwendung von Substrat pri\_24 führte dagegen mit ATP und dATP zur Synthese eines Dinukleotidprimers, dieses Substrat wurde zur Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{max}$  für die Inkorporation von dATP an der zweiten Stelle des Primers benutzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde bestimmt, indem die Konzentration eines Parameters variiert wurde, während die anderen beiden in saturierenden Mengen eingesetzt wurden (ATP: 1 mM, dATP 100  $\mu$ M und Templat-DNA: 6  $\mu$ M). Die Primersynthese wurde mit Hilfe von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP quantifiziert, die Produkte wurden mittels Polyacrylamidgelen aufgetrennt und der Anteil inkorporierter Radioaktivität wurde ermittelt.

Für die Inkorporation von dATP in den Volllängenprimer wurde für Substrat pri\_17 ein apparenter  $K_m$  von 32  $\mu$ M ermittelt und für den Einbau an zweiter Position des Primers mit Substrat pri\_24 ergab sich ein ähnlicher Wert von 35  $\mu$ M. Für beide Experimente ergab sich außerdem eine  $V_{max}$  von  $\approx 0,38$  pmol dATP/min. Dies zeigt, dass der Einbau von dATP an jeder Stelle des Primers mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgte. Die ermittelten Werte für den apparenten  $K_m$  sind vergleichbar mit veröffentlichten Werten anderer Primasen. So schwanken die bisher ermittelten  $K_m$ -Werte für eine Anzahl eukaryotischer Primasen von 8-175  $\mu$ M NTP (Frick & Richardson, 2001), für die Primase von *Sulfolobus solfataricus* wurde ein Wert von 25  $\mu$ M bestimmt (Lao-Sirieix & Bell, 2004).

Für den Einbau von ATP wurde mit 150  $\mu$ M ein etwas höherer  $K_m$  als für dATP ermittelt, die Affinität für ATP war also ungefähr vierfach niedriger als für dATP. Außerdem fiel auf, dass hohe Konzentrationen an ATP und zu einem geringeren Teil dATP die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamten (Abbildung 3-13 B,C). Ob dies auf eine spezifische Hemmung der Reaktion durch hohe Nukleotidkonzentrationen oder eher durch andere Faktoren hervorgerufen wurde, ist nicht klar. Um eine Verfälschung der Ergebnisse dadurch zu vermeiden, wurden zur Berechnung der Regressionsgeraden in solchen Fällen nur die Werte bis zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen. Zusätzlich wurde für das getestete Substrat ein apparenter  $K_m$  von 200 nM Oligodesoxynukleotid bestimmt. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Affinität, die mit der Fluoreszenzanisotropiemessung ermittelt wurde.

Alle bestimmten Werte sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Außerdem sind Daten und Regressionsgeraden für je ein exemplarisches Experiment in Abbildung 3-13 gezeigt.

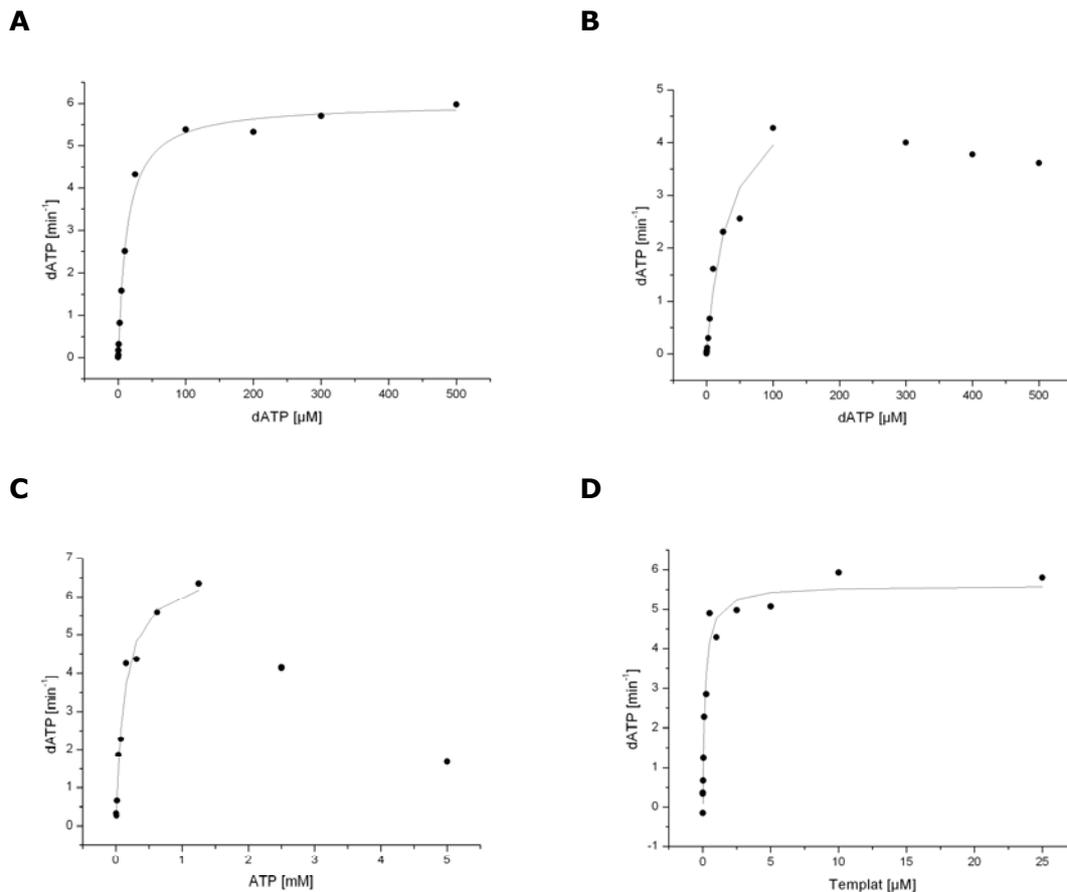
**Tabelle 3-1:  $K_m$  und  $V_{max}$  der Primersynthese durch ORF904**

	Dinukleotid				Volllängenprimer			
	$K_m$ $\mu M$	$V_{max}$ (pmol dATP $min^{-1}$ )	$K_{cat}$ (mol dATP $min^{-1}$ $mol$ Protein $^{-1}$ )	Dinukleotid $min^{-1}$ Protein $^{-1}$	$K_m$ $\mu M$	$V_{max}$ (pmol dATP $min^{-1}$ )	$K_{cat}$ (mol dATP $min^{-1}$ $mol$ Protein $^{-1}$ )	Volllängenprimer $min^{-1}$ Protein $^{-1}$
dATP	35±15	0,38±0,07	9,5±1,75	9,5±1,75	32±9,5	0,38±0,192	9,5±4,8	1,35±0,64
ATP	-	-	-	-	150±40	0,27±0,002	6,75±0,05	0,96±0,007
Templat	-	-	-	-	0,2±0,06	0,23±0,024	5,75±0,6	0,82±0,09

Aus den ermittelten Werten wird ersichtlich, dass je Proteinmolekül ungefähr ein Volllängenprimer pro Minute synthetisiert wird. Dies weist darauf hin, dass ORF904 ein relativ langsames Enzym ist. Vergleiche mit anderen Primasen zeigen allerdings ähnliche Werte. So ist die Primase von *E. coli* beispielsweise in der Lage (mit Zugabe der Helikase DnaB) 0,74 Primer/min zu synthetisieren (Johnson *et al.*, 2000) und für die Primase aus Kalbsthymus lag der Wert mit 0,18 Primer/min etwas niedriger (Sheaff & Kuchta, 1993). Wenn man die *Sulfolobus solfataricus* Primase zum Vergleich heranzieht, zeigt diese eine wesentlich niedrigere Primaseaktivität von 0,1 pmol dATP/min/ $\mu g$ , was, wenn man eine durchschnittliche Primerlänge von 7 nt annimmt, etwa 0,001 Primer/min entspricht (Lao-Sirieix & Bell, 2004).

Wenn man die Rate für den Einbau des zweiten Nukleotids und die für die Bildung des gesamten Primers betrachtet, fällt auf, dass die Bildung eines Dinukleotids ca. 7mal schneller ist als die Bildung eines Volllängenprimers (9,5/min vs. 1,35/min). Die Synthese des Dinukleotids begrenzt also nicht die Geschwindigkeit der Reaktion, sondern die Elongation des Primers und die Verknüpfung des ersten Desoxynukleotids erfolgen mit der gleichen Rate (ca. 5 bis 10 Nukleotide pro Minute).

Dies sollte dazu führen, dass während der Synthese des Primers keine Dinukleotide akkumulieren, was in den bisherigen Experimenten auch beobachtet wurde. Hauptsächlich produzierte ORF904 Volllängenprimer, was auf eine hohe Prozessivität des Enzyms schließen lässt. Dies wurde im folgenden Experiment noch genauer untersucht.

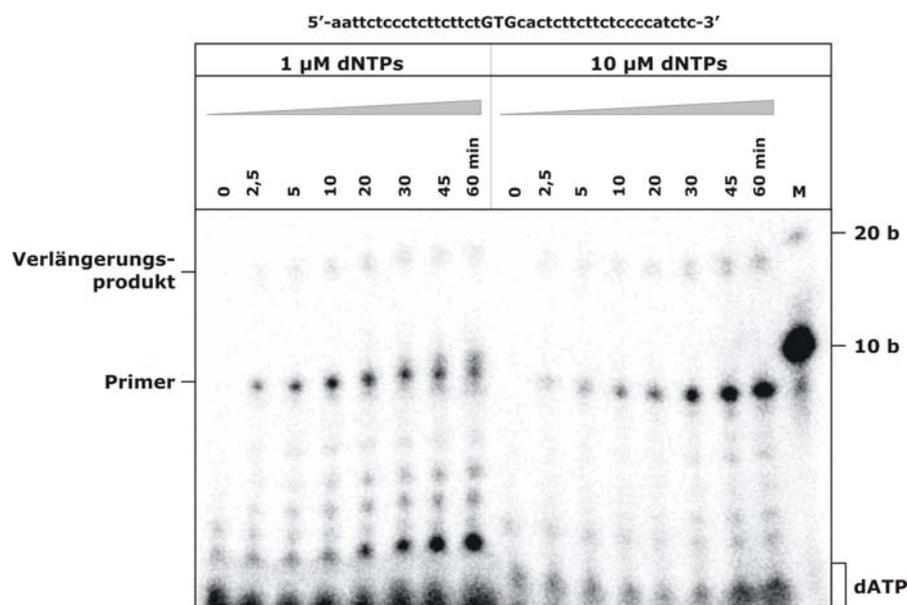


**Abbildung 3-13: Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{max}$  für ATP, dATP und DNA-Substrat.** Konzentrationen von jeweils dATP, ATP bzw. Templat wurden variiert, während die beiden anderen Parameter im Überschuss vorhanden waren. Gezeigt sind Datenpunkte und Regressionsgerade für (A) dATP an 2. Stelle des Primers (B) dATP für den Vollängenprimer (C) ATP für den Vollängenprimer und (D) Templat-DNA für den Vollängenprimer. In (B) und (C) kam es bei hohen Nukleotidkonzentrationen zu einer Inhibition der Reaktion, deshalb wurden jeweils nur die Werte vor dem Abfall der Geschwindigkeit in die Berechnung der kinetischen Parameter einbezogen.

Die kinetischen Untersuchungen hatten ergeben, dass die Primersynthese durch ORF904 relativ langsam ist. Um zu untersuchen, ob dies durch eine hohe Dissoziationsrate des Proteins vom Primer/Templat-Komplex verursacht wird, wurden die Produkte der Primersynthese mit einem Zehntel der Enzymmenge der bisherigen Versuche ( $0,04 \mu\text{M}$ ) in verschiedenen kurzen Abständen über den Verlauf von 60 min visualisiert. In den bisherigen Experimenten wurden die Produkte dagegen standardmäßig nach 15 min mit Hilfe eines Gels aufgetrennt. Dabei traten jeweils hauptsächlich Vollängenprimer auf, allerdings könnten diese auch in der relativ langen Inkubationszeit durch Verlängerung kürzer Abbruchprodukte gebildet worden sein. Der Zeitverlauf der Primersynthese wurde mit Substrat pri\_3 untersucht. Mit diesem Substrat konnte sowohl ein Primer gebildet werden als auch ein Verlängerungsprodukt von 18 nt. Um den möglichen Einfluss der

Nukleotidkonzentration mit zu berücksichtigen, wurden 1 und 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP eingesetzt.

Wie in Abbildung 3-14 gezeigt, kam es beim Vorhandensein von 10  $\mu\text{M}$  dNTPs hauptsächlich zur Synthese von Vollängenprimer (und dem vollständigen Verlängerungsprodukt), kürzere Oligonukleotide traten kaum auf. Dagegen führte die niedrigere Desoxynukleotidkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  vermehrt zum Abbruch der Primersynthese, es traten hierbei eine Reihe kürzerer Produkte auf. Dies zeigt, dass ORF904 eine hohe Prozessivität hat. Es kommt, unter der Bedingung, dass ausreichend dNTPs vorhanden sind, kaum zur Dissoziation des Proteins von der DNA, ein Grossteil aller einmal geformten Dinukleotide werden zum Vollängenprimer elongiert. Es gibt zwar bisher keine Untersuchungen zur *in vivo* dNTP-Konzentration in Archaea, aber zusammenfassende Studien eukaryotischer Zellen ermittelten 5-37  $\mu\text{M}$  je dNTP (Traut, 1994). Dies korrespondiert auch mit dem für ORF904 ermittelten  $K_m$  für dATP, welcher  $\approx 35 \mu\text{M}$  beträgt.



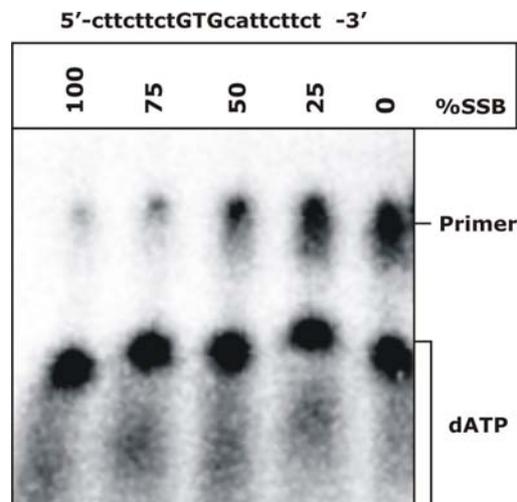
**Abbildung 3-14: Zeitverlauf der Primersynthese.** Primaseassays wurden durchgeführt mit 4  $\mu\text{M}$  Substrat pri\_3 und 0,04  $\mu\text{M}$  ORF904. Außerdem wurden entweder 1 oder 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP und 1 mM ATP zugegeben. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und gestoppt. Es kam bei der Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  dNTPs überwiegend zur Synthese von Vollängenprimern, dagegen traten mit 1  $\mu\text{M}$  dNTPs vermehrt kürzere Abbruchprodukte auf.

#### 3.1.2.2.4. Einfluss des Einzelstrangbindeproteins auf die Primaseaktivität

Die Interaktion von Einzelstrangbindeprotein (SSB) und Primase ist für *E. coli* besonders gut untersucht. Für die Initiation der Replikation des Phagen G4 ist die Bedeckung des Replikationsursprungs mit SSB notwendig, dabei bleibt die Erkennungssequenz der Primase unbedeckt und nur die Anwesenheit von RPA ermöglicht der Primase eine

spezifische Bindung an das DNA-Templat (Sun & Godson, 1998; Sun & Godson, 1993). Dagegen kann die *E. coli* Primase auf kurzen, einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden Primer bilden, auch wenn kein SSB gebunden ist, eine vollständige Bedeckung mit SSB führt dabei sogar zu einer vollständigen Hemmung der Primersynthese (Swart & Griep, 1993).

Ein möglicher Einfluss des Einzelstrangbindepoteins RPA aus *Sulfolobus solfataricus* wurde für ORF904 untersucht. Dafür wurde ein Primaseassay mit Substrat pri\_25 durchgeführt, bei dem das Substrat mit steigenden Konzentrationen von RPA bedeckt war. Für die Bedeckung wurde das Templat vor dem Assay mit einer Menge RPA inkubiert, die einer Bedeckung von 0 bis 100 % des Templats mit RPA entspricht. Für die 100%ige Bedeckung wurde eine Abdeckung von 1 Molekül RPA pro 5 Nukleotide angenommen (Haseltine & Kowalczykowski, 2002). Danach wurden ATP, dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP und Protein zugegeben um die Primersynthese zu starten.



**Abbildung 3-15: Einfluss des Einzelstrangbindepoteins. 4  $\mu$ M Substrat pri\_25 wurde mit RPA von *S. solfataricus* inkubiert, danach wurden 1 mM ATP, 10  $\mu$ M dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP und 0,4  $\mu$ M Protein zugegeben. Mit steigender Bedeckung mit RPA kann weniger Primer gebildet werden, bei 100% ist er fast ganz verschwunden.**

Dabei zeigte sich (Abbildung 3-15), dass es mit steigender RPA-Bedeckung zu einem Rückgang der Primersynthese kam, bis zum fast vollständigen Verschwinden des Primers bei der vollständigen Bedeckung. Dies zeigt, dass sich ORF904 in diesem Experiment ähnlich wie die *E. coli* Primase verhält und so keine Aussagen über eine mögliche Interaktion des Proteins mit RPA gemacht werden können. Genauere Kenntnisse über den Replikationsursprung von pRN1 sind nötig, um einen möglichen Einfluss von RPA auf die Primaseaktivität *in vivo* zu identifizieren.

### 3.1.3. Zusätzliche Aktivität der Prim/Pol-Domäne

#### 3.1.3.1. ORF904 besitzt terminale Transferaseaktivität

Im Experiment aus 3.1.1.1.1 fiel auf, dass ORF904 mit einigen der getesteten Oligodesoxynukleotide in der Lage war überlange Produkte (länger als das Templat) zu synthetisieren und dabei kein ATP benötigte. Da, wie gezeigt, für die Bildung eines Primers strikt ATP benötigt wird, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich beispielsweise um eine Nebenreaktion handelte, bei der ein eventuell gebildeter Primer mehrfach von der DNA dissoziierte und nach einem erneuten Binden verlängert wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die verwendeten Desoxynukleotide Sekundärstrukturen bilden, bei denen das 3' Ende so gebunden vorliegt, dass es ein freies 3' OH-Ende eines Doppelstrangs simuliert und somit von ORF904 verlängert werden kann. Dies wurde durch eine Analyse der verwendeten Oligodesoxynukleotide mit Mfold (Zuker, 2003) ausgeschlossen. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen waren damit bei keinem der getesteten Template Sekundärstrukturen identifizierbar, mit denen eine Elongation der DNA denkbar wäre.

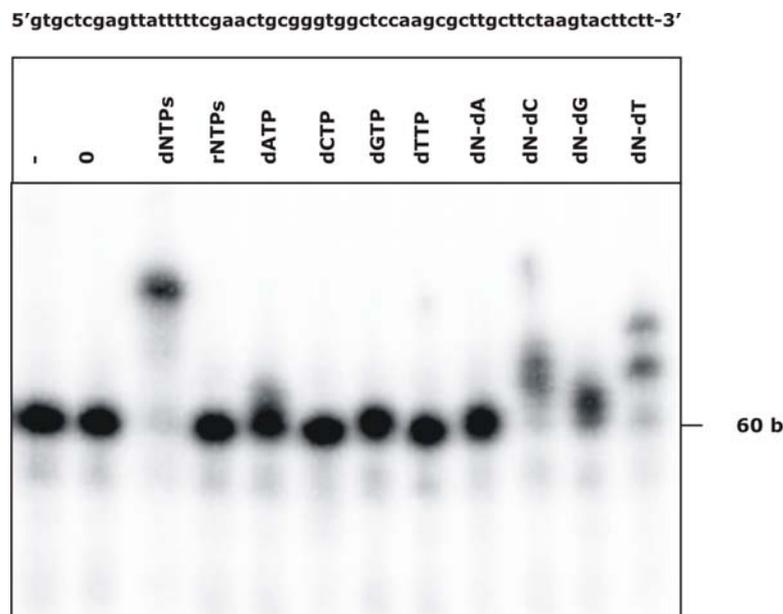
Allerdings ist veröffentlicht, dass die zelluläre Primase des Archaeons *Sulfolobus solfataricus* in der Lage ist, DNA-Template durch die Addition von Nukleotiden an das 3' Ende zu verlängern, also als terminale Transferase zu fungieren (De Falco *et al.*, 2004; Lao-Sirieix & Bell, 2004).

Um zu überprüfen, ob die beobachteten überlangen Produkte auf eine mögliche terminale Transferaseaktivität von ORF904 zurückgingen, wurde das Protein mit 5' <sup>32</sup>P-markiertem Oligodesoxynukleotid (Substrat Tt\_1) und verschiedenen Nukleotiden inkubiert (Abbildung 3-16). Dabei ist ersichtlich, dass es durch die Zugabe von dNTPs zu einer Verlängerung des DNA-Substrats kommt (Spur 3), ORF904 also in der Lage zu sein scheint, Nukleotide ohne Vorliegen eines Templats an das 3' Ende zu knüpfen. Mit den ebenfalls getesteten Ribonukleotiden kommt es nicht zu einer Verlängerung der DNA (Spur 4), diese werden also auch in dieser Reaktion nicht vom Enzym verwendet. Zusätzlich wurden in diesem Experiment einzelne Desoxynukleotide und dNTP-Mixe, bei denen jeweils ein Nukleotid fehlte, getestet. Mit den einzelnen Desoxynukleotiden kam es nur mit dATP zu einer minimalen Verlängerung des Substrats, mit allen anderen war keine Verlängerung zu sehen. Die unvollständigen dNTP-Mixe genügten interessanterweise auch nicht für eine komplette Verlängerung (wie im Ansatz mit allen dNTPs beobachtet), es wurde nur um wenige Nukleotide verlängert bzw. wenn dATP fehlte gar nicht. Die terminale Transferaseaktivität von ORF904 kann also nur dNTPs umsetzen, analog wie es bereits für die Primersynthese beobachtet wurde. Zusätzlich scheinen alle dNTPs nötig zu sein für eine optimale Verlängerung, es werden also nicht zufällig Nukleotide verknüpft, sondern vermutlich werden die Nukleotide in einer bestimmten Sequenz angeordnet. Dies wurde in weiteren Experimenten mit anderen

Substraten überprüft, wobei sich ergab, dass nicht für jedes Substrat die gleichen Desoxynukleotide notwendig sind, möglicherweise nimmt die Sequenz der DNA Einfluss auf die Nukleotide, welche für die terminale Verlängerung verwendet werden.

Es wurden auch DNA-Substrate identifiziert mit denen keinerlei Verlängerung möglich war (z.B. Substrat pri\_2), es schien generell an der Sequenz des 3' Endes zu liegen, ob eine DNA als Substrat verwendet werden konnte.

Interessant ist auch, dass es mit den dNTPs zu einer relativ einheitlichen Verlängerung aller DNA-Substrate kommt, was an der scharfen Bande des Verlängerungsprodukts zu erkennen ist. Im Vergleich dazu verlängert die Primase von *S. solfataricus* unspezifischer und es entsteht eine Bandbreite an verschiedenen langen Produkten (Lao-Sirieix & Bell, 2004; De Falco *et al.*, 2004). Dieses Enzym war auch in der Lage Verlängerungen mit rNTPs und dNTPs zu katalysieren (De Falco *et al.*, 2004).

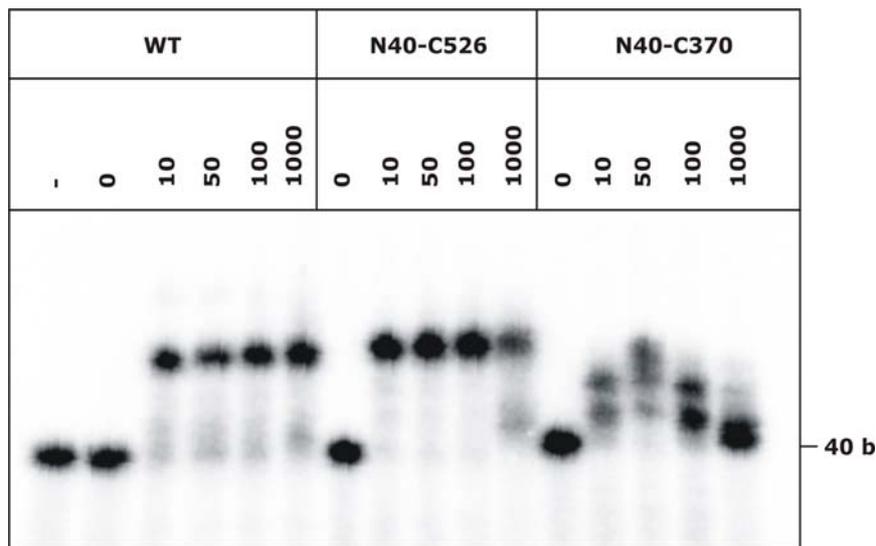


**Abbildung 3-16: Terminale Transferaseaktivität von ORF904.** Es wurden 25 nM des Substrats Tt\_2 am 5' Ende radioaktiv markiert und inkubiert mit 0,4  $\mu$ M ORF904 und 100  $\mu$ M der angegebenen (Desoxy)Nukleotide. Dabei bedeutet dN-dX einen Mix mit jeweils 100  $\mu$ M aller dNTPs außer dX, - ist die markierte DNA und für 0 wurde nur Protein zugegeben. Mit dNTPs wurde das Substrat signifikant verlängert, wenn nur ein Desoxynukleotid fehlte, konnte die Verlängerung nicht effizient stattfinden.

### 3.1.3.2. Untersuchung der Aktivität der Deletionsmutanten

Welcher Teil des Proteins für die terminale Transferaseaktivität notwendig ist, wurde mit Substrat Tt\_2 untersucht. Dabei wurde analog zum vorigen Experiment vorgegangen: das Substrat wurde am 5' Ende radioaktiv markiert und dann mit dem jeweiligen Protein und verschiedenen Mengen an dNTPs inkubiert. Die untersuchten Proteine waren ORF904 und zwei Deletionsmutanten, welche die AS 40-370 (N40-C370) bzw. 40-526 (N40-

C526) umfassten. Die beiden verwendeten Proteine verfügen über volle Primaseaktivität. Wie in Abbildung 3-17 zu sehen, verlängerte N40-C526 das DNA-Substrat dabei genauso wie das Wildtyp-Protein. Dagegen konnte N40-C370 nur eine vergleichsweise geringe Elongation durchführen. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass diese beobachtete terminale Transferaseaktivität nicht auf einer templatgebundenen Verlängerung des 3' Endes beruht, da N40-C370 in vergleichbaren Polymeraseassays volle Polymeraseaktivität hat (3.2.2). Vermutlich ist, wie möglicherweise auch in 3.1.2.2.1, N40-C370 nicht in der Lage, die DNA ausreichend zu binden und kann deshalb nicht effizient verlängern.



**Abbildung 3-17: Transferaseaktivität der Deletionsmutanten von ORF904. 25 nM des Substrates Tt\_1 wurden 5' radioaktiv markiert und mit 0,4  $\mu$ M Protein und der angegebenen Menge ( $\mu$ M) dNTPs inkubiert. Wildtyp ORF904 und N40-C526 waren in der Lage das Substrat effizient zu verlängern, N40-C370 konnte nur geringe Verlängerungen synthetisieren.**

Die genaue Bedeutung der beobachteten terminalen Transferaseaktivität ist nicht klar. Wie bereits erwähnt wurde eine vergleichbare Aktivität bei der Primase von *Sulfolobus solfataricus* entdeckt. Interessanterweise weist das aktive Zentrum archaealer Primasen (*Pyrococcus furiosus*) strukturelle Ähnlichkeiten mit Mitgliedern der eukaryotischen DNA Polymerase-Familie X auf (Augustin *et al.*, 2001). Die eukaryotische terminale Nukleotidyltransferase (TdT) ist auch ein Mitglied dieser Polymerase-Familie, dieses Enzym katalysiert die Elongation von DNA- und RNA-Substraten mit dNTPs oder auch rNTPs (Gottesman & Canellakis, 1966; Boule *et al.*, 2001). Außerdem konnte für zwei DNA-Polymerasen (Pol  $\mu$  und Pol  $\lambda$ ) dieser Familie nachgewiesen werden, dass sie ebenfalls über eine terminale Transferaseaktivität verfügen (Dominguez *et al.*, 2000; Ramadan *et al.*, 2003). Zusätzlich verfügen die genannten Polymerasen und TdT über die Fähigkeit DNA *de novo* zu synthetisieren (Ramadan *et al.*, 2004) und es bestehen

Sequenzhomologien zwischen eukaryotischen Primasen und Familie X DNA-Polymerasen (Kirk & Kuchta, 1999). Auch gibt es strukturelle Übereinstimmungen des aktiven Zentrums von ORF904 und der *P. furiosus* Primase (Lipps *et al.*, 2004). Es ist also möglich, dass diese Enzyme trotz ihrer unterschiedlichen evolutionären Herkunft ähnliche Reaktionen katalysieren. Die genaue Funktion dieser Aktivitäten *in vivo* ist allerdings noch weitgehend ungeklärt, möglicherweise sind diese Enzyme in DNA-Reparaturprozesse involviert. Es kann aber auch sein, dass das aktive Zentrum von ORF904 diese Transferase-Reaktion nur als Nebenreaktion katalysiert.

## 3.2. Struktur der Primasedomäne mit DNA-Matrize

### 3.2.1. Kristallisation des Proteins

Die bisherigen Experimente gaben Aufschluss über die Anforderungen von ORF904 an das DNA-Substrat für die Primersynthese, außerdem konnten der Aufbau des synthetisierten Primers und weitere Eigenschaften des Enzyms identifiziert werden. Es war allerdings immer noch nicht möglich, genaue Aussagen über den Mechanismus der Primersynthese, die beteiligten Aminosäuren und die Bindung des Templats an das Protein zu machen. Um dies zu ermöglichen wurde versucht, die Kristallstruktur eines Protein-DNA-Komplexes zu bestimmen. Die bisher gewonnenen Kenntnisse konnten dabei genutzt werden, die optimalen Proteine und DNA-Substrate dafür zu finden.

Es wurden bereits die Strukturen einer kleinen Anzahl von Primasen bestimmt. Von der Primase (DnaG) aus *E. coli*, welche aus N-terminaler Zinkbindedomäne (ZBD), RNA-Polymerase-Domäne (RPD) und C-terminaler Domäne (CTD) für die Interaktion mit der replikativen Helikase besteht, konnten bis jetzt nur isolierte Strukturen für die letzten beiden Domänen bestimmt werden (Keck *et al.*, 2000b; Oakley *et al.*, 2005). Die Struktur der Zinkbindedomäne wurde bisher nur für eine verwandte Primase des DnaG-Typs aus *Bacillus stearothermophilus* aufgeklärt (Pan & Wigley, 2000). Außerdem konnte für *Aquifex aeolicus* die Struktur der Primase bestehend aus der ZBD und der RPD bestimmt werden (Corn *et al.*, 2005). Die Struktur des gesamten Proteins liegt bisher nicht vor, da die einzelnen Domänen vermutlich flexibel miteinander verbunden sind.

Die erste Primase der archaeal-eukaryotischen Familie, deren Struktur aufgeklärt wurde, war die kleine katalytische Untereinheit der Primase von *Pyrococcus furiosus* (Augustin *et al.*, 2001). Mittlerweile wurden mit der kleinen UE der *P. horikoshii* Primase und einem zentralen Teil der großen und kleinen Untereinheit der Primase von *Sulfolobus solfataricus* die Strukturen weiterer nah verwandter Primasen der Archaea gelöst (Ito *et al.*, 2003; Lao-Sirieix *et al.*, 2005a). Strukturen eukaryotischer Primasen liegen noch nicht vor. Obwohl die Enzyme sehr ähnliche Reaktionen katalysieren, ähneln sich die Strukturen der Primasen der prokaryotischen und der archaeal-eukaryotischen Familie nicht.

Die Struktur der minimalen funktionellen Primasedomäne (AS 40-255) von ORF904 konnte auch bereits gelöst werden. Dabei wurde dieser Bereich der Primasedomäne gewählt, weil er durch proteolytischen Verdau des Vollängenproteins als stabil identifiziert wurde. Nachteilig ist allerdings, dass diese Aminosäuren nicht für die Primaseaktivität ausreichen (siehe auch 3.1.2.2.1), allerdings ist dieses Protein in der Lage einen existierenden Primer zu verlängern, besitzt also Polymeraseaktivität. Mit Hilfe der Struktur konnte das aktive Zentrum der Primasedomäne von ORF904 identifiziert werden, drei saure Aminosäuren, welche ein katalytisches Manganion koordinieren,

außerdem wurde gezeigt, dass ORF904, wie alle anderen Primasen, ein Zinkbindemotiv enthält, welches ein Zinkion fest komplexiert (Lipps *et al.*, 2004). Vermutlich ist dieses Zinkmolekül bei Primasen an der Interaktion mit der Templat-DNA beteiligt (Lao-Sirieix & Bell, 2004; Kato *et al.*, 2004), es wird allerdings unterschiedlich von den Proteinen gebunden. Generell zeigt die Struktur von ORF904 keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, allerdings konnte für die Region des aktiven Zentrums eine Ähnlichkeit zu einer zentralen Region der *P. furiosus* Primase festgestellt werden (Lipps *et al.*, 2004).

Da die Struktur der Primasen sich von den bereits gut untersuchten DNA-Polymerasen unterscheidet, ist es schwierig, diese heranzuziehen um die genauen Vorgänge bei der Primersynthese abzuleiten. Die bisher vorhandenen Modelle zur Bindung des Substrats, zur Erkennung der Startsequenz und zur Synthese des Primers wurden mit den Strukturen der vorhandenen Apoproteine erstellt und sind deshalb spekulativ. Demzufolge ist es notwendig, Strukturen mit gebundenen Nukleotiden und DNA zu ermitteln.

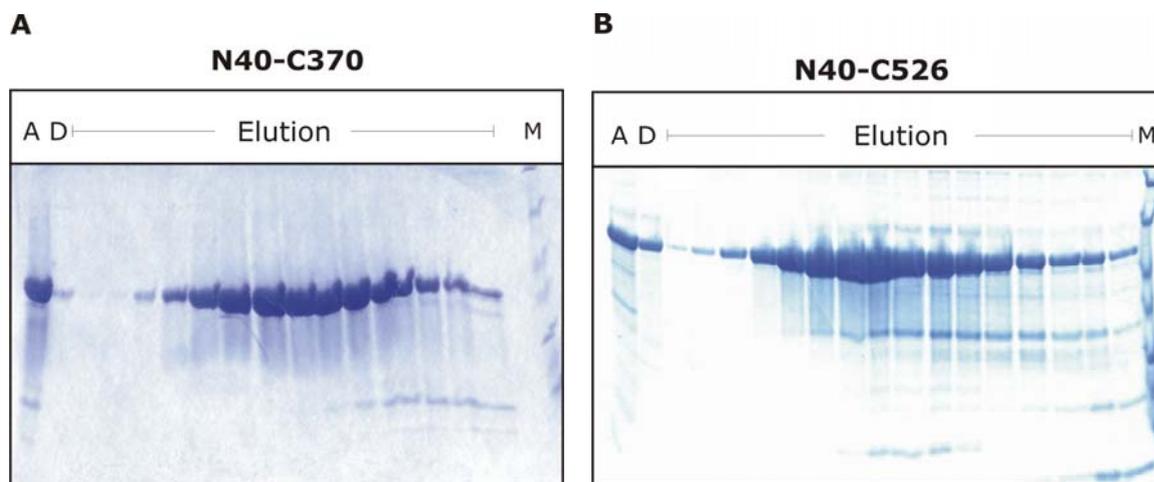
Für die Primase von *P. furiosus* wurde versucht, durch tränken (soaken) eines Kristalls mit UTP die Position des Nukleotids im aktiven Zentrum zu identifizieren. Dieses UTP wurde im vermuteten aktiven Zentrum gebunden, außerdem zeigte sich, dass das aktive Zentrum dieser Primase vermutlich zwei Nukleotide beherbergen kann, was notwendig wäre für die Synthese des ersten Dinukleotids (Ito *et al.*, 2003). Es wurde weiterhin versucht die Struktur der RPD der *E. coli* Primase mit einem gebundenen, kurzen Oligodesoxynukleotid zu bestimmen. Die Erzeugung von Kokristallen war für dieses Protein auf Grund der eher schwachen Affinität für DNA nicht erfolgreich, deshalb wurde auf eine Methode zur Erzeugung kovalent verbundener Protein-DNA-Komplexe zurückgegriffen, welche kristallisierten. Dabei wurden Aminosäuren gegen Cysteine ausgetauscht und mit Oligodesoxynukleotiden mit reaktiven Gruppen reagieren gelassen. Die DNA ist in der Struktur allerdings nicht im aktiven Zentrum lokalisiert, sondern in einer vermuteten, unspezifischen Templat-Binderegion gegenüber dem aktiven Zentrum (Corn & Berger, 2007; Corn *et al.*, 2008). Diese Struktur erbrachte zwar Informationen über die Bindung der einzelsträngigen Templat-DNA an die Primase, aber für ein genaueres Verständnis der eigentlichen Primersynthese werden nach wie vor Strukturen benötigt, welche die natürliche Interaktion von Protein und Nukleotiden mit DNA zeigen. Da die Primaseaktivität gut untersucht war, das Protein gut verfügbar ist und die Affinität für kurze DNA-Substrate hoch genug erschien, wurde deshalb versucht, ORF904 zusammen mit DNA zu kristallisieren. Außerdem wurden in den Kristallisationen ATP und teilweise dNTPs eingesetzt, um die Lokalisation der Nukleotide während der Primersynthese sichtbar machen zu können.

Da die Deletionsmutante N40-C255 (AS 40-255) allerdings keine Primaseaktivität zeigt (und DNA relativ schwach bindet) wurden die Deletionsmutanten N40-C370 (AS40-370) und N40-C526 (AS40-526) dafür ausgewählt. Diese beinhalten den minimal notwendigen

Proteinanteil für die Synthese eines Primers (N40-C370) bzw. den gesamten N-terminalen Bereich von ORF904 bis zum Beginn der Helikasedomäne (N40-C526, siehe auch 3.1.2.2.1).

### 3.2.1.1. Assemblierung des Komplexes

Die Aufreinigung der beiden Proteine erfolgte, wie für alle anderen Varianten von ORF904, über eine Affinitätschromatographie mittels in diesem Falle C-terminalem His-tag gefolgt von einer Kationenaustauscherchromatographie. Damit konnten relativ große Mengen (bis zu 25 mg Protein/l Medium) DNA-freies Protein gereinigt werden (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18: Aufreinigung der Proteine für die Kristallisation. (A) N40-C370 (B) N40-C526, beide: A- Säulenauftrag, D – Säulendurchbruch, Rest - Elutionsfraktionen der Kationenaustauschersäule auf 9% Proteingel.**

Danach erfolgte noch eine zusätzliche Gelfiltration um Kontaminanten und mögliche Multimere zu entfernen. Im Anschluss wurden die Peakfraktionen, welche das reine Protein enthielten, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert.

Verschiedene Konzentrationen der Proteine wurden dann in Gelfiltrationspuffer mit DNA inkubiert. Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 9-3 aufgeführt. Es wurden zum einen einzelsträngige DNA und zum anderen Primer/Templat-Komplexe eingesetzt. Alle Oligodesoxynukleotide enthielten die Erkennungssequenz GTG und sollten deshalb gut von den Proteinen gebunden werden (vgl. 3.1.2.2.2). Um dies zusätzlich zu kontrollieren, wurden mit einigen DNA-Substraten analytische Gelfiltrationen durchgeführt. Dabei konnte bestätigt werden, dass es unter den verwendeten Bedingungen zu einer guten Bindung des Proteins an die DNA kam.

Für die Bildung des Komplexes wurde das Protein mit der 1,2- bis 1,5-fachen molaren Menge an DNA gemischt. Außerdem wurden 10 mM ATP und evtl. 10 mM dGTP und weitere Salze zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 20°C. Danach wurde das Protein direkt für die Kristallisation verwendet. Es wurde zu Beginn auch getestet, ob

eine anschließende präparative Gelfiltration, mit der eventuell auftretende größere Komplexe oder ungebundene DNA entfernt werden, zu einer Veränderung der Kristallisationsergebnisse führte. Da dies nicht der Fall war, wurde für alle folgenden Versuche darauf verzichtet.

### 3.2.1.2. Kristallisation

Die Identifizierung der Kristallisationsbedingungen wurde durch die Verwendung kommerzieller Screens erleichtert. Zu Beginn wurde die Kristallisation mit den in Tabelle 9-9 aufgeführten Screens in 96well-Platten mit der *sitting drop* Methode durchgeführt. Das Ansetzen der Platten erfolgte mit einem Pipettierroboter. Dann wurden die Platten nach 24 h und dann in regelmäßigen, mehrtägigen Abständen auf entstandene Kristalle kontrolliert. Wenn in den Platten Kristalle erschienen, wurde zur Optimierung der Bedingungen die *hanging drop* Methode in 24well-Platten verwendet.

Zuerst musste die geeignete Proteinkonzentration für die Kristallisation gefunden werden. Die vorherige Kristallisation von N40-C255 wurde bei einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml durchgeführt. Wenn N40-C370 mit dieser Konzentration eingesetzt wurde, zeigte sich, dass sie für dieses Protein zu niedrig war. Das Protein ist also auffällig gut löslich, das Aufkonzentrieren war bis auf mind. 260 mg/ml möglich. Im Verlauf der Experimente stellte sich dann eine Konzentration von 60-70 mg/ml Protein im Ansatz als ausreichend und praktikabel heraus. N40-C526 war dagegen nicht so hoch löslich, hierbei kam es bei Konzentrationen von >60 mg/ml zum Präzipitieren des Proteins, deshalb wurden in den Kristallisationsansätzen 20-30 mg/ml Protein eingesetzt.

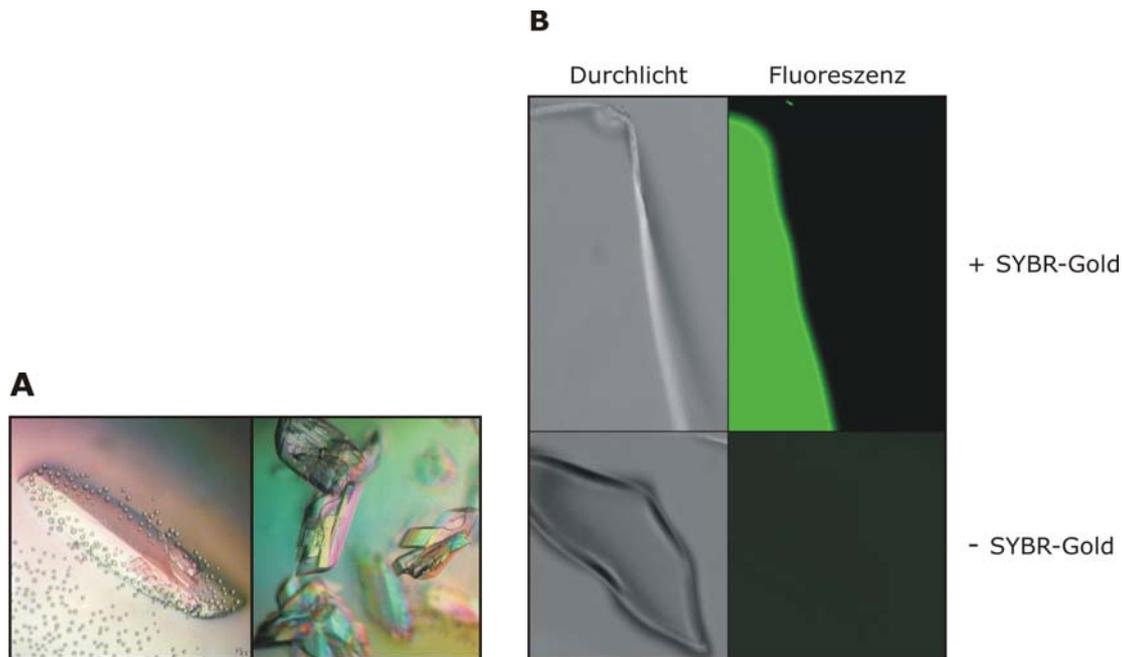
Die Bedingungen, welche bei den ersten Screens Kristalle hervorbrachten, sind in Tabelle 9-10 aufgeführt. In allen Fällen bildeten sich die Kristalle relativ schnell, meist in 24-48 h. Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde durch leichtes Variieren der Ausgangsbedingung erzielt.

Die Zusammensetzung des Oligodesoxynukleotids hat einen sehr großen Einfluss auf die Bildung des Kokristalls. Zum einen begünstigen möglichst kurze DNAs die Kristallisation, zum anderen werden lange Oligonukleotide besser vom Protein gebunden. Deshalb wurden eine Reihe verschiedener Substrate getestet. Das erste verwendete DNA-Substrat war kri\_1 (9nt), es wurde versucht 50 und 60 mg/ml N40-C370 ohne und mit Zugabe von ATP und dGTP (welches das zweite Nukleotid eines entstehenden Primers wäre) damit zu kristallisieren.

Die erste Bedingung, in welcher sich in den Ansätzen mit diesem DNA-Substrat Kristalle bildeten, war HEPES pH 7.5/Na-Citrat. Die entstandenen Kristalle waren tetragonal bis nadelförmig und neigten stark zu Verwachsungen (Abbildung 3-19A).

Weitere Bedingungen, welche in den initialen Screens Kristalle hervorbrachten, waren Malat pH 7.0 und  $MgCl_2/HEPES$  pH 7.5 /Polyacrylsäure. Diese Kristalle waren allerdings mit der *hanging drop*-Methode nicht zu reproduzieren.

Um das Vorhandensein von DNA in den entstandenen Kristallen der ersten Bedingung nachweisen zu können, wurde eine Färbung mit SYBR-Gold durchgeführt, der Farbstoff bindet selektiv an DNA und fluoresziert (Kettenberger & Cramer, 2006). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Färbung der behandelten Kristalle nachgewiesen werden (Abbildung 3-19B), was auf das Vorhandensein von DNA schließen ließ.



**Abbildung 3-19: Kristalle von N40-C370 und dem Oligodesoxynukleotid kri\_1. Kristallisationsbedingung war 0,1 M HEPES pH 7,25/1,8 M Na-Citrat. (A) Auflichtmikroskopie (B) Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie der mit SYBR-Gold gefärbten Kristalle und einer nicht behandelten Kontrolle.**

Nachdem sich allerdings im weiteren Lauf der Experimente herausstellte, dass die Röntgenstrukturanalyse in diesem Kristall keine DNA oder ATP nachweisen konnte (s. 3.2.1.4) wurde versucht die Bedingungen dahingehend zu verändern, dass die DNA besser vom Protein gebunden werden kann. Da die hohe Salzkonzentration ( $> 1$  M Na-Citrat) bei der das Protein kristallisierte, vermutlich die DNA-Bindung verhinderte, wurde versucht eine geeignetere Kristallisationsbedingung zu finden, welche weniger Salz enthielt. Zusätzlich wurde kri\_3 als DNA-Substrat in den folgenden Kristallisationen eingesetzt. Da dieses Substrat 8 nt länger ist als kri\_1, kann es möglicherweise besser vom Protein gebunden werden. Außerdem wurde ein Teil der Ansätze mit zusätzlicher Zugabe von  $ZnCl_2$  hergestellt, da gezeigt werden konnte, dass Zink die DNA-Bindung von ORF904 erhöht (von Scheven, 2004), außerdem wurden ATP und Magnesium zugegeben. Dabei entstanden zusätzlich zur oben genannten Bedingung in den Ansätzen mit Zink Kristalle mit HEPES pH 7.5/Mg-Formiat, Tris pH 8.5/Mg-Formiat und  $KCl/MgCl_2/Tris$  pH

8.5/PEG 400. Es stellte sich aber heraus, dass diese Kristalle Salzkristalle waren, deshalb wurde in den folgenden Versuchen vom Zusatz von Zink und anderen Salzen abgesehen. Da die Länge der DNA eine wichtige Rolle für die Entstehung eines Kokristalls spielen kann (Jordan *et al.*, 1985), wurde im folgenden Schritt eine Reihe von Screens mit DNA-Substraten durchgeführt, welche in der Anzahl der Nukleotide beiderseits eines zentralen GTGs variierten. Die Länge der Nukleotide betrug dabei zwischen 13 und 17 nt (kri\_6 bis kri\_9). Mit diesem systematischen Ansatz sollte es leichter sein, das möglicherweise ideale Substrat zu erkennen, welches bei einer bisher nicht beobachteten Bedingung zur Entstehung von Kokristallen führt. Außerdem wurden zusätzlich zu den bisher verwendeten einzelsträngigen DNAs Primer/Templat-Hybride eingesetzt (kri\_10 und kri\_11).

Mit allen diesen DNA-Substraten entstanden Kristalle bei Tris pH 8.5/Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/PEG 4000 und Tris pH 8.5/LiCl/PEG 4000. Für die Optimierung dieser Bedingungen wurde Oligo kri\_9 eingesetzt. Wie zuvor waren die Kristalle nadelförmig und verwachsen. Die Röntgenanalyse konnte auch in diesen Kristallen keine DNA nachweisen (s. 3.2.1.4).

Um die Bindung des Proteins an DNA weiter zu verstärken, wurden als nächstes DNA-Substrate, welche variable Vielfache von GT waren, in Screens eingesetzt (kri\_13 bis kri\_17). Außerdem wurden für die Gelfiltration und alle weiteren Ansätze die Konzentration an NaCl auf 100 mM gesenkt, dies sollte eine stärkere Bindung der DNA an N40-C370 bewirken. Es kam mit keinem dieser Substrate zur Entstehung von Kristallen in neuen Bedingungen.

Die Kokristallisation von N40-C526 wurde mit dem Templat kri\_3 versucht, außerdem wurden in verschiedenen Ansätzen auch ATP und Zink zugegeben. Es kam mit diesem Protein nie zur Entstehung von Kristallen. Vermutlich ist der Teil des Proteins zwischen den Aminosäuren 370 und 526 relativ flexibel und es kristallisierte deshalb nicht.

### **3.2.1.3. Ernten der Kristalle und Datensammlung**

Die Kristallisation von N40-C370 in größerem Maßstab wurde mit der *hanging drop*-Methode zum einen mit dem Substrat kri\_3 und zum anderen mit kri\_9 durchgeführt. Die optimalen Kristallisationsbedingungen waren 0,1 M HEPES pH 7.5/1,6 M Na-Citrat bzw. 0,1 M Tris-HCl pH 8.5/30-35% PEG 4000/200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Kristalle wurden nach einer Woche in eine Cryo-Lösung bestehend aus der Kristallisationslösung mit 15 % Glycerin überführt. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Messung der Kristalle erfolgte mit Synchrotron-Strahlung. Da die weitere Analyse der Daten keine wesentlichen Unterschiede der Kristalle aus den beiden verschiedenen Bedingungen ergab, werden im weiteren Verlauf nur noch die Ergebnisse der Kristalle aus dem zweiten Ansatz angesprochen.

Die Auswertung der Messung für diese Kristalle ergab, dass sie der Raumgruppe C2 angehörten, die Gitterparameter sind  $a= 125.718$ ,  $b= 46.556$ ,  $c= 77.993$ ,  $\beta= 124.612$ . Die Auflösung der Messung betrug  $1,85 \text{ \AA}$ . Die Statistik der Messdaten ist im Anhang angefügt (Tabelle 9-11).

#### **3.2.1.4. Bestimmung der Struktur**

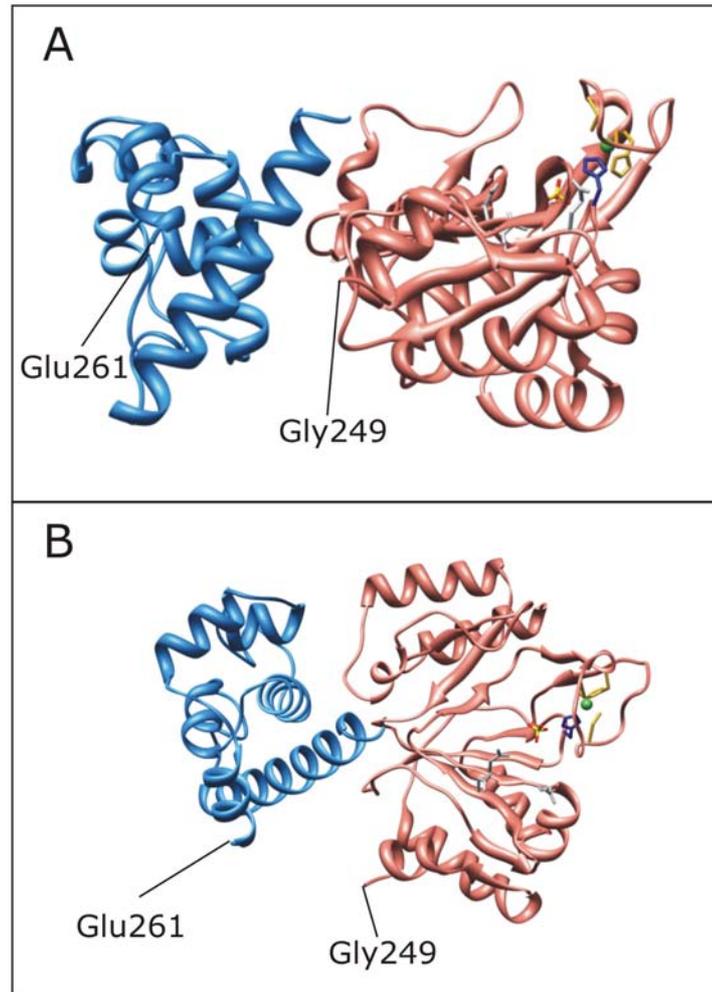
Die Struktur wurde von Dr. Alessandro Vannini (LMU München) gelöst. Durch *molecular replacement* mit der bereits vorhandenen Struktur der AS 40-249 (pdb 1RO2) als Basis konnte die Struktur der zusätzlichen Subdomäne gelöst werden (Abbildung 3-20). Dabei waren die Aminosäuren 250 bis 260 ungeordnet und deswegen nicht sichtbar. Die Statistik der Strukturverfeinerung ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 9-11).

Der bereits gelöste Bereich der AS 40-249 stimmte mit der neuen Struktur im wesentlichen überein. Das Zinkatom, welches von C191, C196, H141 und H188 koordiniert wird, war ebenfalls sichtbar. Die neue Subdomäne der Primase (AS 261-370) ist ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices zusammengesetzt und der C-terminale Bereich, welcher für die Primaseaktivität essentiell ist (3.1.2.2.1), formt eine große Helix (AS 341-369). Die Faltung der gesamten neuen Subdomäne hat nur sehr geringe Ähnlichkeit zu anderen Proteinen. Die höchste Ähnlichkeit besteht zu RecC (pdb 1w36; Dali Score 5,1, (Holm & Sander, 1995)), dieses Protein ist Teil eines Multienzymkomplexes aus *E. coli* zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und verantwortlich für die Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz (Handa *et al.*, 1997). Die Sequenzähnlichkeit ist allerdings auf den N-terminalen Teil des RecC beschränkt, welcher nicht in die Bindung der DNA involviert ist und lässt deshalb keine Rückschlüsse auf die DNA-Bindung durch ORF904 zu.

Es konnten weder Nukleinsäuren noch ATP in der Elektronendichte detektiert werden. Die Kokristallisation war also nicht erfolgreich. Das Protein schien in allen Versuchen sehr leicht allein zu kristallisieren, während die Kokristallisation mit DNA aus unbekanntem Gründen selten oder nie auftrat. Möglicherweise war die Bindung von N40-C370 an die eingesetzten DNA-Templates zu schwach, allerdings konnten bereits DNA-Protein-Komplexe mit vergleichbaren Affinitätskonstanten wie N40-C370 und Substrat pri\_22 erfolgreich kristallisiert werden (u.a. Georgescu *et al.*, 2008). Es ist auch möglich, dass alle gewählten Oligodesoxynukleotide die Bildung von Kokristallen verhinderten.

Es konnten also keine Aussagen über die exakte Interaktion des Proteins mit dem DNA-Templat während der Primersynthese gemacht werden. Allerdings konnte in der Struktur eine Sulfation nachgewiesen werden, dieses wird von Histidin 141 koordiniert, welches auch an der Koordination des Zinkatoms beteiligt ist. Sulfationen können in Proteinkristallen den Platz von Phosphationen einnehmen, da sich beide strukturell sehr

ähnlich sind. Es ist also denkbar, dass an dieser Stelle ein Phosphat der DNA oder eines Nukleotids gebunden wird.



**Abbildung 3-20: Sekundärstruktur von N40-C370. Schleifendarstellungen der Aminosäuren 40-370. (A) Darstellung des Proteins von vorn (B) Aufsicht auf das aktive Zentrum (90° nach vorn). Die minimale Primasedomäne ist rosé dargestellt (AS 40-249), die neu gelöste Subdomäne blau (AS 261-370). Der gezeigte Bereich zwischen den AS 249 und 261 konnte nicht gelöst werden. Außerdem sind dargestellt die Aminosäuren des aktiven Zentrums (grau), die Aminosäuren welche das Zinkatom koordinieren (gelb), außerdem Histidin 141 (blau) und das Zinkatom (grün) sowie das Sulfation (rot-gelb).**

Auffällig ist, dass die Aminosäuren, welche die Prim/Pol-Subdomäne mit der neuen C-terminalen Subdomäne verbinden, ungeordnet sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide Teile des Proteins gegeneinander beweglich sind und dieser Bereich diese Bewegung ermöglicht. Bei der Fläche, an der sich die beiden Subdomänen berühren, handelt es sich wahrscheinlich nur um einen Kristallkontakt, es sind keine spezifischen Interaktionen der beiden Teile nachweisbar. Dies kann als Indikator dafür angesehen werden, dass die Positionierung der beiden Subdomänen im Kristall eher artifiziell ist und

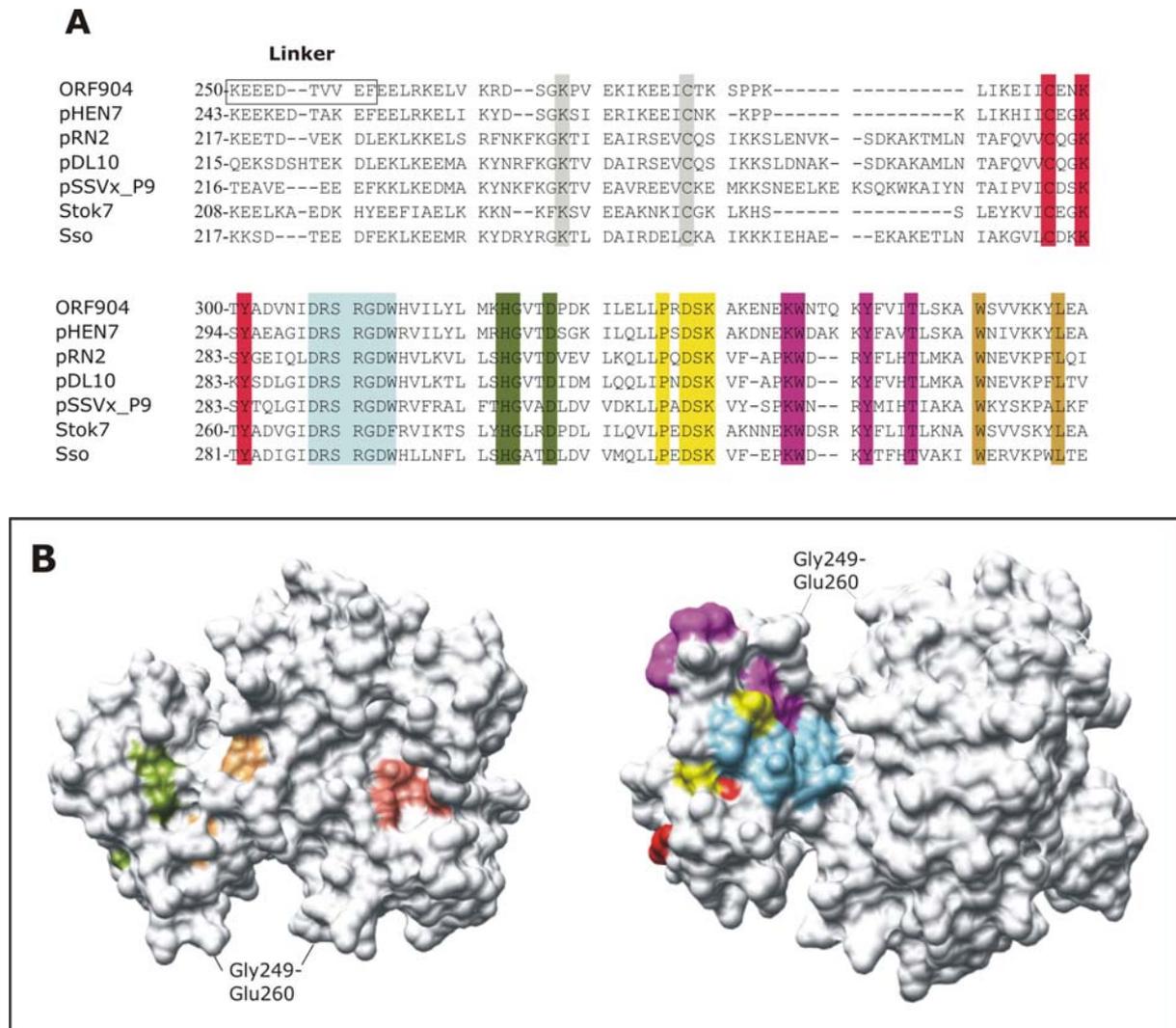
sie während der Primersynthese eine andere Position zueinander einnehmen. Zusätzlich spricht dafür, dass das aktive Zentrum und der C-terminale Bereich des Proteins, welcher für die Primaseaktivität notwendig ist, in der hier vorliegenden Struktur relativ weit voneinander entfernt sind (Abbildung 3-20), was eine Beteiligung beider an der Primersynthese ausschließen würde.

Zusätzlich wurden die Positionen der konservierten Aminosäuren in der neuen Subdomäne untersucht. Dafür wurden die ORF904-Homologe der archaealen Plasmide pRN2, pDL10, pHEN7 und pSSVx sowie die beiden integrierten ORF904-Gene aus den Genomen von *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfolobus solfataricus* verglichen (Abbildung 3-21A). Wenn man die in allen Genen vollständig konservierten Aminosäuren innerhalb der Proteinstruktur visualisiert, fällt auf, dass der Großteil auf der Seite der neuen Subdomäne liegt, welche dem aktiven Zentrum abgewandt ist (Abbildung 3-21B). Es ist zwar auch denkbar, dass diese Aminosäuren eine andere Rolle spielen und nicht in der Nähe des aktiven Zentrums benötigt werden, aber es scheint wahrscheinlicher, dass das Protein während der Synthese des Primers eine andere Konformation einnimmt und so diese Aminosäuren zentraler positioniert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zwar gelang die Struktur der vollständigen Primasedomäne von ORF904 zu lösen, die Erzeugung eines DNA-Protein-Kokristalls allerdings nicht erfolgreich war. Somit können keine Aussagen zu den genauen Vorgängen während der Primersynthese gemacht werden. Allerdings legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass die ermittelte Struktur nicht die *in vivo* aktive Konformation besitzt, sondern es, möglicherweise durch die Bindung des DNA-Templats, zu einer Konformationsänderung kommt, welche die Primersynthese erlaubt.

### **3.2.1.5. Soaken mit Desoxynukleotiden**

Eine weitere Möglichkeit, die Struktur von Proteinen mit verschiedenen Arten kleiner Liganden zu untersuchen, ist, die Proteinkristalle mit einer Lösung dieser Moleküle zu tränken (*soaking*). Nachdem die Kokristallisation nicht zu Ergebnissen führte, wurde diese Methode mit dem minimalen Substrat kri\_12 (TTGTGC) versucht. Das Protein wurde in der Bedingung 0,1 M Tris-HCl pH 8.5/30-35% PEG 4000/200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ohne DNA kristallisiert und die entstandenen Kristalle wurden mit der Kristallisationslösung mit 10 mM des Desoxynukleotids getränkt. Dabei kam es in allen Fällen zu einer Zerstörung der Kristalle, was daran liegen könnte, dass es bei DNA-Bindung zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt. Es war also auch nicht möglich, auf diese Weise die gebundene DNA zu visualisieren.



**Abbildung 3-21: Position der konservierten Aminosäuren der C-terminalen Subdomäne. (A) Alignment von ORF904 mit homologen Genen der Plasmide pRN2, pDL10, pHEN7 und pSSVx und den genomischen Kopien aus *S. tokodaii* und *S. solfataricus*. Es wurden die gesamten Gene mit Multalin (Corpet, 1988) verglichen, der Bereich von 251 bis 370 AS bezogen auf ORF904 ist dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind unterlegt. (B) Oberflächendarstellungen der Struktur von N40-C370. Das aktive Zentrum ist rosé, die konservierten Aminosäuren sind farblich entsprechend dem Alignment markiert eingezeichnet (grau unterlegte sind nicht eingezeichnet). Die zweite Abbildung ist gegenüber der ersten um 180° gedreht.**

### 3.2.2. Mutagenese der Primasedomäne

Nachdem alle Versuche, durch Kokristallisation und Soaken von Protein und DNA-Substrat weitere Informationen über die Vorgänge während der Primersynthese zu erlangen, fehlschlagen, wurde versucht durch Mutagenese möglicherweise beteiligter Aminosäuren weitere Hinweise zu erlangen. Die Tatsache, dass der Bereich der C-terminalen Helix zwischen den Aminosäuren 339 und 370 wichtig für die Primaseaktivität

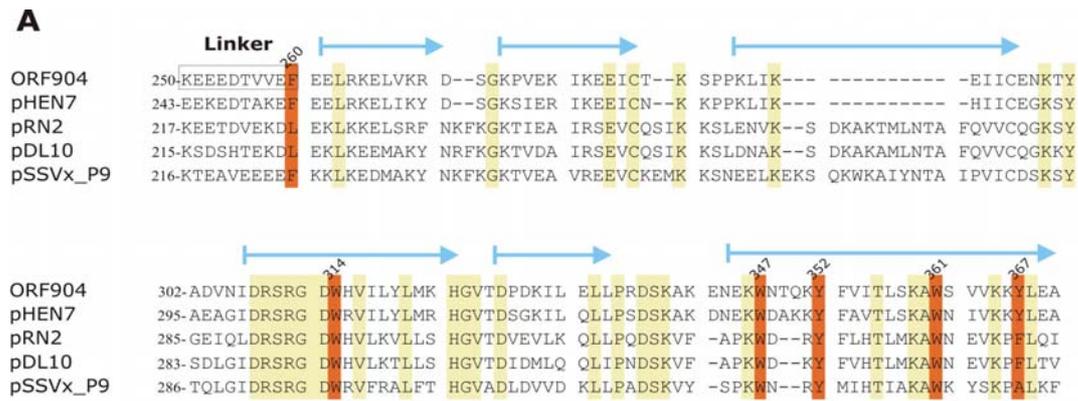
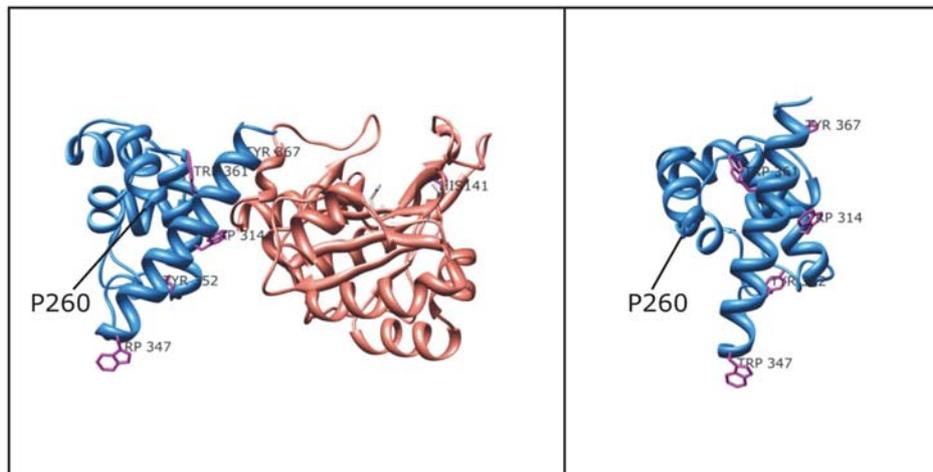
ist (siehe 3.1.2.2.1) und die vermutete Flexibilität der C-terminalen Subdomäne führten zu der Annahme, dass in diesem Bereich möglicherweise die Interaktion mit den Nukleotiden der Erkennungssequenz stattfindet. Die Interaktion von spezifischen Nukleotidbasen mit Aminosäuren wurde bisher vor allem mit verschiedenen RNA-interagierenden Proteinen untersucht (Jones *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2007). Da hierbei auch die Erkennung der Basen im Einzelstrangkontext eine Rolle spielt, wurden die Ergebnisse einer vergleichenden Studie vorhandener RNA-Protein-Strukturen herangezogen, um mögliche Aminosäuren zu ermitteln, die an der Erkennung der GTG-Sequenz beteiligt sein könnten. Starke basenspezifische Kontakte konnten für die Paare Tryptophan-Guanin und Tyrosin-Uracil gezeigt werden (Ellis *et al.*, 2007). Diese Aminosäuren könnten also an der Bindung der Erkennungssequenz GTG bevorzugt beteiligt sein. Davon ausgehend wurden eine Reihe von Mutationen in N40-C370 eingeführt und die Aktivität der Punktmutanten untersucht.

Da die C-terminale Helix für die Primaseaktivität essentiell ist, wurden die vier dort vorhandenen Tryptophan- und Tyrosinreste (W347, W361, Y352, Y367) mit Alanin ersetzt. Außerdem wurde Tryptophan 314 zu Alanin verändert, da diese Aminosäure in der Struktur angrenzend an die C-terminale Helix liegt. Ein Vergleich der Sequenzen der Replikationsproteine der pRN-Plasmide miteinander zeigt, dass diese Reste (bis auf Y367) konserviert sind (Abbildung 3-22A). Allerdings ist keines der anderen Proteine charakterisiert und demzufolge ist nicht geklärt, ob sie beispielsweise dieselbe Erkennungssequenz nutzen.

Weiterhin wurden Phenylalanin 260 und Histidin 141 zu Alanin mutiert. P260 liegt am N-Terminus der neuen Subdomäne, am C-Terminus der flexiblen Aminosäuren und spielt in dieser Position vermutlich keine Rolle bei der Erkennung der Startsequenz. H141 ist eine der Aminosäuren, welche das Zinkion koordinieren und bindet außerdem vermutlich ein Phosphat eines Nukleotids. Das Mutieren dieser Aminosäure sollte zu einer Inaktivierung des Proteins führen, deshalb wurde diese Punktmutante als Negativkontrolle angesehen, während die Mutagenese von P260 als Positivkontrolle diente.

Außerdem wurde eine Mutante (Del1) hergestellt, bei der ein Teil der im Kristall flexiblen Aminosäuren (Lys250-Asp255) deletiert waren, um zu überprüfen, ob die daraus eventuell resultierende mangelnde Flexibilität der C-terminalen Subdomäne zur erwarteten Inaktivität des Proteins führen würde.

Die exprimierten Proteine wurden parallel in kleinem Maßstab über 1 ml His-Tag Affinitätssäulenmaterial gereinigt und auf eine weitere Reinigung mittels Ionenaustauscherchromatographie wurde verzichtet. Die Reinheit und Ausbeute der Proteine, welche mit dieser Methode gereinigt wurden, war für die Experimente ausreichend.

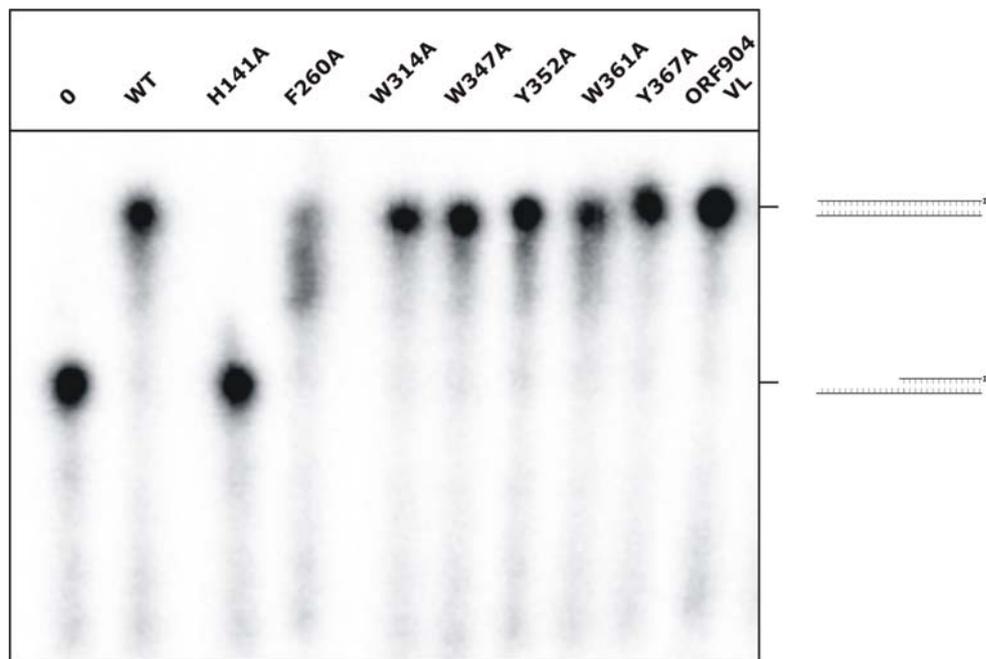
**B**

**Abbildung 3-22: Alignment der Sequenzen der Replikationsproteine der pRN-Plasmide und Position der untersuchten Aminosäuren im Protein. (A) Die C-terminale Subdomäne von ORF904 (AS 251-370) wurde mit den entsprechenden Bereichen der homologen Proteine von pHEN7, pRN2, pDL10 und pSSVx verglichen (Multalin). Alle konservierten Aminosäuren (und AS 367) sind farbig gekennzeichnet. Die Aminosäuren, welche mutiert wurden, sind orange gekennzeichnet. Die  $\alpha$ -Helices der Sekundärstruktur von ORF904 sind mit blauen Pfeilen markiert. (B) Schleifendarstellung von N40-C370. Die Farbkodierung ist wie in Abbildung 3-20. Die mutierten Aminosäuren sind in magenta. P260 ist nicht in der Struktur enthalten und wurde deswegen nur markiert. Links ist das gesamte Protein zu sehen, rechts nur die C-terminale Subdomäne.**

Zuerst wurde mit allen Proteinen ein Polymeraseaktivitätsassay durchgeführt. Für diese Aktivität sind nur die AS 40-255 notwendig (Lipps *et al.*, 2004), die Punktmutanten (bis auf H141A) sollten also in der Lage sein, diese Aktivität trotzdem zu katalysieren. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob es durch die Einführung der Mutationen zu Veränderungen des Proteins kam, welche Auswirkungen auf die Funktion des aktiven Zentrums hätten. Für diesen Versuch wurden ein 21 nt langes Oligodesoxynukleotid, welches zuvor am 5' Ende radioaktiv markiert wurde, mit einem 42 nt langen, komplementären Oligodesoxynukleotid hybridisiert (pol\_1 und pol\_2, siehe

Tabelle 9-4). ORF904 bzw. die minimale Deletionsmutante N40-C255 ist in der Lage, das kurze Oligodesoxynukleotid mit dNTPs bis zum Ende des Templates zu verlängern.

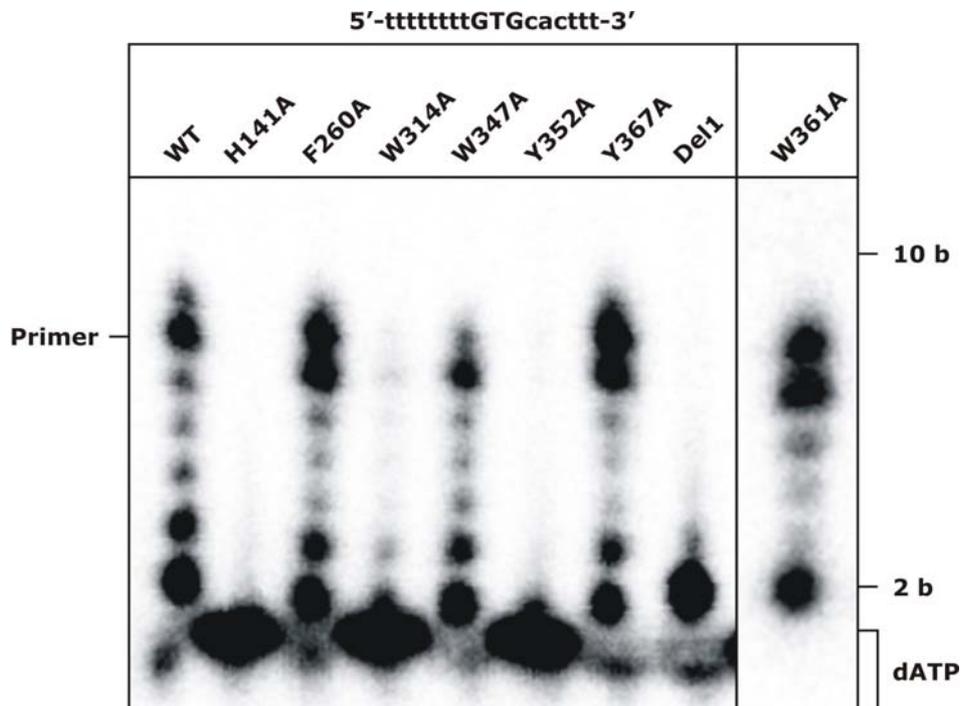
In diesem Versuch besaßen alle Proteine außer H141A Polymeraseaktivität, was zeigte, dass ihre Aktivität nicht grundsätzlich beeinträchtigt war. Die Inaktivität von H141A ist erwartungsgemäß und wahrscheinlich wie oben angedeutet auf die fehlende Koordinierungsmöglichkeit für das Zinkatom zurückzuführen.



**Abbildung 3-23: Polymeraseaktivitätsassays aller Punktmutanten. Die Punktmutanten wurden mit 5 nM des Primer/Templates inkubiert (der Primer war 5' radioaktiv markiert). Nach Zugabe von 100 µM dNTPs wurden die Primer verlängert. Bis auf H141A zeigten alle Proteine Polymeraseaktivität.**

Zur Charakterisierung ihrer Primaseaktivität wurden dann mit allen Punktmutanten Primaseaktivitätsassays mit verschiedenen DNA-Substraten durchgeführt. Zuerst wurde für alle Proteine mit Substrat pm\_1, welches die Erkennungssequenz GTG enthält, überprüft, ob sie in der Lage waren den Wildtyp-Primer zu synthetisieren. Dabei zeigte sich, dass die Punktmutanten F260A, W347A, W361A und Y367A mit diesem Substrat einen Primer synthetisieren konnten, der dem Wildtyp vergleichbar ist (Abbildung 3-24). Diese Aminosäuren spielen also vermutlich keine Rolle bei der basenspezifischen Erkennung der Templat-DNA. Dagegen konnten für H141A, Y352A und Del1 keine Vollängenprimer detektiert werden. Dabei zeigte H141A wie schon im vorherigen Versuch keinerlei Aktivität. Die Deletion der flexiblen Aminosäuren (Del1) führte ebenfalls zu einem vollständigen Rückgang der regulären Primersynthese. Allerdings lässt sich interessanterweise feststellen, dass dieses Enzym in der Lage ist, große Mengen Dinukleotid zu synthetisieren (Abbildung 3-24). Y352A ist die einzige der

Spezifitätsmutanten, welche mit dem GTG-Substrat keinen Primer mehr synthetisiert. Außerdem wurde in diesem Experiment mit W314A nur ein extrem reduzierte Menge Primer synthetisiert, die Länge der Produkte entspricht allerdings der des Wildtyps.

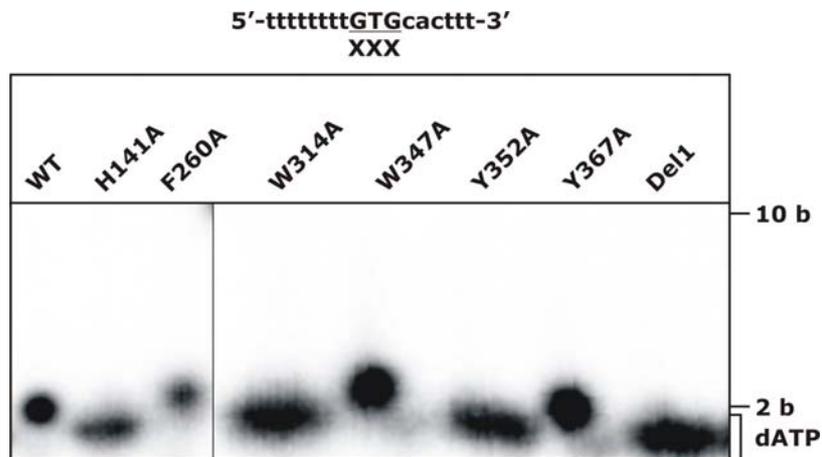


**Abbildung 3-24: Primaseaktivitätsassay der Punktmutanten mit Templat mit Erkennungssequenz GTG. 4  $\mu\text{M}$  des Oligodesoxynukleotids pm\_1 wurden mit 0,4  $\mu\text{M}$  Protein, 1 mM ATP und 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$  inkubiert. F260A, W347A, Y367A und W361A zeigten Primersynthese vergleichbar mit der des Wildtyp-Proteins. W347A zeigte ebenfalls vergleichbare, aber sehr schwache Aktivität, Del1 synthetisierte Dinukleotide, H141A und Y352A waren inaktiv.**

Als nächstes wurde die Primersynthese aller Punktmutanten mit einer Mischung von Substraten mit unterschiedlichen Triplets, welche sich immer in einer Base von GTG unterscheiden, untersucht (pm\_2 bis pm\_10). Diese Substrate werden vom Wildtyp-Protein nicht zur Synthese eines Vollängenprimers verwendet, aber damit könnte eine mögliche Veränderung der Erkennungssequenz einer der Punktmutanten detektiert werden. Für dieses Experiment wurde ein Mix von jeweils 4  $\mu\text{M}$  eines jeden Templats eingesetzt.

Dabei kam es mit keiner Punktmutante zur Synthese eines Vollängenprimers (Abbildung 3-25). Die einzigen sichtbaren Produkte sind die Dinukleotide, welche Wildtyp N40-C370 auf einzelnen Substraten synthetisiert, die sich in der Erkennungssequenz um eine Base vom GTG unterscheiden (s. 3.1.1.1.4). Diese Dinukleotide sind in diesem Experiment außer für den Wildtyp für F260A, W347A und W367A zu sehen, was die Ergebnisse des vorherigen Versuchs bestätigt, dass sich diese Punktmutanten wie der Wildtyp verhalten. Die Proteine H141A, W341A und Y352A zeigen diese Dinukleotide nicht, wie schon im

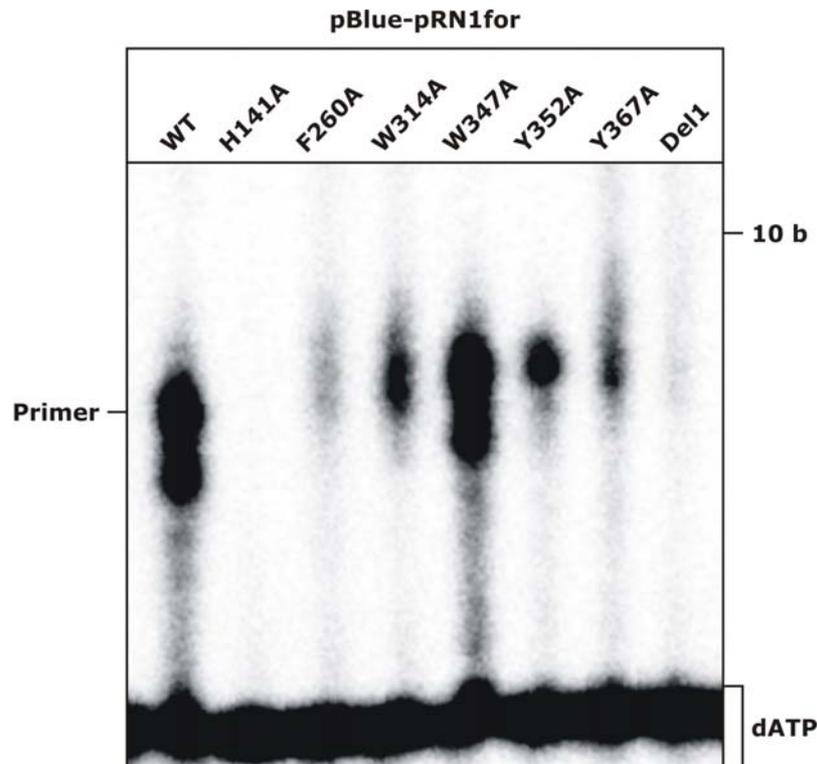
vorherigen Versuch sind sie inaktiv. Die Deletionsmutante Del1, welche in der Lage war mit dem GTG-Substrat Dinukleotide zu synthetisieren, war mit dem Triplett-Mix allerdings ebenfalls nicht aktiv.



**Abbildung 3-25: Primaseaktivitätsassay der Punktmutanten mit Triplett-Mix.** Es wurde ein Substratmix eingesetzt, bei dem jeweils eine Position der GTG-Erkennungssequenz in jede der vier Basen getauscht worden war (pm\_2 bis pm\_10). 4  $\mu\text{M}$  dieses Mixes wurden mit 0,4  $\mu\text{M}$  Protein, 1 mM ATP und 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP inkubiert. F260A, W347A und W367A verhielten sich wie der Wildtyp und synthetisierten Dinukleotide. H141A, W314A, Y352A und Del1 zeigten keine Aktivität.

Nachdem die Untersuchung der neun verschiedenen Triplets keine Informationen zu einer an einer Stelle veränderten Erkennungssequenz einer der Punktmutanten gegeben hatte, wurde einzelsträngiges Plasmid (pBluescript\_pRN1for) als Substrat eingesetzt. Auf diesem natürlichen DNA-Templat kommen mehr potentielle Erkennungssequenzen vor als auf den getesteten kurzen Oligodesoxynukleotiden und dies könnte den Punktmutanten die Synthese eines Primers mit einer anderen Sequenz als GTG ermöglichen.

In diesem Versuch zeigten bis auf H141A alle Punktmutanten Aktivität (Abbildung 3-26). Die Punktmutanten, welche sich in den vorherigen Experimenten wie das Wildtyp-Protein verhielten (F260A, W347A, Y367A), zeigten auch hier eine entsprechende, allerdings zum Teil verminderte Aktivität. Vor allem F260A war unerwartet schwach aktiv mit diesem Templat, möglicherweise erschwert die Mutation die Bindung der Plasmid-DNA, verglichen mit den einzelsträngigen Substraten. Überraschenderweise zeigten aber bei diesem Versuch die Punktmutanten W314A und Y352A ebenfalls Aktivität. Dies war besonders für Y352A interessant, da dieses Protein mit keinem der bereits getesteten Template einen Primer synthetisiert hatte. Vermutlich ist die Sequenz, die dieses Protein erkennt, bei den bisher getesteten Substraten nicht aufgetreten, dafür kam sie aber im einzelsträngigen Plasmid vor und erlaubte somit die Primersynthese.

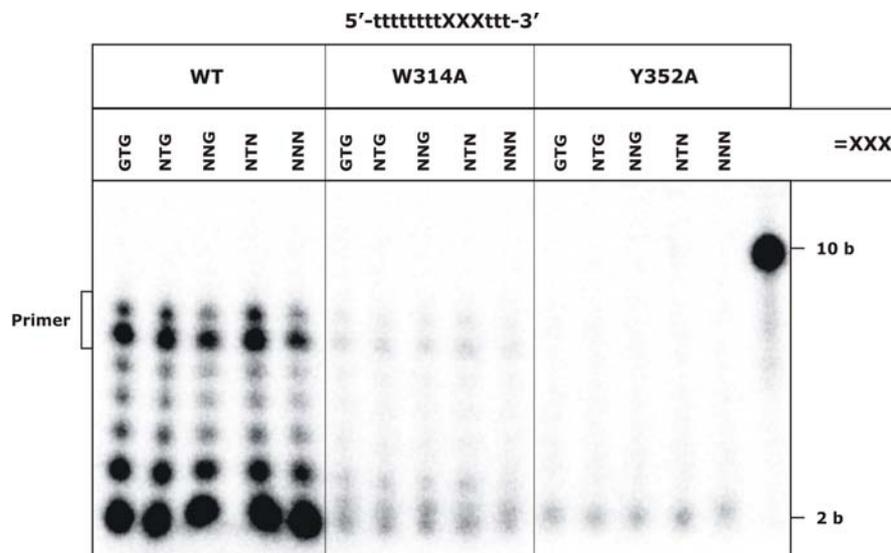


**Abbildung 3-26: Primaseaktivitätsassay der Punktmutanten mit einzelsträngigem Plasmid.** Es wurden 40 nM einzelsträngiges Plasmid (pBlue\_pRN1) mit 0,4  $\mu$ M der Proteine, 1 mM ATP und 10  $\mu$ M dNTPS mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP inkubiert. Es kam mit allen Proteinen außer H141A zur Synthese eines Primers, wenn auch meist schwächer als mit dem Wildtyp-Protein.

Da der vorherige Versuch gezeigt hatte, dass Y352A in der Lage ist mit einzelsträngigem Plasmid einen Primer zu synthetisieren, wurde versucht die möglicherweise veränderte Erkennungssequenz zu identifizieren. Dazu wurden Mischungen von Oligodesoxynukleotiden eingesetzt, welche die Triplets NTG, NNG, NTN und NNN enthielten (pm12 bis pm\_15). Dabei entspricht N einer beliebigen Base, welche in den Mischungen alle zu gleichen Teilen vorkamen. Um die Konzentrationsunterschiede eines bestimmten Triplets in den einzelnen Mischung auszugleichen wurden die Konzentrationen in dem Versuch auf 2  $\mu$ M eines jeweiligen Triplets angepasst. Zusätzlich wurde das durch die Durchführung des Versuchs mit Wildtyp-Protein untersucht.

Mit diesen Templat-Mischungen wurden die Punktmutanten W314A und Y352A inkubiert, diese hatten in den Versuchen mit der Wildtyp-Erkennungssequenz keine Aktivität gezeigt (Abbildung 3-27). Dabei ergab sich, dass W314A in der Lage ist, mit all diesen Templaten eine sehr geringe Menge Primer zu synthetisieren, wie schon oben entspricht diese aber immer den Produkten des Wildtyps. Diese Mutante verfügt also vermutlich über eine generell herabgesetzte Aktivität und weniger über eine veränderte Spezifität. Dagegen war Y352A nicht in der Lage mit diesen Templaten einen Primer zu synthetisieren. Da das Protein in der Lage war, mit einzelsträngigem Plasmid einen Primer zu synthetisieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses Protein eine bestimmte

Sequenz für die Synthese des Primers erkennt. Diese konnte allerdings aus unbekanntem Gründen nicht mit den verwendeten Templaten entdeckt werden, obwohl die eingesetzten DNAs alle möglichen Triplets abdecken sollten. Da alle untersuchten Aminosäuren gegen nicht-konserviertes Alanin ausgetauscht worden, ist es aber denkbar, dass die Spezifität der Punktmutanten für eine veränderte Sequenz nicht so eindeutig ist wie die des Wildtyp-Proteins für die native Erkennungssequenz und deswegen schlechter detektiert werden kann.



**Abbildung 3-27: Primaseaktivitätsassay zur Detektion der Erkennungssequenz von W314A und Y352A.** Die eingesetzten Substrate entsprachen alle dem obenstehenden Modell, die jeweiligen Triplets sind angezeigt. N entspricht A,C,G oder T zu gleichen Teilen. Eingesetzte Konzentrationen waren: GTG-2  $\mu\text{M}$ , NTG-8  $\mu\text{M}$ , NNG, NTN-32  $\mu\text{M}$  und NNN-128 $\mu\text{M}$ . Das Substrat wurde mit 0,4  $\mu\text{M}$  Protein, 1 mM ATP und 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP inkubiert. W314A zeigte mit allen Templaten eine sehr schwache, aber dem Wildtyp vergleichbare Aktivität, Y352A zeigt keine Aktivität.

In diesen Experimenten zeigte die Mutagenese der Aminosäuren W347, W361 und Y367 keinen Einfluss auf die Primersynthese. Diese Aminosäuren sind demzufolge vermutlich nicht maßgeblich an der Primersynthese beteiligt. Dagegen konnte für W314 und Y352 eine Beeinträchtigung der Aktivität des Enzyms festgestellt werden. Dabei führte die Mutagenese von W314 zu einem starken Rückgang der Aktivität, welcher vermutlich auf eine herabgesetzte Bindung von Templat oder neugebildetem Primer zurückzuführen ist. Wenn Y352 mutiert wurde, führte das dagegen zu einer Veränderung der Startsequenz, die dieses Enzym erkennt. Wenn man die Position dieser mutierten Aminosäuren in der Struktur von N40-C370 betrachtet, fällt auf, dass W314 und Y352 verhältnismäßig nah beieinander liegen (Abbildung 3-22). Möglicherweise ist das ein Hinweis darauf, dass dieser Bereich des Proteins in die Primersynthese direkt involviert ist. Da die beiden Aminosäuren in der Kristallstruktur an einer Position sind, welche eine direkte Interaktion

mit Vorgängen am aktiven Zentrum des Enzyms kaum möglich machen, erscheint eine Konformationsänderung des aktiven Enzyms wahrscheinlich.

### **3.3. Erste Schritte zum Aufbau eines *in vitro* Replikations-systems mit ORF904**

Es ist bis jetzt nur relativ wenig über den Replikationsmechanismus von pRN1 bekannt. Die bisher identifizierten Funktionen von ORF904 lassen aber vermuten, dass dieses Protein in der Replikation von pRN1 eine große Rolle spielt. Die beobachtete Primase- und Helikase- (und evtl. Polymerase-) Aktivität ist essentiell bei der DNA-Replikation. Die Sequenz von ORF904 zeigt außerdem Übereinstimmungen mit dem Bereich anderer Proteinen in welchem eine *winged helix* Domäne identifiziert werden konnte, an. Diese Domäne liegt bei ORF904 im C-terminalen Bereich (AS 753-845).

Die Übereinstimmung ist groß für hRFX1, einen menschlichen Transkriptionsaktivator und *gpa*, ein Replikationsprotein des Phagen P4a. Beide Proteine nutzen die *winged helix* Domäne, um eine spezifische DNA-Doppelstrangsequenz zu binden, im Falle von *gpa* den Replikationsursprung *ori1* des Phagen (Yeo *et al.*, 2002; Gajiwala *et al.*, 2000). Möglicherweise ist ORF904 also mit dieser Domäne auch in der Lage selektiv die Sequenz des Replikationsursprungs von pRN1 zu erkennen und zu binden. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass auch eine große Reihe weiterer Proteine (plasmid- oder genomkodiert) an der Replikation von pRN1 beteiligt sind.

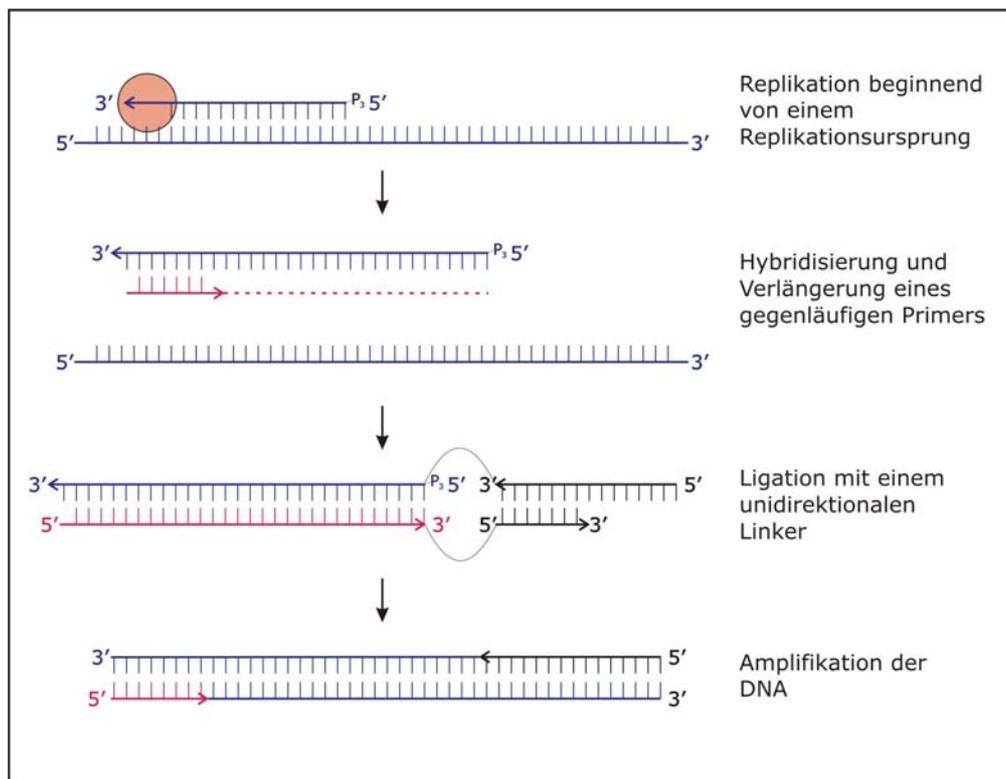
Um die Replikation besser zu verstehen und eingehender untersuchen zu können, kann ein *in vitro* Replikationssystem hilfreich sein. Dabei wird ein DNA-Molekül, welches den erforderlichen Replikationsursprung trägt mit Hilfe eines zellfreien Extraktes oder mit definierten Proteinen repliziert. Der Aufbau eines solchen Systems wurde für pRN1 versucht. Dafür waren zwei Dinge notwendig, zum einen musste versucht werden den Replikationsursprung von pRN1 zu identifizieren, zum anderen wurde versucht, die Proteine zu identifizieren, welche mit ORF904 interagieren und damit möglicherweise an der Replikation beteiligt sind.

#### **3.3.1. Versuche den Replikationsursprung von pRN1 zu identifizieren**

##### **3.3.1.1. LM-PCR (ligation mediated PCR)**

Die *ligation mediated* PCR (LM-PCR) ist eine Methode um DNA-Einzelstrangbrüche auf Nukleotidlevel zu bestimmen. Diese Methode kann für z.B. für die Untersuchung von DNA-Schäden oder die Identifizierung methylierter DNA angewendet werden (Tornaletti & Pfeifer, 1995; Pfeifer *et al.*, 1989), aber sie wurde auch für die Bestimmung der Startpunkte der Replikation des Mitochondriengenoms eingesetzt (Kang *et al.*, 1997).

Die Methode ist schematisch in Abbildung 3-28 dargestellt. Bei der Replikation entstehen für einen kurzen Zeitraum freie 5' Enden, auf dem *lagging strand* entsteht eine Vielzahl von 5' Enden, welche während der Replikation kontinuierlich verbunden werden, während auf dem *leading strand* das 5' Ende am Replikationsursprung länger bestehen bleiben könnte, wenn die Replikation unidirektional verläuft. Dieses 5' Ende sollte mittels LM-PCR identifiziert werden. Die Okazaki-Fragmente der bisher untersuchten archaealen Organismen sind außerdem mit  $\approx 100$  nt relativ kurz, und sollten deshalb im späteren Verlauf der Identifikation der freien 5' Enden auffallen (Matsunaga *et al.*, 2003). Die gesamte DNA wurde denaturiert und mit plasmidspezifischen Primern hybridisiert, dann wurden die Primer bis zum 5' Ende verlängert. Dabei entsteht ein *blunt end*. Danach erfolgte die Ligation mit einem doppelsträngigen, asymmetrischen und damit unidirektional ligierenden Linker, welcher aus zwei verschiedenen langen Oligodesoxynukleotiden bestand. Dann wurde die DNA mit Hilfe des plasmidspezifischen Primers und eines der Oligodesoxynukleotide des Linkers amplifiziert und war nachweisbar.

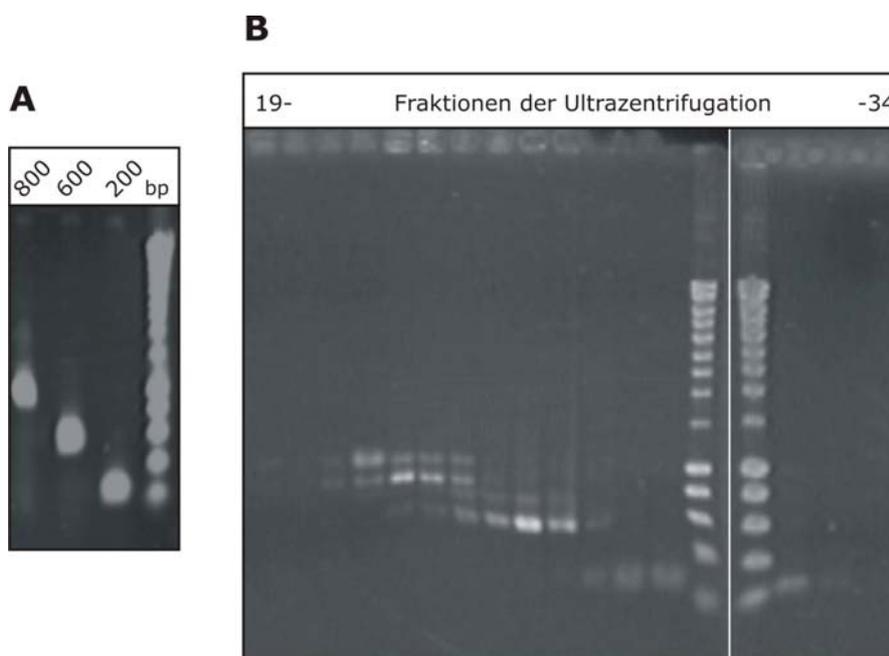


**Abbildung 3-28: Schematische Darstellung der *ligation mediated PCR*.**

Für diesen Versuch wurde *Sulfolobus islandicus*, welcher pRN1 enthielt, verwendet. Um die kurzen Replikationsintermediate anzureichern und den Anteil des Plasmids, welcher einen großen Anteil des eingesetzten Primers binden kann, zu reduzieren, wurde versucht die DNA mittels Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten zu fraktionieren. Die Zellen wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und auf einen

ebenfalls alkalischen Saccharosegradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen entnommen und gefällt. Zur Kontrolle wurde immer ein Gradient mit Standard-DNA (200, 600 und 800 bp PCR-Fragmente) parallel bearbeitet. Die Fraktionen, welche im Standard unter ca. 800 bp große DNA enthielten wurden in der LM-PCR eingesetzt (Darstellung der Verteilung der DNA im Gradienten in Abbildung 3-29). Mit Test-PCRs konnte allerdings in den meisten Fraktionen noch pRN1 nachgewiesen werden, möglicherweise werden die verschiedenen Isoformen des Plasmids im Gradienten nicht ausreichend getrennt.

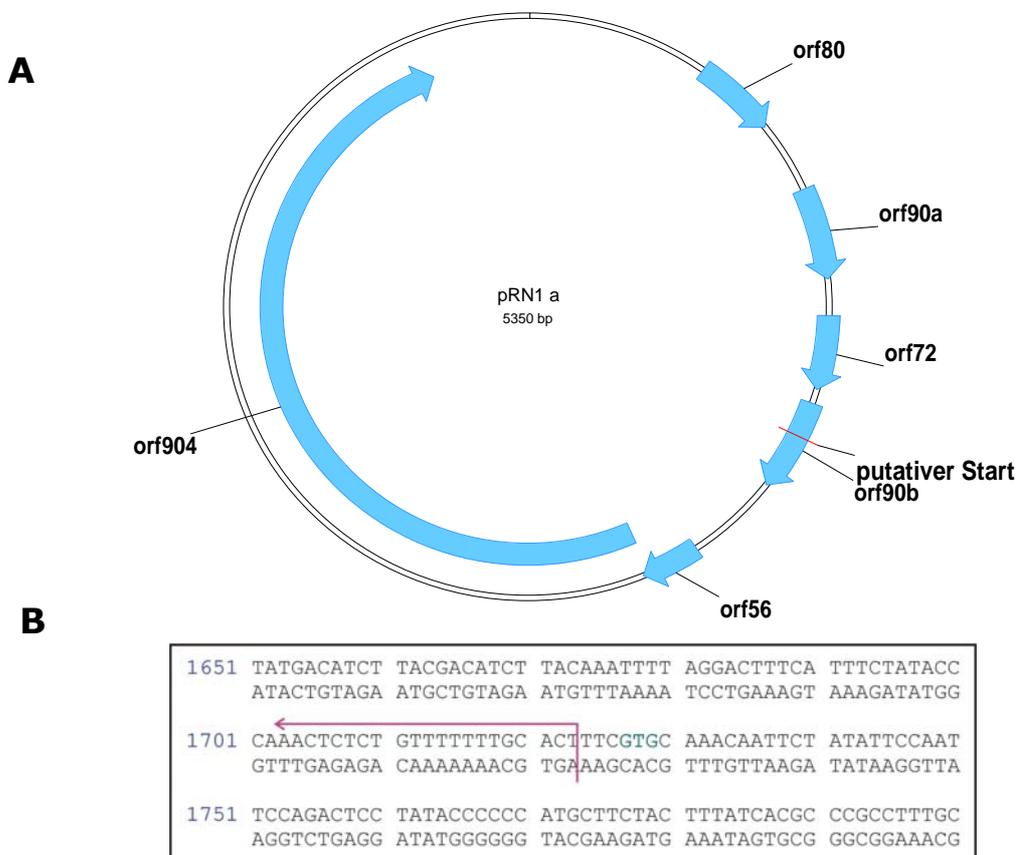
Die Primerverlängerung der ersten Reaktion der LM-PCR wurde mit den Primern aus Tabelle 9-5 durchgeführt. Diese Primer liegen verteilt auf pRN1 und sind komplementär zu beiden Plasmidsträngen. Danach erfolgte die Ligation mit den hybridisierten Desoxynukleotiden linkerA und linkerB aus Tabelle 9-5. Nach der Ligation wurde eine Fällung und im Anschluss eine PCR durchgeführt. Die Produkte dieser PCR wurden auf einem Agarosegel analysiert.



**Abbildung 3-29: Agarosegel eines Saccharosegradienten mit Standard-DNA. (A) Die Standard-DNA mit Fragmentgrößen von 200, 600 und 800 bp wurde mittels PCR hergestellt und auf einem alkalischen Saccharosegradienten aufgetrennt. (B) Die Fraktionen des Gradienten wurden geerntet und gefällt. Auf das Gel wurden die Fraktionen 19 – 34 aufgetragen.**

Von allen getesteten Primern führte nur Lm\_13 (Tabelle 9-5) zu einem eindeutigen Produkt (lief bei  $\approx 170$  nt auf dem Agarosegel). Dieses wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert, amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab einen theoretischen Startpunkt im *orf90b* (bei 1723, Abbildung 3-30). Die Replikation würde von diesem Punkt entgegen dem Uhrzeigersinn laufen in der Darstellung in Abbildung

3-30A. Interessanterweise befindet sich 3 nt vor des theoretischen Startpunkts ein GTG-Triplett, welches eine Initiation an dieser Stelle durch ORF904 ermöglichen würde (Abbildung 3-30B). Der ermittelte Startpunkt liegt 104 nt vom 5' Ende des Primers entfernt, zusammen mit dem Linker-Primer ergab sich also eine theoretische Produktlänge von 129 nt. Dies entsprach ungefähr dem beobachteten Produkt. Zusätzlich befindet sich etwa 5 Nukleotide hinter dem Start des Primers ein Abschnitt, welcher sich nur aus A-T-Basenpaaren zusammensetzt (Abbildung 3-30B). Ähnliche AT-reiche Abschnitte konnten bei vielen Replikationsursprüngen nachgewiesen werden, hier kommt es zum initialen Entwinden der DNA, woraufhin dann weitere Proteine rekrutiert werden und es zum Start der Replikation kommt.



**Abbildung 3-30: Durch LM-PCR ermittelter Startpunkt der Replikation. (A) Plasmidkarte von pRN1 mit dem möglichen Startpunkt der Replikation. (B) Ausschnitt aus der Sequenz von pRN1, Start und Richtung eines möglichen Primers sind eingezeichnet, das benachbarte GTG-Triplett ist farbig gekennzeichnet.**

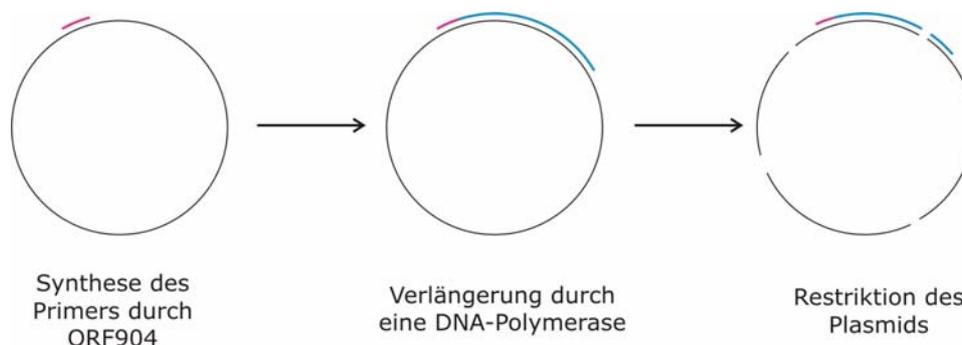
Allerdings konnte dieses freie 5' Ende im Anschluss nicht mit weiteren Primern, welche in der selben Region des Plasmids binden (z.B. Lm\_18), nachgewiesen werden. Dieses freie DNA-Ende könnte also entweder zufällig entstanden sein oder den Start eines Okazaki-Fragments darstellen.

Diese Tatsache und weitere, folgende Ergebnisse (siehe 3.3.1.3) führten zu dem Schluss, dass es sich bei dem ermittelten theoretischen Startpunkt nicht um den Replikationsursprung von pRN1 handelte.

### 3.3.1.2. Identifizierung des Startpunkts auf einzelsträngigen Plasmiden

Es wurde eine weitere Methode ausprobiert um den Startpunkt der Replikation von pRN1 zu identifizieren. Dabei handelte es sich um eine *in vitro* Methode, bei welcher die Position eines durch ORF904 synthetisierten Primers auf einem einzelsträngigen Plasmid kartiert werden sollte. Möglicherweise ist ORF904 in der Lage eine bestimmte Sequenz bzw. die daraus resultierende Sekundärstruktur, welche dem Replikationsursprung von pRN1 entspricht, zu erkennen und initiiert dort die Primersynthese. Als einzelsträngige Plasmide wurden zwei pBluescript-Vektoren verwendet, in welche Sinn- und Antisinnstrang des Plasmids pRN1 ligiert wurden (pBlue\_pRN1for und pBlue\_pRN1inv). Somit lag die vollständige Sequenz von pRN1 einzelsträngig vor.

Die Methode ist schematisch in Abbildung 3-31 dargestellt. Zuerst wurde ORF904 mit der einzelsträngigen Plasmid-DNA und dNTPs plus ATP inkubiert. Die dNTPs enthielten eine limitierende Menge [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP und es wurde somit ein radioaktiv markierter Primer synthetisiert. Um die Elongation dieses Primers durch ORF904 zu minimieren, wurde die Deletionsmutante N40-C370 eingesetzt (siehe 3.1.2.2.1). Danach erfolgte die erneute Zugabe von dNTPs und die Verlängerung mit einer DNA-Polymerase.



**Abbildung 3-31: Schematische Darstellung der Identifizierung der Initiationsstelle von ORF904 auf einzelsträngiger Plasmid-DNA.**

Es wurden eine Reihe von Polymerasen für diesen Versuch getestet, die beste Verlängerung des Primers wurde mit Klenow  $exo^-$ -Enzym erzielt. Im Anschluss daran wurde die DNA gefällt und dann mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten. Mittels Gelanalyse konnten dann verschieden lange Fragmente identifiziert werden, und aus der Länge der Fragmente konnten Rückschlüsse über ihren Startpunkt auf dem Plasmid und somit den Ort der Primersynthese gezogen werden.

Die Restriktionsanalyse der verlängerten Primer ergab nur für einige Restriktionsenzyme auswertbare Banden auf dem Gel (Abbildung 3-32). Dabei traten mit pBlue\_pRN1inv und mit pBlue\_pRN1for vergleichbare Banden auf. Die deutlichsten Banden waren für beide

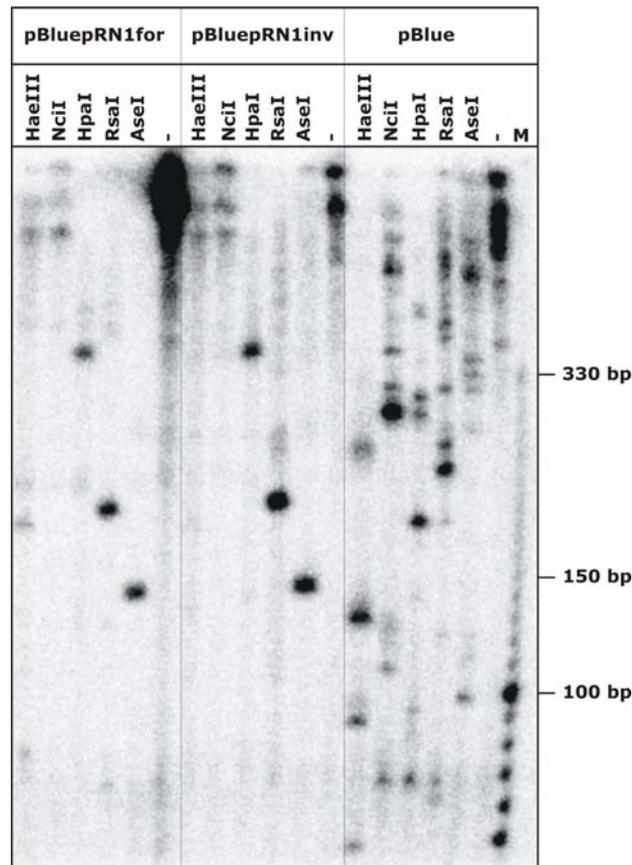
Template mit *AseI* ( $\approx 140$  nt), *RsaI* ( $\approx 200$  nt) und mit *HpaII* ( $\approx 350$  nt) zu erkennen. Beide Plasmide basieren auf pBluescriptIISK(+) und haben pRN1 in beiden Richtungen in ihre *multiple cloning site* ligiert. Der pBluescript-Anteil ist also bei beiden Templaten identisch. Die gleichen Banden für beide Versuche könnten darauf hindeuten, dass ORF904 den Primer in diesem Bereich synthetisiert. Allerdings ergab ein Vergleich der theoretischen Startpunkte mit den verwendeten Enzymen keine Übereinstimmungen, welche ein Hinweis auf einen solchen Startpunkt wären. Zur Kontrolle wurde dieser Versuch außerdem mit dem reinen pBluescript-Plasmid durchgeführt (Abbildung 3-32). Dabei trat mit den selben Enzymen ein anderes Bandenmuster auf, was zeigte, dass der Primer vermutlich nicht im pBluescript-Anteil des Plasmids synthetisiert wird.

Weshalb also mit pBlue\_pRN1for und pBlue\_pRN1inv als Templat vergleichbare Banden entstehen, ist unklar (die Identität beider Plasmide wurde durch Sequenzierung nach diesen Experimenten verifiziert). Zusätzlich ergibt die Kalkulation der theoretischen Startpunkte auf den beiden Plasmiden ausgehend von den vorhandenen Banden in keinem Fall eine Übereinstimmung. Das Bandenmuster des reinen pBluescript-Plasmids (Abbildung 3-32) zeigt, dass mit diesem Templat vermutlich eine größere Anzahl von Primern an verschiedenen Stellen synthetisiert wird, welche dann nach der Restriktion zu verschieden langen Fragmenten führen. Dagegen sind für die beiden anderen Plasmide für die Enzyme *AseI*, *RsaI* und *HpaII* eindeutige Banden zuerkennen, was für die Synthese des Primers an einer bestimmten Stelle spricht.

In diesem Experiment wurde die Deletionsmutante N40-C370 eingesetzt, da es mit diesem Protein nicht zu einer Verlängerung des gebildeten Primers kommt. Da aber die Erkennung einer spezifischen Startsequenz auch mit einem anderen Teil des Proteins stattfinden könnte, wurde der Versuch außerdem mit Vollängenprotein durchgeführt. Dabei entstanden undeutlichere Banden, da hier die Verlängerung des Primers mit radioaktiv markierten Nukleotiden erfolgen kann und somit markierte Restriktionsfragmente sichtbar werden können, welche nicht auf einem markierten Primer beruhen. Es wurde allerdings eine limitierende Menge von radioaktiv markiertem dATP eingesetzt, um das zu vermeiden. Bei diesem Versuch war ein vergleichbares Bandenmuster zu beobachten, beide Proteine synthetisieren also vergleichbare Primer mit den verwendeten Templaten.

Es ist möglich, dass die ähnlichen Banden durch eine DNA-Kontamination der Plasmidpräparationen hervorgerufen wurden. Diese könnte während der Präzipitation der Gesamt-DNA aus dem *E. coli*-Überstand aufgetreten sein.

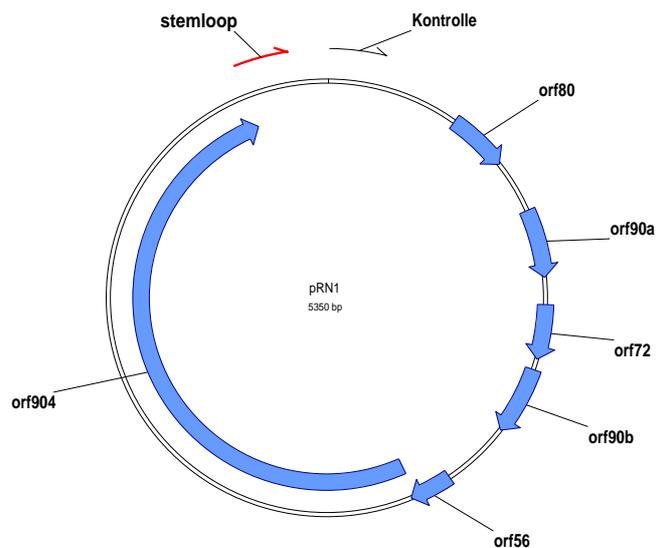
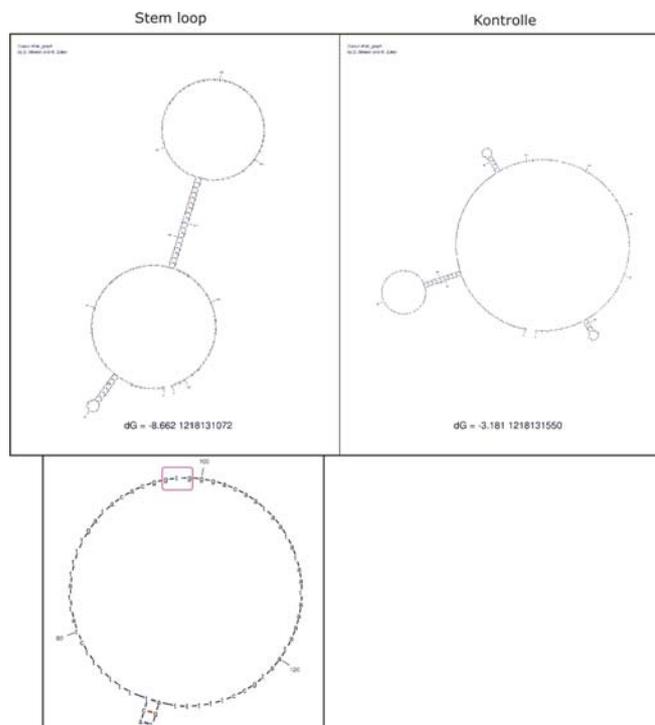
Es konnte also mit dieser Methode kein Punkt festgestellt werden, an dem ORF904 die Synthese des Primers bevorzugt startet. Die Ergebnisse lassen allerdings vermuten, dass die Primersynthese mit einzelsträngiger Plasmid-DNA nicht wahllos stattfindet, sondern an wenigen, möglicherweise nur einem definierten Punkt startet.



**Abbildung 3-32: Analyse der Position des Primers auf einzelsträngiger Plasmid-DNA. 5 µg der angegebenen pBluescript-Plasmide wurden mit 0,4 µM N40-C370, 1 mM rNTPS und 10 µM dNTPs-dATP mit [ $\alpha^{32}$ P]dATP inkubiert. Die gebildeten Primer wurden mit Klenow-Enzym und 1 mM dNTPs verlängert. Danach wurde die DNA gefällt und mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten.**

### 3.3.1.3. Verwendung eines identifizierten putativen Ursprungs

Versuche mit einem pRN1-basierten Shuttle-Vektor ergaben, dass eine ca. 200 bp lange Region, welche direkt stromabwärts des *orf904* liegt, essentiell für die Plasmidreplikation ist (Berkner & Lipps, unveröff.). Die DNA in diesem Bereich bildet einen ausgedehnten *stem-loop*, welcher auch bei hohen Temperaturen stabil ist (Abbildung 3-33). Möglicherweise stellen dieser *stem-loop* und die umgebenden Bereiche den Replikationsursprung dar. In der Schlaufe befindet sich ein GTG-Triplett, welches als Startpunkt für die Primersynthese durch ORF904 dienen könnte (Abbildung 3-33C). Allerdings lassen sich keine deutlichen DNA-Repeats (Iterons) in der Region detektieren, welche für (plasmidale) Replikationsursprünge typisch sind (del Solar *et al.*, 1998).

**A****B**

**Abbildung 3-33: Vermuteter Replikationsursprung von pRN1. (A) Position des essentiellen Bereiches in pRN1. Außerdem eingezeichnet ist die Region welche als Kontrolle verwendet wurde. (B) Sekundärstruktur des essentiellen Bereiches und der Kontrollregion. Die Sekundärstruktur wurde mit UNAFold ( $T=75^{\circ}\text{C}$ ,  $0,1\text{ M NaCl}$ ,  $0,05\text{ mM MgCl}_2$ ) bestimmt. (C) Ausschnitt aus der Schlaufe des *stem-loops* mit gekennzeichnetem GTG-Triplett.**

Es wurde versucht, den vermuteten Replikationsursprung als Templat für ORF904 einzusetzen und zu untersuchen, ob die Primersynthese damit stattfindet. In den Versuchen wurde ein PCR-Fragment verwendet, welches die essentielle Region umfasste. Dieses wurde entweder als Doppelstrang eingesetzt oder zu Einzelsträngen denaturiert. Dabei sollte sich der *stem-loop* bilden und für das Protein gut verfügbar sein. Als

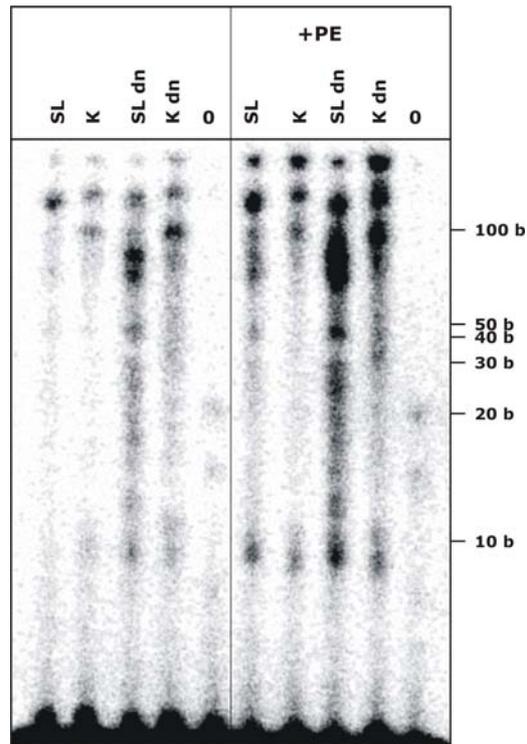
Negativkontrolle diente eine zufällig gewählte DNA-Region vergleichbarer Länge aus pRN1, welche keinen deutlichen *stem-loop* bildete (Abbildung 3-33B).

Zuerst wurden die PCR-Fragmente mit ORF904 und rNTPS und dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP inkubiert. Dabei entstand mit beiden doppelsträngig vorliegenden DNA-Substraten kein sichtbarer Primer (Abbildung 3-34). Dagegen war mit den denaturierten, einzelsträngigen Templaten eine kleine Primermenge und längere Produkte, welche wahrscheinlich durch die Verlängerung dieses Primers entstanden, sichtbar. Zwischen dem *stem-loop*-Bereich und der Negativkontrolle war bei diesem Experiment ein Unterschied zu sehen, aber mit dem Kontrollfragment wurden auch kleinere Mengen Primer synthetisiert.

Da mit dem doppelsträngigen PCR-Fragment des *stem-loops* kein Primer gebildet werden konnte, scheint ORF904 allein nicht in der Lage zu sein, eine bestimmte Sequenz auf diesem Strang zu erkennen und die DNA zu entwinden, um die Primersynthese zu ermöglichen. Dieser Prozess wird in der Zelle also wahrscheinlich von anderen Proteinen ausgeführt. Um den Einfluss zellulärer Proteine auf die Primersynthese von ORF904 mit den PCR-Templaten zu überprüfen, wurde ein DNA-freier *Sulfolobus*-Rohextrakt hergestellt. Dafür wurde *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 verwendet, dieser Stamm ist in der Lage pRN1 zu replizieren, die eingesetzten Zellen enthielten allerdings kein Plasmid. Die PCR-Fragmente wurden mit diesem Proteinextrakt kurz inkubiert, dann wurden ORF904 und Nukleotide zugegeben. Um auszuschließen, dass ORF904 noch vorhandene DNA im Rohextrakt als Substrat nutzt, wurden während des Experiments Kontrollansätze ohne die Zugabe von Templat untersucht. Diese waren immer negativ.

Die Zugabe des Rohextraktes erhöhte die Primersynthese mit allen Templaten (Abbildung 3-34). Mit den doppelsträngigen PCR-Fragmenten des *stem-loops* und der Kontrollregion wurde im Gegensatz zum vorherigen Experiment eine geringe Menge Primer und Verlängerungsprodukte synthetisiert. Die einzelsträngigen Substrate ermöglichten die Synthese größerer Mengen Primer. Bei beiden Ansätzen waren mit der Negativkontrolle ebenfalls Produkte zu sehen, was dafür spricht, dass die beobachtete Aktivität nicht ausschließlich spezifisch für eine bestimmte DNA-Sequenz ist.

Allgemein führte die Zugabe von Rohextrakt in allen Ansätzen zu einer erhöhten Primaseaktivität, was darauf hinweist, dass zusätzlich zu ORF904 vermutlich weitere zelluläre Proteine aus *Sulfolobus* an der Initiierung der Replikation beteiligt sind. Außerdem war die Primaseaktivität mit den *stem-loop*-Templaten in allen Fällen höher als die der Kontrollfragmente, es ist also eine gewisse Bevorzugung des *stem-loops* als Templat zu erkennen.

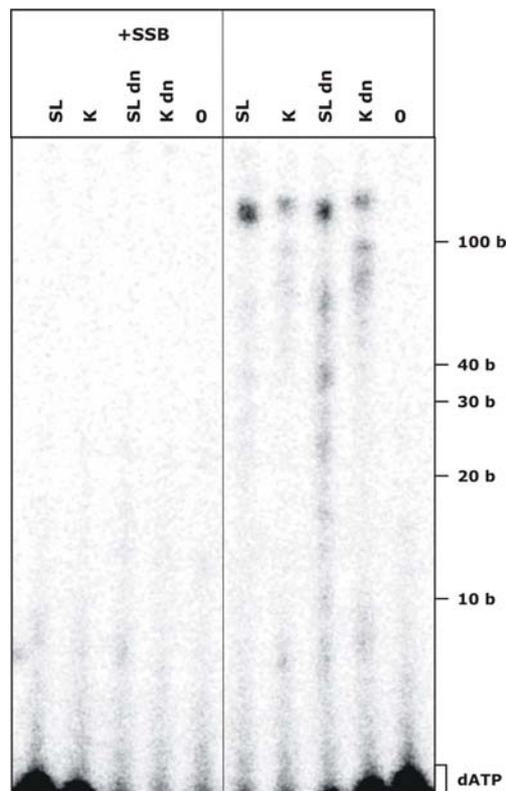


**Abbildung 3-34: Primaseaktivität von ORF904 mit dem vermuteten Replikationsursprung.** 0,8  $\mu\text{M}$  der PCR-Fragmente des stem-loops (SL) oder der Kontrollregion (K) wurden pur oder hitzedenaturiert mit 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904, 1 mM rNTPs und 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde DNA-freier *S. acidocaldarius* Proteinextrakt zugesetzt (PE). Die Kontrollen 0 enthielten kein DNA-Templat.

Zur Einrichtung eines *in vitro* Replikationssystems wäre es wichtig, diejenigen Proteine zu identifizieren, welche an der Initiation der Primersynthese auf dem verwendeten Templat beteiligt sind. Das Einzelstrangbindeprotein (RPA) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein und an fast allen zellulären Prozessen, welche DNA modifizieren beteiligt. Um zu überprüfen, ob die im obigen Experiment erzielten Resultate auf die Aktivität von RPA zurückzuführen sind, wurde das Experiment mit gereinigtem Einzelstrangbindeprotein von *Sulfolobus solfataricus* wiederholt. Dieses Protein war in der Lage die Primaseaktivität von ORF904 auf kurzen Oligodesoxynukleotiden zu unterbinden (siehe 3.1.2.2.4). Eventuell ermöglicht es im Rahmen des Replikationsinitiation an einem Ursprung allerdings eine spezifische Interaktion von ORF904 mit der DNA. Dies wäre vergleichbar mit der Replikation des Phagen G4, dabei interagiert die *E. coli*-Primase nur mit einem Replikationsursprung, der mit RPA bedeckt ist (Sun & Godson, 1996).

Für dieses Experiment wurden wieder die PCR-Fragmente des *stem-loops* und der Kontrollregion eingesetzt. Zuerst wurde die DNA mit dem Einzelstrangbindeprotein inkubiert, dabei wurde eine Menge RPA zugegeben, die ausreicht, um den Doppelstrang theoretisch zu 50 % zu bedecken. Danach wurden ORF904 und Nukleotide zugegeben.

Es kam bei diesem Experiment in allen Ansätzen, welche RPA enthielten zu einer Unterdrückung der Primersynthese (Abbildung 3-35). Sowohl mit den einzel- als auch mit den doppelsträngigen DNA-Substraten konnte ORF904 keinen Primer synthetisieren, wenn RPA vorhanden war. Dem Protein wird möglicherweise der Zutritt zur DNA erschwert. Dies zeigt, dass die im vorherigen Experiment beobachtete erhöhte Primaseaktivität der Ansätze mit Rohextrakt auf andere Proteine zurückzuführen sein muss.



**Abbildung 3-35: Einfluss von RPA auf die Primaseaktivität von ORF904 mit dem vermuteten Replikationsursprung. 0,8  $\mu\text{M}$  der PCR-Fragmente des stem-loops (SL) oder der Kontrollregion (K) wurden pur oder hitzedenaturiert mit 0,4  $\mu\text{M}$  ORF904, 1 mM rNTPs und 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP inkubiert. Ein Teil der DNA wurde vorher mit 10,3  $\mu\text{M}$  RPA inkubiert. Die Kontrollen 0 enthielten kein DNA-Templat.**

Mit keinem der Versuche konnte eindeutig eine Region von pRN1 als Replikationsursprung identifiziert werden. Die Ergebnisse der Experimente mit dem pRN1-Shuttlevektor weisen stark darauf hin, dass in der beschriebenen Region die Replikation gestartet wird, aber die Rolle von ORF904 verbleibt unklar.

### 3.3.2. Interaktion von ORF904 mit anderen Proteinen

Die vorherigen Versuche ergaben, dass vermutlich ein oder mehrere zelluläre Proteine an der Replikation von pRN1 beteiligt sind. Als möglicher Ansatz, diese Proteine zu identifizieren, wurde versucht, Interaktionspartner von ORF904 zu finden.

Dabei wurden zum einen rekombinant exprimierte und gereinigte Proteine aus *Sulfolobus solfataricus* eingesetzt, welche an der Replikation von DNA beteiligt sind. Die dafür verwendeten Proteine sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

MCM (*mini chromosome maintenance*) kommt als Homolog in Archaea und Eukarya vor. Dabei treten in Eukaryoten Heterohexamere verschiedener Zusammensetzung aus den Proteinen MCM2-7 auf (Tye, 1999). Da MCM für die DNA-Replikation essentiell ist und leichte Helikase-Aktivität zeigt, wird vermutet, dass es sich bei den beobachteten Komplexen um die replikative Helikase in eukaryotischen Zellen handelt (Labib & Diffley, 2001). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass MCM an der Initiation der Replikation beteiligt ist, da sich in der Nähe des eukaryotischen *origin recognition complex* größere Mengen des Proteins nachweisen lassen (Edwards *et al.*, 2002). In *Sulfolobus solfataricus* (und anderen Archaeen) kommt dagegen nur ein MCM-Protein vor, welches einzelne Homohexamere bildet, die Helikaseaktivität haben (Carpentieri *et al.*, 2002). Es wird deshalb auch hier angenommen, dass sie die replikative Helikase stellen. Obwohl ORF904 eine eigene Helikaseaktivität besitzt, könnte es mit MCM interagieren und z.B. nur die Entwindung des Startpunkts der Replikation durchführen und dann MCM zur Weiterführung der Entwindung rekrutieren.

Die Proteine PCNA 1,2 und 3 (*proliferating cell nuclear antigen*) bilden in *Sulfolobus solfataricus* ein Heterotrimer, welches die DNA ringförmig umschließt, eine sogenannte *sliding clamp* (Dionne *et al.*, 2003a). In Eukaryoten ist PCNA dagegen ein ringförmiges Homotrimer, welches mit einer Vielzahl von DNA-modifizierenden Proteinen interagiert und ihnen eine bessere Bindung an DNA ermöglicht. Es konnten bis jetzt u.a. Interaktionen mit DNA-Polymerasen (zur Erhöhung der Prozessivität), Ligase, Topoisomerasen, Helikasen und weiteren gezeigt werden (Moldovan *et al.*, 2007). Für den PCNA-Komplex in *Sulfolobus* konnten Interaktionen mit Reparaturenzymen (DNA-Polymerasen und Endonukleasen), Ligase und DNA-Glycosylase gezeigt werden (Gruz *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2003; Dionne & Bell, 2005). Eine Interaktion von ORF904 mit dem PCNA-Trimer zur Erhöhung der Bindung an DNA ist vorstellbar und wurde deshalb untersucht. Da gezeigt wurde, dass verschiedene Proteine bestimmte Bereiche des Trimers zur Interaktion verwenden (z.B. (Dore *et al.*, 2006) wurden für die Interaktionsstudien mit ORF904 zum einen die drei einzelnen PCNA-Proteine einzeln verwendet und zum anderen ein assemblierter Komplex.

Außerdem wurde eine mögliche Interaktion mit PolB1, einer DNA-Polymerase der Polymerase-Familie B aus *Sulfolobus solfataricus*, untersucht. Es ist nicht vollständig geklärt, welche DNA-Polymerasen in *Sulfolobus* vorrangig replikativ sind, aber vermutlich sind es wie bei Eukaryoten auch, Mitglieder der B-Polymerasen (Pisani *et al.*, 1992; Datukishvili *et al.*, 1996). Da ORF904 nur eine sehr schwache Polymeraseaktivität hat, kommt es vermutlich schon kurz nach der Bildung des Primers zur Übergabe des freien 3'-OH an eine prozessivere DNA-Polymerase. In Eukaryoten kommt es dafür während der

DNA-Replikation zur Formierung eines Komplexes aus Polymerase  $\alpha$  und den Primase-Untereinheiten. Eine ähnliche Assoziation von Primase und DNA-Polymerase ist auch für die archaeale Replikation denkbar.

Das Einzelstrangbindeprotein RPA aus *Sulfolobus solfataricus* interagiert ebenfalls mit einer Reihe DNA-abhängiger Enzyme, wie zum Beispiel reverser Gyrase oder RNA-Polymerase (Napoli *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2004). Außerdem konnte, wie oben bereits erwähnt, eine erhöhte Affinität von DnaG aus *E. coli* zum Replikationsursprung des Phagen G4 beobachtet werden, wenn die DNA mit RPA bedeckt war (Sun & Godson, 1996).

Die rekombinanten Proteine MCM und PCNA1 bis 3 wurden selbst aufgereinigt, die Plasmide wurden von Stephen Bell (Oxford) bereitgestellt. Dieser stellte auch den PCNA-Komplex und PolB1 zur Verfügung. Das Einzelstrangbindeprotein wurde von Dr. Dong Han aufgereinigt und bereitgestellt.

Zum anderen wurde die Interaktion von ORF904 mit den ebenfalls auf pRN1 kodierten Proteinen ORF56 und ORF80 untersucht. ORF56 ist vermutlich ein Transkriptionsregulator, der das *orf56/orf904*-Kotranskript kontrolliert, dieses Protein ist also wahrscheinlich nicht direkt an der Replikation beteiligt, sondern reguliert sie indirekt über die Menge an exprimiertem ORF904 (Lipps *et al.*, 2001b; Berkner & Lipps, 2007). Für ORF80 konnte dagegen gezeigt werden, dass dieses Protein an zwei nah beieinander liegende Stellen oberhalb seines Gens bindet (Lipps *et al.*, 2001a). Deshalb wurde angenommen, dass ORF80 den Replikationsursprung erkennt und bindet. Weitergehende Experimente mit dem pRN1-Shuttlevektor konnten aber zeigen, dass ORF80 für die Replikation des Plasmids nicht essentiell ist. Eine Deletion des Gens reduziert zwar auf Dauer die Stabilität des Plasmids in *Sulfolobus*, aber sie führt nicht zu völliger Inaktivität. Trotzdem wurde eine mögliche Interaktion von ORF904 mit diesen Proteinen untersucht. Nachdem mit Transkriptanalysen gezeigt werden konnte, dass der Startpunkt von ORF80 vier Aminosäuren hinter dem vorher annotierten Start liegt (Berkner & Lipps, 2007), wurde dieses kürzere Protein („ORF76“) kloniert und aufgereinigt. Der Name ORF80 wurde aus Gründen der Konsistenz beibehalten. Das Protein ORF56 wurde von Dr. Georg Lipps aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.

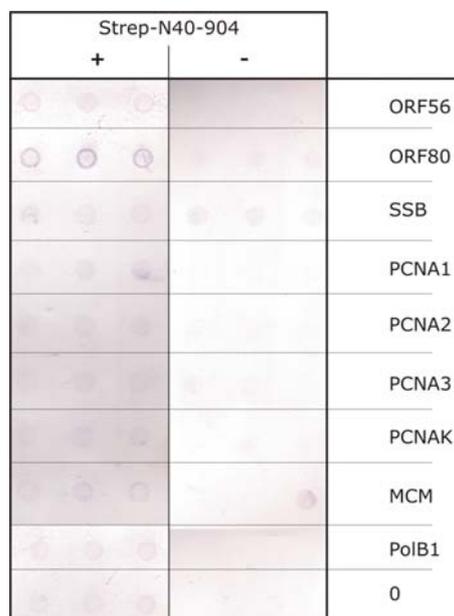
### **3.3.2.1. Dot Blot**

Zuerst wurde versucht die Interaktion von ORF904 mit anderen Proteinen mittels Dot-Blot zu untersuchen. Beim Dot-Blot werden die zu untersuchenden Proteine zuerst mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Nach dem Blocken der Membran erfolgte die Inkubation mit ORF904, dabei sollte das Protein an mögliche Interaktionspartner binden. Die verwendete ORF904-Variante verfügte über

einen strep-Tag und konnte im Anschluss mittels eines strep-Tag spezifischen Antikörpers durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden.

Für den Versuch wurden pro Protein drei Punkte mit jeweils 750 ng Protein aufgetragen. Für die Interaktion wurde die Membran in 5 ml Puffer mit 15 µg strep-N40-904 inkubiert. Parallel wurde auch eine Membran ohne die Zugabe von ORF904 bearbeitet, um mögliche Kreuzreaktionen der Proteine mit dem Antikörper zu entdecken.

Nach dem Entwickeln konnte für alle Proteine eine gesteigerte Farbentwicklung gegenüber der Kontrollmembran beobachtet werden (Abbildung 3-36). Vermutlich bedeutet das, dass ORF904 unter den verwendeten Bedingungen unspezifisch alle Proteine leicht bindet. Für ORF80 und PCNA1 waren allerdings intensivere Farbreaktionen zu beobachten, was darauf hinweist, dass mit diesen Proteinen eine Interaktion stattfinden könnte.

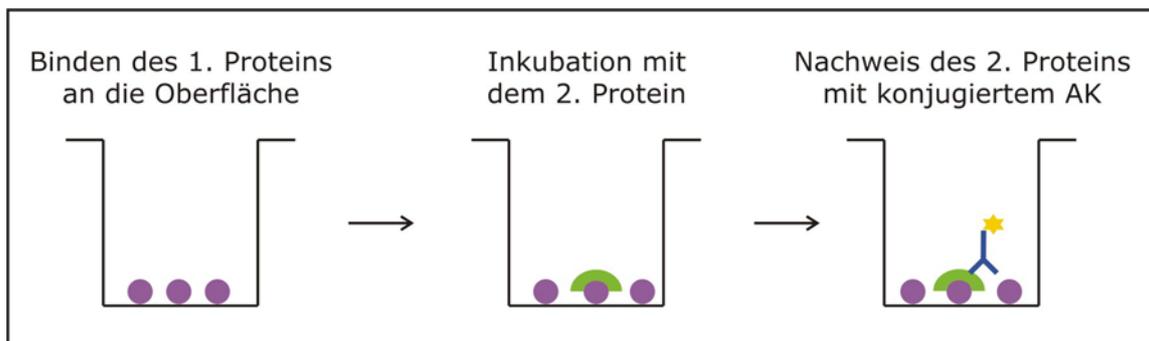


**Abbildung 3-36: Dot-Blot zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von ORF904. Auf die Membran wurden pro Punkt 750 ng des angegebenen Proteins aufgetragen. Danach erfolgte die Inkubation mit strep-N40-904 und der Nachweis dieses Proteins mittels Antikörper. Auf der rechten Seite ist die Negativkontrolle dargestellt, diese wurde ohne strep-N40-904 inkubiert.**

Da es bei diesem Versuch zu einer relativ starken Hintergrundaktivität kam, welche die Identifizierung der Interaktionen erschwerte, wurde im folgenden versucht, eine Methode zu entwickeln, mit der diese Interaktionen besser nachgewiesen und, wenn vorhanden, quantifiziert werden könnten.

### 3.3.2.2. Plattenbasierte Interaktionsstudien

Nachdem mit dem vorherigen Experiment eine mögliche Interaktion von ORF904 mit anderen Proteinen detektiert werden konnte, wurde eine Methode gesucht, um die Interaktionen in größerem Maßstab, genauer und quantifizierbar untersuchen zu können. Dazu wurde ein abgewandelter ELISA-Assay nach Carpentieri *et al.* (2002) verwendet, der in Abbildung 3-37 schematisch dargestellt ist. Dabei wurde ein zu untersuchendes Protein auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach dem Waschen und Blocken erfolgte die Inkubation mit ORF904 (oder einer Variante davon), welches einen strep-Tag trug. Dieser strep-Tag konnte dann im Anschluss mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Der Antikörper war mit alkalischer Phosphatase konjugiert und bei der angewendeten Farbreaktion entstand ein lösliches Produkt, welches die photometrische Analyse ermöglichte. Diese Methode bot einige Vorteile bei der Untersuchung der Interaktion von ORF904 mit anderen Proteinen. Zum einen konnten damit eine größere Anzahl von Proteinen zeitsparend und parallel unter vergleichbaren Bedingungen bearbeitet werden, außerdem konnte es durch die photometrische Messung leicht quantifiziert und ausgewertet werden.



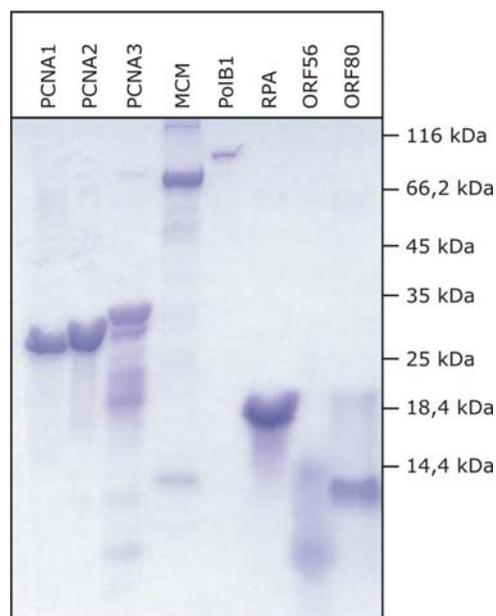
**Abbildung 3-37: Schema des plattenbasierten Interaktionsassays.**

#### 3.3.2.2.1. Interaktion von ORF904 mit anderen archaealen Proteinen

Mit diesem Assay wurden wiederum die gereinigten Proteine aus *Sulfolobus solfataricus* und die pRN1-kodierten Proteine ORF80 und ORF56 getestet, die in Tabelle 3-2 aufgeführt sind. Ein Proteingel der Proteine ist in Abbildung 3-38 dargestellt.

**Tabelle 3-2: Übersicht über die in den Interaktionsassays verwendeten Proteine aus *Sulfolobus*.**

Protein	MW (kDa)	
PCNA1	27,5	
PCNA2	27,4	Bilden als Heterotrimer <i>sliding clamp</i>
PCNA3	29,3	
PCNA-Komplex	Trimer aus PCNA1,2 und 3	
MCM	Hexamer aus 77 kDa-Untereinheiten	Vermutliche replikative Helikase
PolB1	103,6	DNA-Polymerase
RPA	16,1	Einzelstrangbindeprotein
ORF56	6,6	Kodiert auf pRN1
ORF80	9,5	



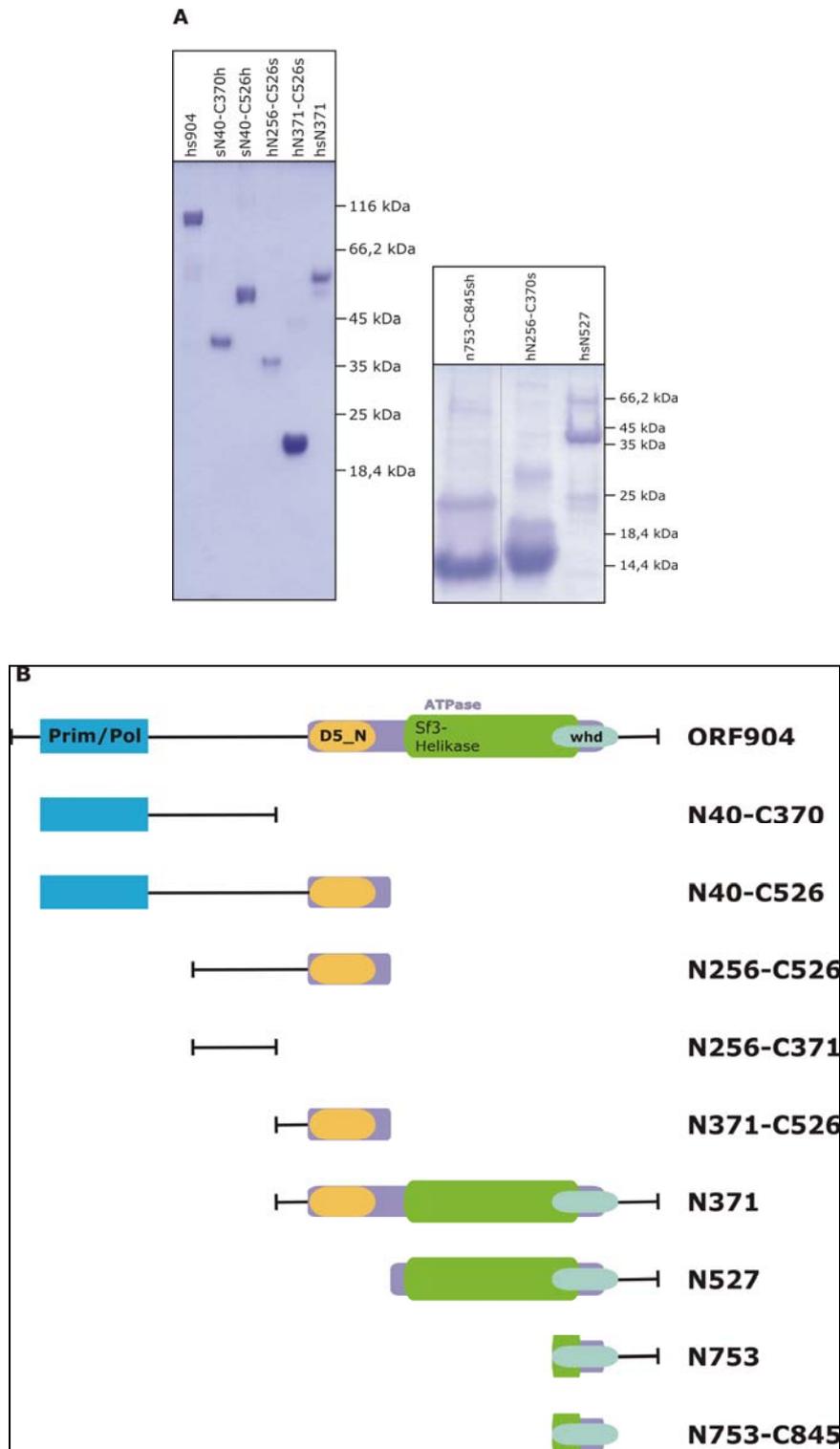
**Abbildung 3-38: Proteingel der Proteine, welche in den Interaktionsassays eingesetzt wurden.**

Für die plattenbasierten Interaktionsstudien wurden verschiedene Varianten von ORF904 eingesetzt (aufgeführt in Tabelle 3-3 und Abbildung 3-39) . Allen war gemeinsam, dass sie sowohl über einen his-Tag als auch über einen strep-Tag verfügten. Die Tags waren entweder an N- und C-Terminus oder beide an einem Terminus fusioniert. Die erste Reinigung der Proteine erfolgte immer über eine Affinitätschromatographie über den his-Tag, bei einem Vorhandensein großer Mengen kontaminierenden Proteins wurde, falls möglich eine Reinigung mittels des strep-Tags angeschlossen. Im Anschluss wurden alle Proteine noch über eine Kationenaustauscherchromatographie gereinigt und aufkonzentriert.

Die verschiedenen Deletionsmutanten von ORF904 wurden eingesetzt, um den genauen Ort der Interaktion mit einem anderen Protein besser zu identifizieren. Auf die Auswahl der Deletionen wird später genauer eingegangen.

**Tabelle 3-3: Varianten von ORF904 für die Untersuchung der Interaktion. His und strep zeigen den Ort des 6xhis- bzw. strep-Tags an. N zeigt die erste Aminosäure der Deletionsmutante an, C die letzte.**

Protein	MW (kDa)
His-strep-904	109,0
strep-N40-C370-His	41,3
strep-N40-C526-His	60,1
His-N256-C526-strep	36,1
His-N256-C370-strep	17,4
His-N371-C526-strep	22,2
His-strep-N371	64,3
His-strep-N527	46,6
N753-strep-His	20,3
N753-C845-strep-His	13,2



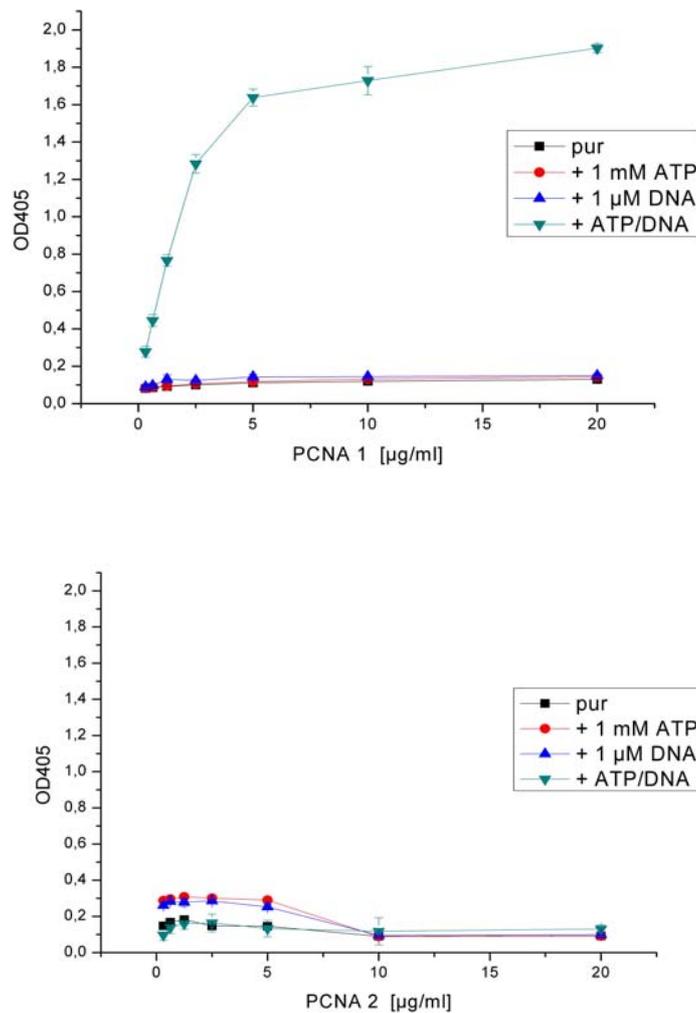
**Abbildung 3-39: Deletionen von ORF904. (A) Proteingele aller Deletionsmutanten (B) Schematische Darstellung aller in den Interaktions-experimenten eingesetzten Deletionsvarianten von ORF904 (siehe auch Tabelle 3-3). Die dargestellten konservierten Domänen sind Prim/Pol-Domäne (AS40 -190), D5\_N-Domäne (AS417-509), ATPase-Domäne (AS416-827), die Helikase-Domäne (AS 546-797) und die vermutete *winged helix* Domäne (whd) (AS 753-845).**

Für die Interaktionsassays wurden verschiedene Mengen des jeweiligen Proteins an die Oberflächen der Mikrotiterplatten immobilisiert. In jeweils 3x7 *wells* wurde eine Verdünnungsreihe von 20 bis 0,3 µg/ml gebunden. In drei weiteren *wells* wurde nur BSA (welches zudem zum Blocken benutzt wurde) gebunden, um den Hintergrund der Bindung von ORF904 an BSA zu bestimmen. Für die Interaktion wurden im Anschluss 10 µg/ml ORF904 bzw. um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, die selbe Molarität der Deletionsmutanten in alle *wells* gegeben. Alle Inkubationen erfolgten in PBS und bei Raumtemperatur.

Die Bindung der Proteine und die Inkubation mit ORF904 erfolgte für ca. 12 h. Da die Farbentwicklung der Substratlösung mit pNPP (p-Nitrophenylphosphat) nur sehr langsam war, musste die Inkubation mit der Detektionslösung für ca. 12 bis 14 h erfolgen. Da es manchmal aus unbekanntem Gründen zu einer relativ hohen Hintergrundaktivität von ORF904 oder einer der Deletionsmutanten und BSA kam, wurden nur Platten für die Auswertung verwendet, bei denen die OD<sub>405</sub> der Kontrollen unter 0,1 lag.

#### **3.3.2.2. Ergebnisse der Interaktion mit anderen Proteinen**

Wie beschrieben wurde für jedes Protein eine Verdünnungsreihe erstellt und diese mit einer einheitlichen Konzentration von ORF904 inkubiert. Die gemessenen Absorptionen konnten dann gegen die Konzentrationen der Proteine aufgetragen werden. In Abbildung 3-40 ist ein Beispiel einer solchen Auswertung. Die Messungen wurden mit PCNA1 und His-strep-904 als Interaktionspartner durchgeführt (die dort dargestellten Kurven wurden durch Inkubation der beiden Proteine mit ATP und/oder DNA bestimmt, was später genauer erläutert wird). Für jedes Proteinpaar konnten derartige Kurven erstellt werden. Dabei zeigte sich nach der Durchführung einiger initialer Versuche, dass mit vielen Proteinen Absorptionen gemessen wurden, die deutlich über den Kontrollen lagen. Vermutlich handelte es sich nicht bei allen diesen Werten um das Resultat echter Interaktion, sondern um ein intrinsisches Problem des Versuchs. Um eindeutige Proteininteraktionen zu identifizieren, wurde deshalb ein Minimum von OD<sub>405</sub>=1,0 nach 12 h gesetzt, nur oberhalb dieses Wertes wurde eine reale und stabile Interaktion angenommen. Dieser Assay ist also auf Grund dessen vermutlich nur geeignet, um relativ hochaffine Interaktionen zu detektieren, schwächere Interaktionen können damit nicht zweifelsfrei erkannt werden.



**Abbildung 3-40: Interaktion von PCNA1 und PCNA2 mit His-strep-904. Die Proteine wurden immobilisiert und dann mit His-strep-904 inkubiert. Bei der Inkubation wurden außerdem zugesetzt 1 mM ATP, 1 µM Oligodeoxynukleotid int\_1 oder ATP und DNA. Danach wurde gebundenes His-strep-904 photometrisch nachgewiesen. Aufgetragen sind die unbereinigten Meßwerte ( $OD_{kontr} < 0,1$ ). Nur wenn DNA und ATP zugesetzt werden, kam es zu einer Bindung von His-strep-904 an PCNA1. PCNA2 interagiert nie mit H6-strep-904.**

In Tabelle 3-4A sind alle Messwerte der Versuche mit ORF904 bzw. den entsprechenden Deletionsmutanten und den Proteinen aus *S. solfataricus* zusammengefasst. Zuerst wurden die Messungen mit His-strep-904, dem Volllängenprotein ohne weitere Zusätze durchgeführt. Dabei zeigte sich mit keinem der Proteine eine Interaktion. Da die Interaktion von ORF904 mit großer Wahrscheinlichkeit an der DNA stattfindet, wurden als nächstes Inkubationen mit ORF904 und zugesetztem ATP (1 mM) oder einem Oligodesoxynukleotid (1 µM, int\_1, Tabelle 9-7) durchgeführt. Die ausgewählte DNA war 37 nt lang und enthielt die Erkennungssequenz GTG. Interessanterweise kam es dabei, wenn nur ATP oder nur DNA zugesetzt wurden (Tabelle 3-4B und C) nicht zu einer

Interaktion von ORF904 mit den immobilisierten Proteinen. Wenn allerdings sowohl ATP als auch DNA vorhanden waren, kam es mit PCNA1 und ORF80 zu einem positiven Signal (Tabelle 3-4D). Da diese Interaktion spezifisch nur mit diesen beiden Proteinen und nur in Anwesenheit von ATP und DNA auftrat, handelte es sich vermutlich um eine echte Interaktion dieser Proteine und nicht beispielsweise um ein unspezifisches Binden der DNA durch beide. Mit den Proteinen PCNA1 und ORF80 wurde bereits im Dot-Blot-Versuch (3.3.2.1) Interaktion mit ORF904 beobachtet, allerdings wurde dieser Versuch ohne die Zugabe von DNA oder ATP durchgeführt. Unklar ist allerdings, weshalb ORF904 in der Lage war, mit PCNA1 zu interagieren, es aber nie zu einer Interaktion mit dem PCNA-Komplex kam, welcher ebenfalls PCNA1 enthielt.

Nachdem damit gezeigt war, dass ORF904 in der Lage ist, mit diesen zwei Proteinen zu interagieren, wurde versucht mit verschiedenen Deletionsmutanten den Ort der Interaktion in ORF904 zu lokalisieren. Zuerst wurden dazu die Deletionsmutanten N40-C370 und N40-C526 eingesetzt (Abbildung 3-39). N40-C370 umfasst die Prim/Pol-Domäne und einen Teil des uncharakterisierten zentralen Bereichs von ORF904, N40-C526 umfasst ebenfalls die Prim/Pol-Domäne und endet vor der Helikase-Domäne. Diese Mutante enthält allerdings schon einen kleinen Teil der vermuteten ATPase-Domäne und die vollständige konservierte Domäne D5\_N, welche auch in viralen Replikationsproteinen wie *gpa* des Phagen P4 vorkommt.

Mit N40-C370 konnte keine Interaktion mit einem der getesteten Proteine beobachtet werden, aber N40-C526 war in der Lage mit ORF80 zu interagieren. Dies wies darauf hin, dass zumindest die Interaktion mit ORF80 möglicherweise über die Aminosäuren 370 bis 526 vermittelt wird. Interessant war auch, dass diese Bindung im Gegensatz zu der des Volllängenproteins ohne die Zugabe von ATP oder DNA erfolgte.

Die Ergebnisse führten zur Konstruktion weiterer Deletionsmutanten. Zum einen wurde mit N256-C526 eine Mutante eingesetzt, welche den gesamten Bereich zwischen der Prim/Pol- und der Helikase-Domäne umschloss, außerdem wurden zwei Proteine erstellt, die Teile dieses Bereichs, N256-C370 und N371-C526 umfassten. Die Versuche mit diesen Deletionsmutanten bestätigten die Annahme, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren 370 und 526 für die Interaktion wichtig ist. Sowohl N256-C526 wie auch N371-C526, welche diese Aminosäuren enthalten, banden ORF80, N371-C526 zeigte dazu noch Interaktion mit PCNA1 sowie mit RPA. Dagegen konnte mit N256-C370 keine Interaktion detektiert werden, was das negative Ergebnis mit N40-C370 bestätigt, diese Aminosäuren scheinen nicht an der detektierten Interaktion beteiligt zu sein.

Es wurden zwei weitere Deletionsmutanten auf eine mögliche Interaktion mit den verwendeten Proteinen getestet, N371 umfasste die gesamte ATPase- und Helikase-Domäne und enthielt außerdem die vermutete *winged helix* Domäne, welche möglicherweise zum Binden von DNA benutzt wird. Eine weitere Deletionsmutante enthielt ausschließlich die *winged helix* Domäne (N753-C845). Für diese beiden Mutanten



**C mit Zugabe von 1  $\mu$ M Oligodesoxynukleotid int\_1**

	MCM	PCNA 1	PCNA 2	PCNA 3	PCNA -K	PoIB1	RPA	ORF 56	ORF 80
<b>His-strep-904</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**D mit Zugabe von ATP & DNA**

	MCM	PCNA 1	PCNA 2	PCNA 3	PCNA -K	PoIB1	RPA	ORF 56	ORF 80
<b>His-strep-904</b>	-	++	-	-	-	-	-	-	++

**3.3.2.2.3. Interaktion der ORF904-Deletionsmutanten**

Im C-terminalen Bereich von ORF904 lassen sich eine konservierte ATPase-Domäne und eine Helikase-Domäne der Superfamilie 3 nachweisen (siehe Abbildung 3-39). Diese Helikasen kommen hauptsächlich in einer Anzahl kleiner RNA- und DNA-Viren vor (Gorbalenya *et al.*, 1990) und das am besten untersuchte Mitglied dieser Superfamilie ist SV40 T-Ag (*simian virus 40 tumor antigen*). Diese Helikase formt ATP-abhängig ein Doppelhexamer um die DNA (Mastrangelo *et al.*, 1989). Es wird angenommen, dass ORF904 auch als Hexamer funktioniert (Sanchez & Lipps unveröff.). Dabei ist bis jetzt nicht geklärt, welcher Teil des Proteins diese Multimerisierung vermittelt. Die plattenbasierten Interaktionsassays waren geeignet, die Interaktion der Deletionsmutanten untereinander zu untersuchen um diese Frage zu beantworten. Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die selben Deletionsmutanten eingesetzt wie im vorherigen Experiment (Abbildung 3-39, Tabelle 3-3). Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden eine Reihe von Deletionsmutanten erstellt, die den vorher verwendeten entsprachen, allerdings keinen strep-Tag besaßen (Tabelle 3-5). Diese wurden über den His-Tag mittels Affinitätschromatographie gereinigt und über einen Kationenaustauscher aufkonzentriert.

**Tabelle 3-5: Varianten von ORF904 für die Untersuchung der Interaktion. His und strep zeigen den Ort des 6xhis- bzw. strep-Tags an. N zeigt die erste Aminosäure der Deletionsmutante an, C die letzte.**

Protein	MW (kDa)
His-904	108,3
N40-C255-His	26,1
N40-C370-His	39,7
N40-C526-His	58,4
His-N256-C526	34,9
N527-His	45,6
N753	18,1

Zuerst wurde die Interaktion von His-strep-904 mit dem entsprechenden Volllängenprotein His-904 getestet. Dabei war keine Interaktion zu beobachten (Tabelle 3-6A). Daraufhin wurden erneut 1 mM ATP, 1  $\mu$ M Desoxynukleotid (int\_1) bzw. beides zugegeben (Tabelle 3-6B-D). Dabei kam es analog zum vorherigen Experiment nur bei Zugabe von ATP und DNA zu einer Interaktion der beiden Proteine. Wenn nur entweder ATP oder DNA zugegeben worden, konnte keine Interaktion detektiert werden.

Danach wurden erneut die Deletionsmutanten N40-C370 und N40-C526 getestet. Mit N40-C370 kam es wieder mit keinem der Proteine zu einer Interaktion, während mit N40-C526 eine Interaktion mit dem Volllängenprotein und mit N40-C526 nachweisbar war. Auffällig daran war, dass mit N40-C526 als gebundenes, erstes Protein und strep-His-904 als zweites keine Interaktion nachweisbar war, im umgekehrten Fall aber schon. Das ungleiche Verhalten von N40-C370 und N40-C526 zeigte, dass auch in diesem Fall die Aminosäuren 371 bis 526 vermutlich die Interaktion vermittelten. Dies wurde wieder genauer mit den Deletionsmutanten N256-C526 und den beiden Teilen N256-C370 und N371-C526 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuren 256 bis 370 nicht in der Lage waren mit den Proteinen zu interagieren. Die Deletionsmutanten N256-C526 war in der Lage mit dem Volllängenprotein zu interagieren. Dagegen interagierte N371-C526 sowohl mit dem Volllängenprotein, als auch mit N40-C526 und N256-C526 und zusätzlich trat auch zu N40-C370 und N753 eine Bindung auf. Die Interaktion mit den ersteren drei Proteinen war erwartet, da sie die an der Interaktion vermutlich beteiligten Aminosäuren 371 bis 526 enthalten, dagegen wurde mit den letzteren beiden Proteinen keine Reaktion erwartet.

Als nächstes wurden Deletionsmutanten untersucht, welche den C-terminalen Bereich von ORF904 umfassten. Dabei zeigte N371, welche die Aminosäuren 371 bis 904 enthielt, dasselbe Verhalten wie das Volllängenprotein. Ohne ATP oder DNA kam es nicht zur Interaktion mit His-904 oder einem anderen Protein, während die Zugabe von ATP und DNA die Bindung an das Volllängenprotein ermöglichte. Die Verwendung von N527, welches mit keinem Protein reagierte, verdeutlichte auch die vermutete Wichtigkeit der Aminosäuren 371 bis 526.

Überdies wurde mit den Proteinen N735 und N753-C845, welche die vermutete *winged helix* Domäne bzw. den C-Terminus von ORF904 umfassen, keine Interaktion mit einem anderen Protein festgestellt.

**Tabelle 3-6: Interaktion von ORF904-Deletionsmutanten. – bedeutet keine Interaktion ( $OD_{405} < 1,0$ ) ++ bedeutet Interaktion ( $OD_{405} > 1,0$ ). (A) Interaktionen wurden ohne Zugabe von DNA oder ATP gemessen (B) Interaktionen mit Zugabe von 1 mM ATP (C) Interaktionen mit Zugabe von 1  $\mu$ M DNA (int\_1) (D) Interaktionen mit Zugabe von 1 mM ATP und 1  $\mu$ M DNA int\_1.**

**A**

	His-904	N40-C255-His	N40-C370-His	N40-C526-His	His-N256-C526	N527-His	N753
<b>His-strep-904</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>strep-N40-C370-His</b>	-		-	-			
<b>strep-N40-C526-His</b>	++		-	++			-
<b>His-N256-c526-strep</b>	++		-		-		
<b>His-N256-c370-strep</b>	-	-	-	-	-		-
<b>His-N371-C526-strep</b>	++	-	++	++	++		++
<b>His-strep-N371</b>	-	-	-	-	-		
<b>His-strep-N527</b>	-					-	
<b>N753-strep-His</b>	-	-	-	-	-		-
<b>N753-C845-strep-His</b>	-						

**B mit Zugabe von 1 mM ATP**

	His-904	N40-C255-His	N40-C370-His	N40-C526-His	His-N256-C526	N527-His	N753
His-strep-904	-	-	-	-		-	
strep-N40-C370-His			-				
strep-N40-C526-His				++			
His-N256-c526-strep							
His-N256-c370-strep							
His-N371-C526-strep							
His-strep-N371	-						
His-strep-N527	-						
N753-strep-His	-						
N753-C845-strep-His							

**C mit Zugabe von 1 µM Oligodesoxynukleotid int\_1**

	His-904	N40-C255-His	N40-C370-His	N40-C526-His	His-N256-C526	N527-His	N753
His-strep-904	-	-	-	-		-	
strep-N40-C370-His			-				
strep-N40-C526-His				++			
His-N256-c526-strep							
His-N256-c370-strep							
His-N371-C526-strep							
His-strep-N371	-						
His-strep-N527	-						
N753-strep-His	-						
N753-C845-strep-His							

**D mit Zugabe von ATP und Oligodesoxynukleotid**

	His-904	N40-C255-His	N40-C370-His	N40-C526-His	His-N256-C526	N527-His	N753
<b>His-strep-904</b>	<b>++</b>	-			<b>++</b>	-	-
<b>strep-N40-C370-His</b>			-				
<b>strep-N40-C526-His</b>				<b>++</b>			
<b>His-N256-c526-strep</b>							
<b>His-N256-c370-strep</b>							
<b>His-N371-C526-strep</b>							
<b>His-strep-N371</b>	<b>++</b>						
<b>His-strep-N527</b>	-						
<b>N753-strep-His</b>	-						
<b>N753-C845-strep-His</b>							

**3.3.2.2.4. Fazit der Interaktionsassays**

Mit den plattenbasierten Interaktionsassays konnte gezeigt werden, dass das Vollängenprotein ORF904 mit PCNA1 und ORF80 interagiert, wenn ATP und DNA (37 nt Desoxynukleotid int\_1) vorhanden sind. Möglicherweise kommt es durch die Bindung von DNA und ATP zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche dann die Interaktion mit ORF904 und PCNA1 erlaubt. Die Untersuchung der Deletionsmutanten ergab, dass die Deletionsmutante N371-C526 in der Lage ist, ebenfalls mit den genannten Proteinen zu interagieren (zusätzlich interagiert dieses Protein noch mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA). Dadurch und durch die Untersuchung anderer Deletionsmutanten konnte abgeleitet werden, dass die Aminosäuren 371 bis 526 eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Interaktion zu spielen scheinen. Diese Aminosäuren umfassen den N-terminalen Anteil der ATP-/Helikase-Domäne.

Die Untersuchung der Interaktion der ORF904-Deletionsmutanten untereinander führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Hier war ORF904 ebenfalls bei Vorhandensein von ATP und DNA in der Lage mit sich selbst zu interagieren. Dies zeigt, dass ORF904 in der Lage ist, Multimere zu bilden. Die Untersuchung der Deletionsmutanten zeigte wieder die Bedeutung der AS 371-526 für diese Interaktion. Es ist unklar, ob beide Prozesse, die Interaktion mit anderen Proteinen und die Kontakte im vermuteten ORF904-Hexamer mit den selben Aminosäuren vermittelt werden können oder ob N371-C526 fälschlich bindet. Die Interaktion z.B. mit einem Großteil der Deletionsmutanten, auch denen die nicht diesen Bereich des Proteins enthielten, spricht dafür, dass dieses Protein eventuell

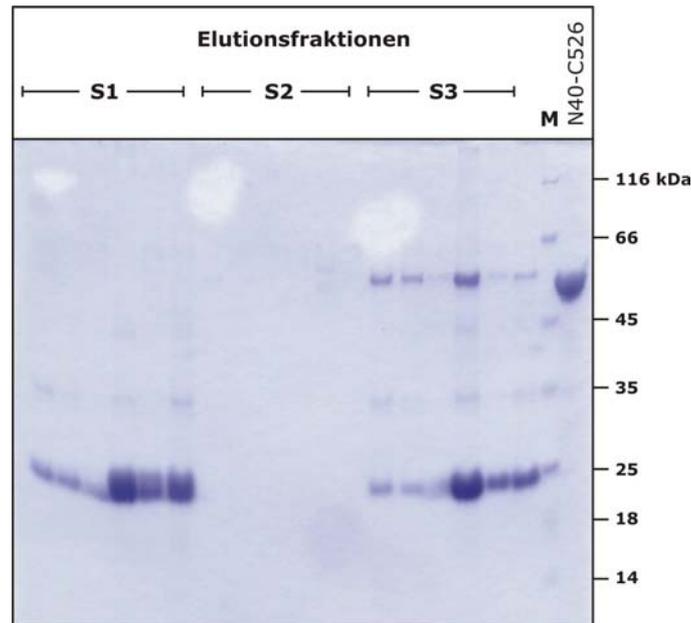
teilweise unspezifisch an andere Proteine band. Andererseits zeigten die Untersuchungen der anderen Deletionsmutanten, wie N40-C370 und N40-C526, auch die Wichtigkeit dieses Bereiches auf.

### **3.3.2.2.5. Verifizierung der Interaktion durch *pull-down* Assays**

Nachdem die Interaktionen von ORF904 mit ORF80 und PCNA1, sowie die der einzelnen Deletionsmutanten untereinander, mit Hilfe der plattenbasierten Interaktionsassays identifiziert werden konnten, wurde versucht diese mit *pull-down* Assays zu verifizieren. Dabei wurden ORF904 oder eine Deletionsmutante, welche einen strep-Tag besaß, mit dem zu testenden Protein inkubiert. Danach wurde das getaggte Protein an eine StrepTactin-Säule gebunden und wenn es mit dem anderen Protein interagiert, würde dieses ebenfalls gebunden werden. Danach wurde mehrfach gewaschen und es erfolgten mehrere Elutionen, zuerst mit steigender NaCl-Konzentration um die Interaktion zu lösen und dann mit Desthiobiotin um die Affinitätsbindung des strep-Tags aufzuheben. Zur Kontrolle wurden beide Proteine parallel einzeln auf StrepTactin-Säulen aufgetragen. Die Elutionsfraktionen wurden dann auf einem Proteingel analysiert.

Zuerst wurde versucht die Interaktion zwischen ORF904 und PCNA1 oder ORF80 mit diesem Assay zu überprüfen. Dabei wurden die Proteine mit DNA und ATP inkubiert, da dies sich in den plattenbasierten Assays als notwendig erwiesen hatte. Es konnte keine Bindung der beiden Proteine an ORF904 beobachtet werden, es zeigte sich allerdings, dass ORF80 für diesen Versuch ungeeignet war, da dieses Protein sehr unlöslich war und stark zur Aggregation neigte, band es stark unspezifisch an die Säulenmatrix. Mit PCNA1 konnte keine Interaktion beobachtet werden, da möglicherweise die gebundene DNA oder das ATP während der Waschschriffe entfernt worden war, wurde dieser Versuch noch mal wiederholt, indem 1 mM ATP und 1  $\mu$ M DNA (int\_1) dem Waschpuffer zugegeben wurden. Damit fand auch keine Interaktion statt. Für weitere Versuche wurde His-N371-C526-strep mit PCNA1 inkubiert, aber auch hier konnte in den Elutionsfraktionen kein PCNA1 nachgewiesen werden.

Als nächstes wurde versucht, mit *pull-down* Assays die beobachtete Interaktion der ORF904-Deletionsmutanten untereinander nachzuweisen. Dafür wurde His-N371-C526-strep mit N40-C370, N40-C526 und ORF904 inkubiert. Mit dem Volllängenprotein kam es ebenfalls zu einer starken unspezifischen Bindung an die Säulenmatrix, so dass dieser Versuch nicht ausgewertet werden konnte. Mit der Deletionsmutante N40-C370 konnte erwartungsgemäß keine Interaktion beobachtet werden, da sie nicht die vermutlich daran beteiligten Aminosäuren enthält. Dagegen wurde die Deletionsmutante N40-C526 durch die Interaktion mit N371-C526 spezifisch an die Säule gebunden (Abbildung 3-41).



**Abbildung 3-41: Pull-down Assay mit His-N371-C526-strep und N40-C526-His. Die Elutionsfraktionen der Säulen 1 bis 3 wurden auf ein Proteingel aufgetragen. S1: His-N371-C526-strep, S2: N40-C526-His, S3: His-N371-C526-strep+N40-C526-His. Elutionen waren I-PBS+500 mM NaCl, II und III-PBS+1 M NaCl, IV und V-PBS+2,5 mM Desthiobiotin, VI-PBS+0,5 %SDS. Außerdem wurden 10 µg N40-C526-His aufgetragen.**

Dies untermauerte die Ergebnisse des plattenbasierten Interaktionsassays, dass die Interaktion der ORF904-Untereinheiten untereinander in einem möglichen Hexamer an den Aminosäure 371 bis 526 interagieren.

Dagegen war es nicht möglich, die Interaktion mit den beiden anderen Proteinen, PCNA1 und ORF80, mit diesem *pull-down* Assay zu bestätigen. Ein Grund dafür könnte sein, dass mit einem *pull-down* Assay transiente Interaktionen nur schlecht erfasst werden können. Um diese beobachteten Interaktionen zu verifizieren, müssten also zusätzlich andere Untersuchungen durchgeführt werden.

## 4. Zusammenfassende Diskussion

### 4.1. Charakterisierung der Aktivität der Prim/Pol-Domäne von ORF904

#### 4.1.1. Primaseaktivität

##### 4.1.1.1. ORF904 ist sequenzspezifisch

In dieser Arbeit wurde die Primaseaktivität von ORF904 genauer untersucht. Primasen sind Enzyme, welche in der Lage sind, einen Nukleotidprimer auf einzelsträngiger DNA *de novo* zu synthetisieren. Diese Enzyme sind essentiell für die Replikation der DNA in den meisten untersuchten Systemen. ORF904 gehört zur Superfamilie der archaeo-eukaryotischen Primasen. Die Mitglieder dieser Superfamilie unterscheiden sich in Struktur und Sequenz von den Primasen aus Bakterien und Bakteriophagen. Beide Superfamilien haben keinen gemeinsamen evolutionären Ursprung, die Proteine katalysieren aber vergleichbare Reaktionen.

Für eine Reihe von Primasen konnte eine DNA-Sequenzabhängigkeit der Primersynthese gefunden werden. Bakterielle Primasen haben im Großteil der bis jetzt untersuchten Fälle eine Trinukleotid-Erkennungssequenz, an welcher die Synthese des Primers initiiert wird. Für verschiedene eukaryotische Primasen konnten ähnliche Tripletts identifiziert werden, allerdings sind die Anforderungen dieser Proteine an die Sequenzen weniger spezifisch als bei den bakteriellen Primasen. Für ORF904 konnte ein kurzes einzelsträngiges DNA-Substrat identifiziert werden, welches zu einem Primer führte, der mit dem vorher auf einzelsträngiger Plasmid-DNA beobachteten Primer übereinstimmte. Dieses kurze, definierte Substrat wurde als Ausgangspunkt genutzt, um das minimale Template für die Primaseaktivität und die Sequenzabhängigkeit von ORF904 zu ermitteln. Für die Synthese des Vollängenprimers ist die Sequenz 5'-N<sub>8</sub>GTGN-3' notwendig, allerdings genügt bereits 5'-N<sub>2</sub>GTGN-3' für die effiziente Synthese eines Dinukleotids. Als Erkennungssequenz für die Primersynthese durch ORF904 wurde das Trinukleotid GTG ermittelt. Es zeigte sich, dass Veränderungen dieser Erkennungssequenz die Synthese eines Vollängenprimers verhindern, das Enzym also *in vitro* sehr spezifisch ist. Die gefundene Erkennungssequenz ist verschieden von allen anderen bisher beobachteten Erkennungssequenzen. Eine Übereinstimmung aller bisher identifizierter Erkennungssequenzen ist allerdings, dass das zentrale Nukleotid ein Pyrimidin ist (Frick & Richardson, 2001), dies ist auch bei ORF904 der Fall. Die Tatsache, dass ein sechs Nukleotide langes Substrat ausreichend ist, zeigt, dass die Primase im Kontext der kurzen einzelsträngigen Template vermutlich nur mit wenigen Nukleotiden spezifisch interagiert. Es zeigte sich allerdings auch, dass am 3' Ende der Erkennungssequenz ein

zusätzliches beliebiges Nukleotid notwendig ist für eine effektive Primersynthese. Hier findet möglicherweise ebenfalls eine Interaktion des Proteins mit der DNA statt. Für andere Primasen, wie zum Beispiel die des Phagen T7, wurde vergleichbares beobachtet. Dieses Enzym ist ebenfalls in der Lage mit einem sechs Nukleotide langen Templat einen Primer zu synthetisieren, und nur das Vorhandensein eines zusätzlichen Nukleotids 3' der Erkennungssequenz ermöglicht eine effiziente Primersynthese, vermutlich auf Grund einer Stabilisierung der DNA-Bindung durch das Protein (Frick & Richardson, 1999).

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass ORF904 den Primer am ersten Nukleotid 5' des Erkennungstripletts initiiert. Dies ist eine Besonderheit. Alle bisher untersuchten prokaryotischen Primasen, welche eine vergleichbare Erkennungssequenz nutzen, initiieren den Primer am zentralen Nukleotid der Erkennungssequenz. Eukaryotische Primasen starten die Primersynthese dagegen in einiger Entfernung in 5' Richtung von der Erkennungssequenz. Bisher ist nur eine weitere Primase eines hyperthermophilen Organismus, die von *Aquifex aeolicus*, genauer untersucht wurden. Hierbei wurden die Erkennungssequenzen CCC und mit einer geringeren Effizienz GCC identifiziert (Larson *et al.*, 2008). Es wird spekuliert, dass die bei der Primerinitiation entstehenden G-C-Paare den ternären Enzym-Templat-Nukleotid-Komplex bei höheren Temperaturen stabilisieren. Dieser Effekt könnte bei ORF904 dagegen auf Grund der Primerinitiation auf undefinierten Nukleotiden außerhalb der Erkennungssequenz nicht zum Tragen kommen.

#### **4.1.1.2. Der Primer enthält Ribo- und Desoxynukleotide**

Mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ -markiertem ATP wurde die Zusammensetzung des von ORF904 auf einem Templat mit der Erkennungssequenz synthetisierten Primers untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass ein Primer aus einem initialen Ribonukleotid (bevorzugt ATP) besteht und mit 7 Desoxynukleotiden verlängert wird. Diese gemischte Zusammensetzung des Primers ist sehr spezifisch, in den durchgeführten Experimenten wurde bisher nie die Verknüpfung von zwei Ribonukleotiden oder die Formierung eines Primers ausschließlich aus Desoxynukleotiden beobachtet. Eine derartige Synthese eines gemischten Primers wurde bisher in anderen Systemen nicht beobachtet. Im allgemeinen synthetisieren Primasen reine RNA-Primer, für archaeale Primasen wurde *in vitro* auch die Synthese von DNA-Primern beobachtet (Lao-Sirieix & Bell, 2004; Bocquier *et al.*, 2001). Allerdings wurde bei der Primase von *E. coli* beobachtet, dass sie ebenfalls in der Lage ist Desoxy- und sogar Didesoxynukleotide in einen Primer einzubauen (Swart & Griep, 1993; Rowen & Kornberg, 1978). Der Einbau der Desoxynukleotide durch dieses Enzym ist allerdings wesentlich langsamer als der Einbau von Ribonukleotiden, was dafür spricht, dass diese Reaktion vermutlich *in vivo* keine große Relevanz hat.

Wie ORF904 in der Lage ist, zwischen Ribo- und Desoxynukleotiden zu diskriminieren, ist unklar. Auf dem Modell von Frick *et al.* (Frick *et al.*, 1999; Frick & Richardson, 2001) basierend, geht man davon aus, dass Primasen über zwei Nukleotidbindungsstellen

verfügen, eine für das initiierende Nukleotid und eine weitere für die Elongation des Primers. Während der Elongation wird dann das soeben eingebaute Nukleotid in die Initiationsstelle geschoben. Davon ausgehend verfügt ORF904 möglicherweise auch über zwei Bindungsstellen für die Nukleotide. Die zweite Stelle könnte dabei ausschließlich Desoxynukleotide akzeptieren, denkbar wäre ein sterisches Hindernis, welches die Bindung von Nukleotiden mit einer 2' OH-Gruppe inhibiert. Dies wird zum Beispiel bei einer reversen Transkriptase (MMLV) durch eine Phenylalaninseitenkette erreicht (Gao *et al.*, 1997). Dagegen ist die ausschließliche Akzeptanz von Ribonukleotiden an der ersten Stelle schwerer zu erklären, da dies nicht durch die räumliche Gestaltung des aktiven Zentrums erreicht werden kann (Joyce, 1997). Wie durch Mutationsstudien mit der T7 RNA-Polymerase gezeigt werden konnte, findet wahrscheinlich eine spezifische Wechselwirkung mit dem Nukleotid statt (Sousa & Padilla, 1995).

Es wurden außerdem auch für ORF904 eine Reihe von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga daraufhin untersucht, ob sie als initiierendes Nukleotid dienen könnten. Dabei zeigte sich, dass AMPPcP und AMPPnP zur Primersynthese genutzt werden können, während das für AMPcPP und  $\gamma$ -S-ATP nicht galt. Dies zeigt, dass ORF904 zusätzliche Ansprüche an den Phosphatanteil des ersten Nukleotids stellt, möglicherweise gibt es auch hier räumliche Anforderungen an das Nukleotid. Bei anderen Primasen wurde ebenfalls beobachtet, dass sie in der Lage sind, an der ersten Position des Primers eine Reihe sehr diverser Ribonukleotide zu inkorporieren. So konnte die Primase des Phagen T7 den Primer in einer Studie mit allen getesteten ATP-Analoga zu beginnen, diese werden auch ausschließlich an der 5' Position des Primers eingebaut (Frick *et al.*, 1999). Es ist denkbar, dass der von ORF904 synthetisierte Primer *in vivo* anders zusammengesetzt ist und die Ergebnisse auf Einflüsse des Versuchsaufbaus zurückzuführen sind. Es wird vermutet, dass es sich bei der beobachteten Fähigkeit anderer archaealer Primasen, *in vitro* DNA-Primer zu synthetisieren, nicht um deren natürliche Aktivität handelt (Lao-Sirieix & Bell, 2004; Lao-Sirieix *et al.*, 2005b). Bei der Primase aus *Pyrococcus furiosus* führt die Zugabe der zweiten Primase-Untereinheit zur katalytischen Untereinheit zu einer Verschiebung der gebildeten Primer von DNA zu RNA (Liu *et al.*, 2001b). Außerdem wurde gezeigt, dass die archaealen Okazaki-Fragmente ebenfalls über ein 5' Ende aus Ribonukleotiden verfügen (Matsunaga *et al.*, 2003).

#### **4.1.1.3. Die Primersynthese ist ungewöhnlich genau**

Als nächstes wurde untersucht, wie groß die Fehlerrate von ORF904 während der Primersynthese ist. Zuerst wurde die Inkorporation des ersten Nukleotids des Primers untersucht. Es zeigte sich, dass ORF904 bei der Auswahl des Ribonukleotids relativ ungenau ist. Es wurden Substrate mit allen vier Basen an der entsprechenden ersten Position des Primers getestet und ATP wird als erstes Nukleotid gegenüber jeder Templatbase inkorporiert. Bei Verwendung der anderen Ribonukleotide spielt die korrekte

Basenpaarung dagegen eine größere Rolle, sie werden bevorzugt gegenüber ihrer komplementären Base eingebaut. Es kommt mit diesen aber auch zur Entstehung einer geringen Menge an Primern, die auf einen nicht dem Templat entsprechenden Einbau des Ribonukleotids zurückzuführen sind.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in weiteren Experimenten, dass die folgenden Desoxynukleotide im Primer mit einer hohen Genauigkeit selektiert werden. Für die Positionen 2 bis 4 des Primers konnte mit den Primaseaktivitätsassays keine Inkorporation eines fehlerhaften Nukleotids beobachtet werden, selbst wenn keine anderen Nukleotide vorhanden waren. Vermutlich ist der Desoxynukleotidanteil des durch ORF904 synthetisierten Primers relativ fehlerfrei und komplementär zum Templat. Diese hohe Genauigkeit ist relativ ungewöhnlich für eine Primase, denn diese Enzyme zeichnen sich allgemein durch eine geringe Selektivität während der Primersynthese bezüglich der korrekten Nukleotidbase aus. So wurden Misinkorporationsraten bis 1 in 7 Nukleotide für die Herpes simplex Primase bestimmt (Ramirez-Aguilar & Kuchta, 2004). Ebenso baut die Primase aus Kalbsthymus nichtkomplementäre Nukleotide mit einer Frequenz von 1 in 30 ein, allerdings ausschließlich in der Elongationsphase, das initiiierende Dinukleotid wird mit größerer Genauigkeit synthetisiert. Außerdem kann dieses Enzym mehrere unpassende Nukleotide hintereinander inkorporieren (Sheaff & Kuchta, 1994).

Diese Zahlen zeigen, dass Primasen im allgemeinen die bei weitem ungenauesten Nukleotid-Polymerasen sind. Möglicherweise ist ein Grund, dass ein sehr kurzer Primer-Templat-Komplex relativ instabil ist. Etwas ähnliches lässt sich bei der RNA-Polymerase aus *E. coli* beobachten, einem mit Primasen vergleichbaren Enzym, welches sich über die ganze Synthese durch eine wesentlich höhere Genauigkeit auszeichnet (Springgate & Loeb, 1975). Es kommt bei diesem Enzym während der Initiation der Transkription bei den ersten Nukleotiden auch zu einem wesentlich höheren Fehleinbau von Nukleotiden (Metzger *et al.*, 1993).

Es gibt aber vermutlich bei Primasen auch keinen Grund auf eine hohe Genauigkeit zu selektieren. Primer werden während der Replikation sukzessive durch DNA-Polymerase I (Bakterien) oder eine Nuklease (Eukaryoten, Archaea) entfernt und durch genauer synthetisierte DNA ersetzt (Kornberg & Baker, 1992; Li *et al.*, 1995; Dionne *et al.*, 2003b). Mögliche Fehler der Primase haben also keine Auswirkungen auf die Sequenz der DNA.

Im Gegensatz dazu bestehen die von ORF904 synthetisierten Primer wie beschrieben, bis auf ein initiiierendes Ribonukleotid, aus sieben Desoxynukleotiden und sind demnach nach der Replikation vermutlich nicht mehr als Primer zu identifizieren und entfernen. Möglicherweise ist das der Grund, weshalb ORF904 eine vergleichsweise hohe Selektivität beim Einbau der Desoxynukleotide besitzt, während die Auswahl des initiiierenden Ribonukleotids keine Auswirkungen auf die neu synthetisierte DNA hat und deswegen flexibler gewählt werden kann.

#### 4.1.1.4. Nichtkomplementäre Primer könnten durch „Verrutschen“ entstehen

Zusätzlich wurde herausgefunden, dass ORF904 fehlerhafte Primern synthetisieren kann, indem das Enzym mit dem Primer auf dem Templat entlang „rutscht“. Dies passiert bevorzugt, wenn der synthetisierte Primer noch sehr kurz ist und das Enzym durch das Fehlen eines komplementären Nukleotids zum Abbruch der Primersynthese gezwungen wird. ORF904 konnte normale Mengen an Primer bilden, wenn an der zweiten Position des Primers ein Nukleotid notwendig war, welches in der Reaktion nicht enthalten war. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist, dass das Enzym in der Lage ist seinen Startpunkt in diesem geringen Rahmen frei zu wählen und die Primersynthese am zweiten Nukleotid 5' der Erkennungssequenz zu starten. Dafür spricht auch, dass der beobachtete Primer ein Nukleotid kürzer ist, als zu erwarten wäre. Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass ORF904 das zweite Nukleotid des Primers zuerst bindet, wie es für die Kalbsthymus-Primase beobachtet wurde (Sheaff & Kuchta, 1993). In diesem Fall würde ORF904 nach dem Erkennen des GTG das zweite Nukleotid binden und dann mit diesem auf der DNA entlang rutschen, bis die komplementäre Base erreicht ist. Es ist ebenso denkbar, dass das erste Nukleotid zuerst gebunden wird und sich ORF904 mit diesem auf der DNA entlang bewegt, nachdem die Verknüpfung einer komplementären Base an der zweiten Position nicht durchgeführt werden kann.

Wenn in Versuchen allerdings das dritte Nukleotid 5' der Erkennungssequenz ein nicht vorhandenes komplementäres Nukleotid verlangte, kam es nur zu einer geringen Synthese von Vollängenprimer und verkürzte Primer wurden nicht beobachtet. Dies zeigt, dass eine Initiation der Synthese drei Nukleotide von der Erkennungssequenz entfernt nicht mehr möglich ist. Es werden dagegen größere Mengen Dinukleotide synthetisiert, da die Synthese wegen des fehlenden Nukleotids darüber hinaus nicht fortgesetzt werden kann. Bei einem kleinen Teil der Dinukleotide findet jedoch eine Verlängerung statt, was ebenfalls zu einem noch geringeren Anteil bei den Experimenten zur Genauigkeit von ORF904, bei denen ein Desoxynukleotid fehlte, beobachtet wurde. Vermutlich lässt sich das ebenfalls auf ein Rutschen des Enzym mit dem Primer auf dem Templat entlang erklären. Dieses Rutschen wird durch ein einheitliches Templat begünstigt und sollte eigentlich zu einem Primer führen, der ein Nukleotid kürzer ist, als ein entsprechender Vollängenprimer. Auf Grund der relativ geringen Produktmengen konnte die Länge der Primaseprodukte aber nicht eindeutig bestimmt werden.

Primer, welche durch das Rutschen des Enzyms über ein nichtkomplementäres Nukleotid hinweg entstanden sind, könnten *in vivo* zu fehlerhaft eingebauten Nukleotiden in der DNA führen. Diese müssten dann im Anschluss an die Replikation entfernt und durch ersetzt werden. Andererseits könnte es auch sein, dass während der Replikation Bedingungen herrschen, die das Rutschen von ORF904 einschränken.

#### 4.1.1.5. Kinetik der Primasereaktion

Es wird angenommen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Primersynthese vor oder während der Bildung des ersten Dinukleotids stattfindet. Deshalb wurden mit ORF904 kinetische Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Geschwindigkeit des Nukleotideinbaus in das initiiierende Dinukleotid und in den gesamten Primer verglichen wurde. Dabei zeigte sich, dass für die Synthese des Dinukleotids dATP mit der gleichen Geschwindigkeit eingebaut wird wie im gesamten Primer ( $\approx 9$  nt/min). Die Einbaurate zeigt, dass ein Enzymmolekül *in vitro* rund neun Dinukleotide pro Minute synthetisiert oder einen Primer. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt findet also vor der Dinukleotidsynthese statt. Eine vergleichsweise niedrige Aktivität ist typisch für Primasen, die Primase DnaG aus *E. coli* synthetisiert beispielweise 0,74 Primer/min (Johnson *et al.*, 2000). Dieser Wert wurde allerdings nur erreicht, wenn die Primase durch die mit ihr *in vivo* assoziierte Helikase DnaB stimuliert wurde. Die Erhöhung der Aktivität ist in diesem Fall auf eine Erhöhung der Affinität der Primase für das einzelsträngige Templat zurückzuführen, die Dissoziationskonstante sinkt mit DnaB von 720 nM auf 2 nM (Johnson *et al.*, 2000; Swart & Griep, 1995a). Die kinetischen Experimente mit ORF904 wurden mit dem Volllängenprotein durchgeführt, welches die Helikasedomäne beinhaltet. Damit wurde mit einer Michaelis-Menten Konstante von  $\approx 200$  nM eine geringere Affinität für das eingesetzte Templat festgestellt, die Bindung der DNA ist also weniger stark als die der etwa gleich aktiven *E. coli* Primase in Verbindung mit DnaB.

In einer Affinitätsmessung mittels Fluoreszenzanisotropie wurde eine ORF904-Deletionsmutante eingesetzt, welche die Aminosäuren 40 bis 370 beinhaltet. Dabei wurde eine vergleichbar hohe Aktivität für das DNA-Substrat mit Erkennungssequenz gemessen, die Dissoziationskonstante betrug  $\approx 225$  nM. Dies zeigt, dass die Bindung des Enzyms an die DNA durch die Helikasedomäne in diesen Experimenten mit kurzen einzelsträngigen Templaten nicht erhöht wird. Die Bindung der DNA erfolgt durch die Primasedomäne, außerdem fiel in den Experimenten eine etwas niedrigere Affinität für ein Substrat ohne Erkennungssequenz auf ( $\approx 1200$  nM).

Generell sind Primasen damit sehr langsame Nukleotid-Polymerasen. Im Gegensatz dazu inkorporiert zum Beispiel die DNA-Polymerase I aus *E. coli* bis zu 50 nt/s (Kuchta *et al.*, 1987), das replikative Holoenzym Polymerase III sogar bis zu 1000 nt/s (Kornberg & Baker, 1992), die Affinität der DNA-Polymerase I für DNA ist mit einer Dissoziationskonstante von  $\approx 5$  nM höher als die von ORF904. Interessant ist also, dass die Primasen sehr viel langsamer sind, als andere an der Replikation beteiligte Polymerasen. Möglicherweise ist die Primaseaktivität allerdings *in vivo* zusätzlich reguliert und erreicht damit höhere Werte.

#### 4.1.1.6. Die minimale Primasedomäne umfasst die ersten 370 Aminosäuren

Da ORF904 sich aus zwei funktionellen Domänen, der N-terminalen Primasedomäne (Prim/Pol-Domäne) und einer C-terminalen Helikasedomäne, zusammensetzt, wurde mit Deletionsmutanten die Beteiligung der einzelnen Domänen an der Synthese des Primers untersucht. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass die Prim/Pol-Domäne allein (Aminosäuren 1 –255) nicht in der Lage ist einen Primer zu synthetisieren (Lipps *et al.*, 2004). Eine Primersynthese war erst mit der Deletionsmutante möglich, welche die ersten 370 Aminosäuren umfasste. Allerdings war dieses Protein nicht in der Lage, diesen Primer zu verlängern. Dazu waren mindestens die ersten 526 Aminosäuren notwendig. Dieses Protein enthält zwar keinen Anteil der Helikasedomäne, zeigt aber eine dem Wildtyp vergleichbare Primaseaktivität und ist damit in der Lage den Primer zu synthetisieren und bis zum Ende des Templates zu verlängern. Die Aminosäuren 370 bis 526 sind also wichtig für die Verlängerung des Primers, vermutlich sind sie an der Bindung der DNA beteiligt.

Kürzlich wurde eine Charakterisierung der Primaseaktivität des Replikationsprotein A des Plasmids pIT3 veröffentlicht. Dieses archaeale Plasmid ist ähnlich wie pRN1 aufgebaut, das Replikationsprotein umfasst ebenfalls eine Primase- und eine Helikasedomäne (Prato *et al.*, 2006; Prato *et al.*, 2008). Dieses Replikationsprotein hat eine niedrige Sequenzübereinstimmung mit dem homologen ORF904, allerdings sind die Aminosäuren, die bei ORF904 das aktive Zentrum bilden, konserviert. *Homology modeling* der Sequenz mit der bekannten Struktur der ersten 255 Aminosäuren von ORF904 ergab große Übereinstimmungen zwischen beiden Proteinen. Davon ausgehend wurde eine Deletionsmutante erstellt, welche die ersten 245 Aminosäuren des Replikationsproteins umfasst, was den ersten 255 Aminosäuren von ORF904 entspricht. Diese Deletionsmutante ist im Gegensatz zu ORF904 in der Lage, einen Primer zu synthetisieren. Allerdings wird dieser Primer nur zu einem geringen Teil verlängert. Erst eine Deletionsmutante, welche die Aminosäuren 1 – 516 umfasste (und ebenfalls keinen Teil der Helikasedomäne enthielt), war in der Lage diesen Primer effizient zu verlängern (Prato *et al.*, 2008). Dieses Protein unterscheidet sich also von ORF904 dahingehend, dass die Prim/Pol-Domäne allein in der Lage ist, einen Primer zu synthetisieren, dagegen ist bei beiden Proteinen ein weiterer Teil des Proteins notwendig, um diesen Primer zu verlängern. Die Region, welche in beiden Proteinen an der Verlängerung der Primer beteiligt ist, hat keine Sequenzähnlichkeit zueinander oder zu anderen Proteinen außerhalb der archaealen Plasmide.

#### **4.1.2. ORF904 besitzt zusätzlich eine terminale Transferaseaktivität**

Ein weiteres interessantes Ergebnis war, dass ORF904 ein terminale Transferase ist, also Nukleotide templatunabhängig an das 3' Ende einer einzelsträngigen DNA hängen kann. Für die Reaktion ist kein ATP erforderlich und es werden nur Desoxynukleotide verwendet. Außerdem zeigte sich, dass für die Reaktion ebenfalls die ersten 526 Aminosäuren notwendig sind, die kleinere Deletionsmutante, welche die Aminosäuren 1 – 370 umfasst, ist nicht in der Lage die Transferasereaktion dem Vollängenprotein vergleichbar zu katalysieren. Diese terminale Transferaseaktivität wurde bei einer Reihe archaealer Primasen beobachtet, zum Beispiel bei der zellulären Primase aus *Sulfolobus solfataricus* (Kramer *et al.*, 1997). Das Replikationsprotein A des Plasmids pIT3 kann diese Reaktion auch durchführen (Prato *et al.*, 2008). Dabei verwendet die Primase aus *S. solfataricus* für die Reaktion Ribonukleotide, während das RepA von pIT3 sowohl Desoxy- als auch Ribonukleotide an DNA-Substrate synthetisieren kann. Im Gegensatz dazu konnte für ORF904 keine Verwendung von Ribonukleotiden beobachtet werden, was der Situation während der Primersynthese entspricht. Dies zeigt also erneut, dass das aktive Zentrum des Enzym vermutlich nicht in der Lage ist Ribonukleotide aufzunehmen (bis auf das initiierende Nukleotid des Primers). Im Gegensatz zu den anderen Enzymen scheint ORF904 außerdem eine definierte Menge Nukleotide an das Templat zu addieren, was vermuten lässt, dass es sich nicht unbedingt um eine Nebenreaktion handelt.

Es ist allerdings unklar, weshalb die archaealen Primasen diese zusätzliche Fähigkeit haben. Es besteht eine Ähnlichkeit auf Sequenz- und Strukturebene zwischen den eukaryotischen Primasen und Mitgliedern der Polymerasefamilie X (Kirk & Kuchta, 1999). Zu dieser Familie gehören eine Reihe von DNA-Polymerasen sowie die terminale Transferase TdT. Diese Enzyme können eine Reihe von DNA-verändernden Reaktionen katalysieren und zeigen außerdem Primaseaktivität (Ramadan *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass diese Protein in eine Reihe von DNA-Reparaturmechanismen involviert sind, außerdem modifizieren sie in höheren Eukaryoten die variablen Immunglobulingene und erhöhen so deren Vielfalt (Hubscher *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass die archaealen Primasen ebenfalls weitere Funktionen in der Zelle übernehmen.

Die Untersuchung der Aktivitäten von ORF904 ergab, dass dieses Protein eine sequenzspezifische Primaseaktivität, Polymeraseaktivität und terminale Transferaseaktivität besitzt. Es ist allerdings nicht klar, ob alle diese Aktivitäten in der Zelle vorhanden sind oder ob nur ein Teil davon genutzt wird.

## 4.2. Strukturelle Untersuchungen der Primaseaktivität

### 4.2.1. Bestimmung der Struktur der minimalen Primasedomäne

Um die Synthese des Primers genauer untersuchen zu können und die daran beteiligten Aminosäuren zu identifizieren, wurde versucht ORF904 mit einem DNA-Templat zu kristallisieren. Außerdem wäre die Struktur einer Primase mit gebundener DNA von allgemeinem Interesse, da eine solche bisher nicht verfügbar ist. Für diese Experimente wurden zwei Deletionsmutanten eingesetzt, welche Aminosäuren 40 – 370 bzw. 40 – 526 umfassten, da das vollständige Protein ORF904 nicht in notwendiger Reinheit und ausreichender Menge aufzureinigen ist. Die Deletionsmutanten begannen beide mit der Aminosäure 40, da die Aminosäuren davor sehr flexibel sind und die Kristallisation verhindern können (Lipps *et al.*, 2004). Die Deletionsmutante N40-C370 ist in der Lage sequenzspezifisch einen Primer zu synthetisieren und bindet die DNA mit ausreichender Affinität. Dieses Protein sollte also für eine Kokristallisation ausreichend sein und Informationen über die Erkennung der DNA-Sequenz und die Formierung des Primers liefern können. Die zudem eingesetzte Deletionsmutante N40-C526 ist zusätzlich in der Lage die Primer zu verlängern und enthält den gesamten uncharakterisierten Teil von ORF904 zwischen der Primase- und der Helikasedomäne, weshalb dieses Protein ebenfalls eingesetzt wurde. Es wurde versucht, die Proteine zusammen mit diversen kurzen Oligodesoxynukleotiden und zusätzlich mit Zugabe von ATP und Desoxynukleotiden zu kristallisieren. Dabei stellte sich heraus, dass N40-C370 sehr hoch löslich ist und vermutlich deshalb nur in einer kleinen Anzahl von Bedingungen kristallisierte. N40-C526 kristallisierte unter keiner der gestesteten Bedingungen, obwohl dieses Protein wesentlich unlöslicher war als N40-C370. Möglicherweise ist der zusätzliche Teil der langen Deletionsmutante sehr flexibel und verhindert damit eine erfolgreiche Kristallisation.

Es wurde versucht N40-C370 mit verschiedenen, kurzen einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden, welche die Erkennungssequenz GTG enthielten zu kristallisieren. Die DNA-Substrate waren zwischen 9 und 17 Nukleotide lang, die Position der Erkennungssequenz innerhalb des Moleküls wurde variiert, ebenso wie die Sequenz 3' und 5' des Erkennungstripletts. Außerdem wurden Hybride aus einem Templat und einem kurzen gebundenen Oligodesoxynukleotid, welches einen Primer simulieren sollte, eingesetzt. In den erhaltenen Kristallen von N40-C370 konnte allerdings nie DNA detektiert werden, auch der Versuch die Kristalle im Nachhinein mit DNA zu inkubieren, schlug fehl. N40-C370 kristallisierte also vermutlich bevorzugt allein, möglicherweise ist das Enzym mit gebundener DNA auch überhaupt nicht in der Lage zu kristallisieren.

Die ermittelte Struktur zeigte, dass die C-terminale Subdomäne, welche aus den Aminosäuren 261-370 gebildet wird, ausschließlich eine helikale Faltung hat. Am C-terminalen Bereich dieser Subdomäne, welcher essentiell für die Primaseaktivität ist,

befindet sich eine große Helix, welche wahrscheinlich in die Primersynthese involviert ist. In der Struktur fiel außerdem auf, dass ca. 10 Aminosäuren (250-260), welche die eigentliche Prim/Pol-Domäne mit der zusätzlichen Subdomäne verbinden, ungeordnet vorliegen. Dies führte zu der Annahme, dass es sich hierbei um eine flexible Verbindung zwischen den beiden Subdomänen handelt und sich diese während der katalytischen Aktivität des Enzyms gegeneinander bewegen. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür ist, dass in der gewonnenen Kristallstruktur das aktive Zentrum von ORF904 und die essentielle C-terminale Helix relativ weit voneinander entfernt sind und sie für eine Zusammenarbeit auf einem DNA-Templat vermutlich räumlich näher sein müssen.

Vergleichbares wurde für die Primase des Phagen T7 beobachtet, hier sind die N-terminale Zinkbindedomäne und die RNA-Polymerasedomäne ebenfalls mit einem flexiblen, ca. 10 Aminosäuren langem Linker verbunden. NMR-Messungen mit dem Enzym ergaben, dass sich Zinkbindedomäne und RNAP-Domäne bei Vorhandensein eines DNA-Templats annähern und es umschließen. Dadurch ließ sich auch bei diesem Protein die relativ große Distanz essentiell an der Sequenzerkennung beteiligter Aminosäuren und des aktiven Zentrums in vorhandenen Kristallen erklären (Kato *et al.*, 2003). Dieses Enzym ist allerdings nicht mit ORF904 verwandt und strukturell deshalb nicht vergleichbar, außerdem sind bei ORF904 Zinkbindemotiv und aktives Zentrum auf dem gleichen Teil des Proteins lokalisiert.

Über die genaue Zusammenwirkung der beiden Subdomänen konnte also aus der Kristallisation keine Informationen gewonnen werden. Man könnte in Zukunft weitere Experimente zur Kristallisation versuchen, um möglicherweise ein besser geeignetes DNA-Substrat zu identifizieren oder man könnte mit N40-C370 ebenfalls versuchen mittels NMR-Messungen eine Konformationsänderung des Enzyms nach Zugabe eines Oligodesoxynukleotids nachzuweisen.

#### **4.2.2. Y352 und W314 der C-terminalen Subdomäne sind an der Substraterkennung beteiligt**

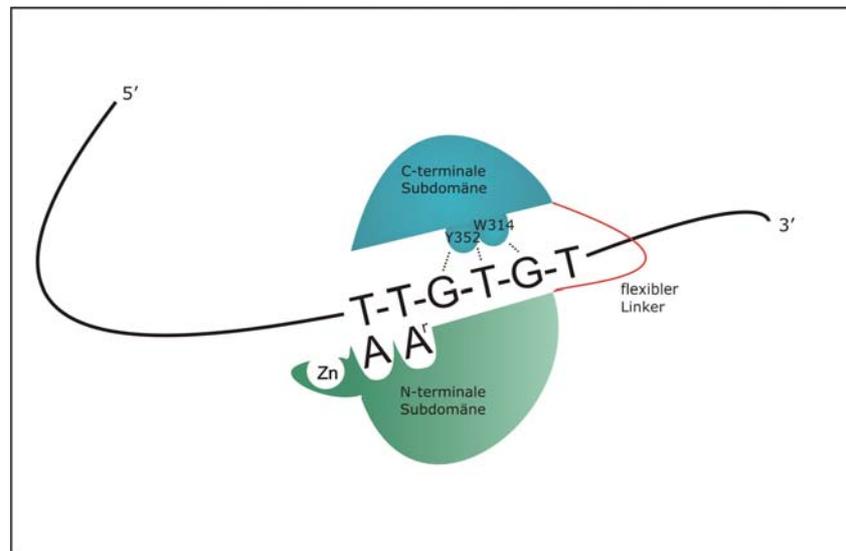
Um eine direkte Beteiligung der C-terminalen Helix der Deletionsmutante N40-C370 an der Primersynthese untersuchen zu können, wurden eine Reihe von Punktmutanten erstellt und auf ihre Aktivität untersucht. Es wurde angenommen, dass Aminosäuren der C-terminalen Helix an der Primersynthese beteiligt sind und möglicherweise mit der Erkennungssequenz interagieren. Da die Erkennungssequenz GTG ist, wurden Tyrosin- und Tryptophanreste zu Alanin mutiert, weil diese bevorzugt mit den fraglichen Nukleotiden interagieren (Ellis *et al.*, 2007). Die Reste waren zum Großteil in den Replikationsproteinen anderer Plasmide der pRN-Familie konserviert. Außerdem wurde eine Mutante erstellt, bei der fünf der flexiblen Aminosäuren, welche die beiden Subdomänen verbinden deletiert wurde.

In Primaseaktivitätsassays zeigte sich, dass eine Mutation zu Alanin an den Positionen Y352 und W314 dazu führte, dass kein Primer synthetisiert wird, wenn ein Templat mit Erkennungssequenz eingesetzt wird, da vermutlich diese Sequenz nicht mehr gebunden wird. Die anderen Mutationen führten nicht zu einer Veränderung der Substratspezifität gegenüber dem Wildtyp, also sind vermutlich nur Y352 und W314 von den getesteten Aminosäuren notwendig für die Erkennung des Triplets GTG. Weitere Tests zeigten, dass diese beiden Punktmutanten keines der in einer Position veränderten Erkennungstriplets nutzen konnten. Allerdings waren sie in der Lage mit undefinierter einzelsträngiger Virus-DNA als Templat Primer zu bilden, was dafür spricht, dass diese Mutationen zu einer Veränderung der Erkennungssequenz führen. Die veränderte Erkennungssequenz der Punktmutanten konnte allerdings bisher noch nicht identifiziert werden. Die Deletionsmutante, bei welcher die Aminosäuren des flexiblen Linkers entfernt worden waren, war nicht in der Lage Wildtyp-Primer zu synthetisieren. Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass das Erkennungstriplet von Aminosäuren der C-terminalen Subdomäne von N40-C370 erkannt wird. Möglicherweise interagieren Y352 und W314 direkt mit den Nukleotiden der Erkennungssequenz. Außerdem sind die Ergebnisse ein Hinweis, dass es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt, wenn DNA gebunden und der Primer initiiert wird.

Die Erkennung der Startsequenz ist für die Primase des Phagen T7 relativ gut untersucht worden, es wurden Punktmutanten der Zinkbinderegion hergestellt, welche in die DNA-Erkennung involviert ist. Dieses Enzym ist allerdings wieder nur teilweise mit ORF904 zu vergleichen, da die Zinkbindedomäne in der T7-Primase separiert von der RNA-Polymerasedomäne vorliegt und die sequenzspezifische Erkennung vornimmt, während bei ORF904 die Ergebnisse darauf hin deuten, dass die C-terminale Subdomäne die Sequenz erkennt. Die Erkennungssequenz der T7-Primase enthält ein kryptisches C, welches von H33 und D31 erkannt wird. Die Mutation von D31 führt dazu, dass keine Nukleotide an dieser Position mehr erkannt werden, während ein Austausch von Alanin für H33 zu einer Akzeptanz von Purinen an dieser Stelle führt (Kusakabe *et al.*, 1999). Die anderen beiden Positionen der Erkennungssequenz, welche bei dieser Primase nicht kryptisch sind, sondern das Templat für die ersten beiden Nukleotide des Primers, werden vermutlich eher über Watson-Crick-Basenpaarungen mit den geeigneten, gebundenen Ribonukleotiden erkannt. Im Falle von ORF904 ist dagegen die gesamte Erkennungssequenz kryptisch und wird wahrscheinlich vollständig vom Enzym erkannt. Generell lässt sich sagen, dass die geänderten Aminosäuren der C-terminalen Subdomäne von N40-C370 eine Rolle in der Erkennung der Startsequenz zu spielen scheinen. Die genaue Natur der Interaktion dieser Aminosäuren mit den Nukleotiden konnte noch nicht identifiziert werden, das Ersetzen der natürlichen Aminosäuren mit Alanin führte vermutlich zum relativ unspezifischen, schwachen Erkennen einer Anzahl von Triplets auf der einzelsträngigen DNA. Eine Substitution mit Aminosäuren, welche

mit anderen Nukleotiden interagieren, könnte dagegen eine Identifikation der genauen Wechselwirkungen ermöglichen.

Die Ergebnisse der Struktur- und der Mutationsanalyse machen eine Konformationsänderung des Proteins, vermutlich induziert durch die Bindung einzelsträngiger DNA, wahrscheinlich. Ein vorläufiges Modell der Primersynthese durch die Deletionsmutante N40-C370 in Abbildung 4-1 dargestellt.



**Abbildung 4-1: Modell der vermuteten Primersynthese durch die Deletionsmutante N40-C370. Die C-terminale Subdomäne interagiert mittels der Aminosäuren 314 und 352 mit der Erkennungssequenz GTG, auf der N-terminalen Subdomäne befindet sich das aktive Zentrum, welches 5' der Erkennungssequenz den Primer mit einem Ribonucleotid initiiert. Die beiden Subdomänen sind mit einem flexiblen Linker verbunden und nähern sich vermutlich einander an für die Primersynthese. Es ist nicht geklärt in welche Richtung die DNA das Protein bindet, es ist zur Vereinfachung nur eine Richtung dargestellt.**

### 4.3. Aufbau eines *in vitro* Replikationssystems

#### 4.3.1. Der Replikationsursprung von pRN1

Die genauen Vorgänge bei der Replikation der Plasmide der pRN-Familie sind nach wie vor unklar. Zuerst wurde vermutet, dass pRN1 und verwandte Plasmide mittels des *rolling circle* Mechanismus repliziert werden und es wurden auch die dazu erforderlichen Einzel- und Doppelstrangreplikationsursprünge determiniert (Keeling *et al.*, 1996; Kletzinger *et al.*, 1999). Diese Annahmen beruhten auf Sequenzvergleichen mit anderen Plasmiden, welche sich so replizieren und auf Hinweise auf das Vorhandensein einzelsträngiger DNA in den archaealen Zellen. Mittlerweile lassen die genauen Kenntnisse der Aktivitäten des Replikationsproteins ORF904 allerdings Zweifel an diesen Schlussfolgerungen zu. Für die Replikation eines Plasmides durch den *rolling circle* Mechanismus wird gewöhnlich vom

Plasmid ein Enzym kodiert, welches den Doppelstrangursprung bindet, Einzelstrangbrüche einführen kann und DNA-Stränge transferiert (del Solar *et al.*, 1998). Diese Aktivitäten wurden weder bei ORF904 noch bei den anderen plasmidal kodierten Enzymen gefunden.

Ein anderes archaeales Plasmid, pGT5 aus dem Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*, wird dagegen nachweislich als *rolling circle* repliziert. Es konnten Replikationsursprünge nachgewiesen werden, welche auch in bakteriellen *rolling circle* Plasmiden gefunden werden und pGT5 kodiert für ein Enzym welches Einzelstrangbrüche katalysieren kann (Erauso *et al.*, 1996; Marsin & Forterre, 1999).

Im Falle von pRN1 ist der genaue Mechanismus der Replikation also dagegen noch unklar. Ausgehend von den Aktivitäten der von pRN1 kodierten Proteine scheint eine Replikation mittels *strand displacement* möglich zu sein (del Solar *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus wurde für das Plasmid RSF1010, welches ein bakterielles Plasmid ist und sich unabhängig von den Wirtsproteinen in einer Vielzahl von Organismen replizieren kann, gut charakterisiert (Scherzinger *et al.*, 1991). RSF1010 kodiert u.a. für drei replikative Proteine, zwei davon besitzen Helikase- und Primaseaktivität sowie ein Initiatorprotein (Scherzinger *et al.*, 1984; Haring *et al.*, 1985; Honda *et al.*, 1989; Scherzinger *et al.*, 1997). Der Replikationsursprung dieses Plasmids enthält drei vollständige Iterons, an welche das Initiatorprotein bindet, sowie auf beiden Strängen jeweils eine Primerinitiationsstelle. Die Plasmid-Primase ist in der Lage an diesen beiden Initiatorstellen die DNA-Synthese zu beginnen, während die plasmidale Helikase für die Trennung der Doppelstränge benötigt wird (del Solar *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 1991). Die Replikation verläuft dann bidirektional und als Ergebnis entstehen einzelsträngige verdrängte und doppelsträngige Plasmide. Die einzelsträngigen Plasmide werden dann von den Primerinitiationsstellen ausgehend aufgefüllt.

Ein ähnlicher Mechanismus ist für pRN1 durchaus denkbar, die benötigten Enzymaktivitäten könnten von ORF904 allein oder eventuell noch von ORF80 getragen werden. Die Experimente zur sequenzspezifischen Primaseaktivität von ORF904 haben zwar aufgezeigt, dass das Enzym Primer an der Erkennungssequenz GTG initiiert, es sind aber keine weiteren möglichen Anforderungen an einen natürlichen Replikationsursprung bekannt. Es lassen sich durch eine Analyse der Sequenz von pRN1 auch keine weiteren Schlüsse auf einen Replikationsursprung ziehen. Die Erkennung des Ursprungs könnte möglicherweise auch durch ORF904 erfolgen, in diesem Protein kann C-terminal eine *winged helix* Domäne nachgewiesen werden, welche in anderen Proteinen an der Bindung von DNA beteiligt ist. Es gibt allerdings für eine sequenzspezifische Bindung von ORF904 an DNA bis jetzt keine Belege. Ob dagegen ORF80 an der Replikation beteiligt ist, ist nicht klar, da eine Deletion des Gens nicht dazu führt, dass das Plasmid in *Sulfolobus* nicht mehr repliziert werden kann.

Um die Replikation von pRN1 weiter untersuchen zu können, wurde also versucht den Replikationsursprung des Plasmids zu identifizieren. Dazu wurde zum einen eine Analyse neu gebildeter einzelsträngiger DNA mittels LM-PCR durchgeführt und zum anderen versucht von ORF904 gebildete Primer auf einzelsträngiger DNA des Plasmids pRN1 zu lokalisieren. Diese beiden Methoden führten nicht zur Detektion eines eindeutigen Replikationsursprungs. In der Zwischenzeit wurde aber ein, in den vorhergehenden Experimenten nicht entdeckter, Bereich des Plasmids identifiziert, welcher für die Replikation essentiell ist (Berkner & Lipps unveröff.). Es ist zu vermuten, dass dieser den Replikationsursprung darstellt. Dieser vermutete Ursprung liegt unterhalb des *orf904*-Gens und bildet eine ausgedehnte Sekundärstruktur, welche bereits bei der Entdeckung des Plasmids auffiel (Keeling *et al.*, 1996). Auffällig war, dass sich im ungepaarten *loop*-Bereich der Sekundärstruktur ein GTG-Triplett befindet, welches möglicherweise als Startpunkt für die Primersynthese durch ORF904 verwendet wird.

Der Bereich des vermuteten Ursprungs wurde in Primaseaktivitätsassays eingesetzt, um zu untersuchen, ob an dieser Sequenz bevorzugt Primer synthetisiert werden. Dabei zeigte sich, dass es durch die Zugabe eines Proteinextrakts von *Sulfolobus acidocaldarius* zu einer leicht erhöhten Primersynthese mit der vermuteten Sequenz des Replikationsursprungs kam. Dieser putative Ursprung wird also von ORF904 allein nicht erkannt und zur Primersynthese genutzt; möglicherweise sind andere zelluläre Proteine zusätzlich in diesen Prozess involviert.

#### **4.3.2. ORF904 interagiert mit PCNA1 und ORF80**

Es ist möglich, dass ORF904 während der Replikation von pRN1 mit anderen Proteinen interagiert. Um diese möglichen Interaktionen zu untersuchen, wurde ein plattenbasierter Interaktionsassay entwickelt. Dafür wurden die zu untersuchenden Proteine an einer Polystyrol-Oberfläche immobilisiert und mit ORF904-Varianten mit strep-Tag inkubiert, welcher dann immunologisch nachgewiesen wurde. Nachdem damit positive Reaktionen mit einigen Proteinen nachgewiesen werden konnten, wurden zusätzlich zum Volllängenprotein ORF904 eine Reihe von Deletionsmutanten eingesetzt. Mit diesen wurde versucht, die interagierende Teile des Proteins zu lokalisieren.

Es wurden eine Reihe von Proteinen aus *Sulfolobus solfataricus* aufgereinigt und in diesem Versuch verwendet, außerdem wurden ORF80 und ORF56 eingesetzt. Dabei kam es nur bei Addition von DNA (kurze Oligodesoxynukleotide) und ATP zu positiven Reaktionen, beides war also immer notwendig, um die Interaktion von ORF904 mit anderen Proteinen zu ermöglichen. Es wurde die Interaktion von ORF904 mit PCNA1 und mit ORF80 beobachtet, in beiden Fällen war sowohl DNA als auch ATP für die Interaktion nötig. Vermutlich führt die Interaktion von ORF904 mit ATP und DNA zu einer Änderung

der Konformation des Proteins, möglicherweise durch eine Multimerisierung, was dann eine Interaktion mit den genannten Proteinen zulässt.

Danach wurde die Interaktion der Proteine mit Deletionsmutanten von ORF904 untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Bereich, welcher die Aminosäuren 371 – 526 umfasst, stark mit PCNA1 und ORF80 interagiert. Deletionsmutanten von ORF904, bei denen dieser Bereich nicht vorhanden war, interagierten dagegen auch in Anwesenheit von DNA und ATP nicht mit PCNA1 und ORF80. Es ist also anzunehmen, dass dieser Bereich dazu dient andere Proteine zu kontaktieren. Interessant ist, dass die Deletionsmutante N371-C526 in der Lage ist, ohne Zugabe von ATP und DNA mit den Proteinen zu interagieren, während Proteine, welche die Helikasedomäne beinhalteten, die Zugabe von ATP und DNA für eine Interaktion immer benötigten. Möglicherweise wird dieser Bereich des Proteins im Volllängenprotein verdeckt und erst durch eine vermutete Multimerisierung freigelegt.

PCNA1 ist ein Teil des PCNA-Komplexes, welcher bei den Archaea ein Heterotrimer ist (Dionne *et al.*, 2003a). Aufgabe dieses Komplexes ist es, andere Proteine zu binden und in räumlicher Nähe zur DNA zu fixieren. Eine Interaktion dieses Komplexes mit ORF904 wäre also denkbar und könnte dazu dienen, die Prozessivität von ORF904 zu erhöhen. Es wurde bisher oft beobachtet, dass Proteine nur mit einer der Untereinheiten des PCNA-Komplexes interagieren (Dionne *et al.*, 2003a; Dionne & Bell, 2005), dies dient möglicherweise der Koordination mehrerer Proteine an der Replikationsgabel. Die Endonuklease FEN-1, welche ebenfalls mit PCNA1 interagiert, bindet beispielsweise spezifisch an den Linker welcher N- und C-terminale Domäne des PCNA1 verbindet (Dore *et al.*, 2006). Viele Proteine interagieren allerdings mit einer spezifischen, konservierten Bindungsstelle mit PCNA, genannt PIP-Box (Warbrick, 2000). Diese Sequenz lässt sich bei ORF904 nicht finden.

ORF80 wird von pRN1 kodiert und es wurde zu Beginn angenommen, dass dieses Protein zur in der Lage ist, den Replikationsursprung zu erkennen, da es spezifisch Sequenzen auf pRN1 bindet (Lipps *et al.*, 2001a). Experimente mit einem pRN1-Shuttlevektor haben jetzt allerdings gezeigt, dass dieses Protein für die Replikation des pRN1-Replikons in *Sulfolobus* nicht benötigt wird, eine Deletion führt nur zu einer Herabsetzung der Stabilität des Plasmids in den Zellen (Berkner & Lipps unveröff.). Die Funktion dieses Proteins ist also unklar. Die starke Konservierung dieses *open reading frame* innerhalb der pRN-Plasmide lässt aber vermuten, dass ORF80 eine Rolle in der Replikation von pRN1 oder in der Verteilung der replizierten Plasmide an die Tochterzellen spielt. Es ist aber auch denkbar, dass die gefundenen Interaktionen von ORF80 mit ORF904 nicht auf einer tatsächlichen Interaktion beruhen, da ORF80 sehr unlöslich ist und ORF904 möglicherweise über hydrophobe Wechselwirkungen bindet.

### 4.3.3. ORF904 ist in der Lage zu multimerisieren

Nachdem mit den Deletionsmutanten herausgefunden werden konnte, welche Teile von ORF904 in die Interaktion mit anderen Proteinen involviert sind, wurde ein vergleichbarer Versuch herangezogen, um die Interaktion von ORF904 mit sich selbst genauer zu analysieren. Vergleiche mit anderen Helikasen führten zu der Hypothese, dass ORF904 Hexamere bildet, um als Helikase zu fungieren (Sanchez & Lipps unveröff.).

Es konnte gezeigt werden, dass ORF904 in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren, wenn ein Oligodesoxynukleotid und ATP vorhanden sind. Um herauszufinden, wo diese Interaktion im Enzym stattfindet, wurden eine Reihe von Deletionsmutanten untersucht. Dabei zeigte sich, dass ebenfalls die Aminosäuren 371 – 526 diese Interaktion ermöglichen. Dass derselbe Bereich des Proteins für die Interaktion mit anderen Proteinen sowie für die Multimerisierung von ORF904 verantwortlich ist, überraschte. Die Deletionsmutante N371-C526 neigte während der Aufreinigung stark zur Aggregation, was zum einen darauf schließen lässt, dass sie mit sich selbst interagiert, zum anderen aber auch zu einer verstärkten Bindung an zufällige Proteine geführt haben könnte. Die Auswertung der anderen Deletionsmutanten bestätigte allerdings auch, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren 371 und 526 für beide Interaktionen von Bedeutung ist.

Um die plattenbasierten Interaktionsassays zu bestätigen, wurden anschließend mit einer Reihe ausgewählter Proteine *pull-down* Assays durchgeführt, bei denen beide Interaktionspartner über einen strep-Tag an einem der beiden Proteine an eine Affinitätssäule gebunden und dann analysiert werden. In diesem Versuch wurden Proteine eingesetzt, welche in den plattenbasierten Interaktionsassays positive Ergebnisse erbrachten. Dabei konnte nur für das Proteinpaaar N371-C526 und N40-C526 eine Interaktion nachgewiesen werden. Vermutlich weil bei dieser Kombination eine starke Interaktion stattfindet und die Zugabe von ATP und DNA nicht erforderlich ist. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Ergebnisse des plattenbasierten Assays in Lösung teilweise reproduziert werden können. Dies spricht dafür, dass es sich dabei um eine echte Interaktion handelt.

Die Versuche zeigten also, dass ORF904 in der Lage ist, zu multimerisieren, dazu allerdings DNA und ATP benötigt. Die genaue Funktion von DNA und ATP ist dabei unklar, möglicherweise induzieren sie erst die Multimerisierung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse. Mit dem Vollängen-ORF904 und der Deletionsmutante N371, welche die C-terminalen 534 Aminosäuren umfasst, konnten bei Zugabe von DNA und einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon hexamere Strukturen beobachtet werden. Dagegen war die Deletionsmutante N527 nicht in der Lage diese Strukturen zu bilden (Sanchez & Lipps, unveröff.).

Im Falle der SF3-Helikase des SV40 Tag konnte gezeigt werden, dass nur die Bindung von ATP für eine stabile Hexamerisierung notwendig ist (Dean *et al.*, 1987). Gleichfalls wird durch die Bindung von ATP die Affinität des Proteins für den Replikationsursprung

*oriII* des Virus erhöht (Deb & Tegtmeyer, 1987). Die Bindung der DNA führt dann zur Interaktion mit einem weiteren Hexamer (Borowiec *et al.*, 1990). Es wurde allerdings auch beobachtet, dass Deletionsmutanten des SV40 Tag in der Lage sind, ohne die Zugabe von ATP mit geringer Stabilität zu hexamerisieren (Li *et al.*, 2003). Die Interaktion findet bei diesem Protein an zwei Stellen der einzelnen Untereinheiten statt, einmal im N-terminalen Bereich, welcher für die Aktivität nicht essentiell ist und einmal im zentralen Bereich des Enzyms (Weisshart *et al.*, 2004).

Dagegen zeigt die beobachtete Interaktion von N371-C526 und N40-C526 an, dass bei ORF904 die Kontakte zwischen zwei Untereinheiten möglicherweise nur in dem zentralen Bereich der Aminosäuren 371 - 526 stattfinden. Außerdem scheint für diese Interaktion ATP und DNA nicht benötigt zu werden. Dagegen waren DNA und ATP notwendig für die Interaktion von Vollängenprotein und allen weiteren Proteinen, welche die vollständige Helikasedomäne enthielten. Zum jetzigen Stand kann nur spekuliert werden, dass es nach Bindung von DNA und ATP durch die Helikasedomäne zu einer Konformationsänderung kommt, welche eine Interaktion ermöglicht und dass die Deletionsmutanten, welche die Helikasedomäne nicht enthalten, dieser Konformationsänderung ähnlich sind und deshalb ohne ATP und DNA interagieren können.

Genauere Untersuchungen der Proteininteraktionen in *Sulfolobus* sind jetzt mit dem Vorhandensein der Shuttlevektoren möglich. Diese ermöglichen, getaggte Proteine in Zukunft direkt in *Sulfolobus* zu exprimieren und dann über eine Affinitätssäule mit ihren Interaktionspartnern zu isolieren. Die so aufgereinigten Proteine können dann massenspektrometrisch analysiert werden.

Es gelang in dieser Arbeit zu zeigen, dass ORF904 Primer sequenzspezifisch synthetisiert und die Zusammensetzung des Primers sowie Anforderungen an das Templat und weitere Eigenschaften der Primaseaktivität konnten aufgeklärt werden. Außerdem konnte die Struktur des minimalen Proteins gelöst werden, welches in der Lage ist, einen Primer zu synthetisieren. Mit Hilfe von Punktmutanten war es möglich zu zeigen, dass es während der Primersynthese wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der Primase kommt. In Proteininteraktionsassays zeigte sich, dass ORF904 in der Lage ist mit ORF80 und PCNA1 zu interagieren. Diese Interaktion wird vermutlich durch Aminosäuren im zentralen, bisher uncharakterisierten Bereich des Proteins vermittelt. Die bereits beobachtete Multimerisierung von ORF904 konnte mittels Interaktionsassays ebenfalls bestätigt werden. Diese Ergebnisse werden helfen, die Replikation von pRN1 besser zu verstehen.

## 5. Zusammenfassung

Das Plasmid pRN1 kann als Modell für die Untersuchung der DNA-Replikation im thermoacidophilen Crenarchaeon *Sulfolobus* genutzt werden. Bis jetzt sind nur wenige Informationen über die Replikation dieses Plasmids vorhanden. Auf dem Plasmid pRN1 sind drei offene Leseraster kodiert, welche innerhalb anderer nah verwandter Plasmide konserviert sind. Das größte der offenen Leseraster kodiert für das Protein ORF904. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Protein eine N-terminal lokalisierte Primase/Polymeraseaktivität besitzt, sowie eine C-terminale ATPase/Helikasedomäne. Vermutlich ist ORF904 involviert in die Replikation von pRN1. Die Untersuchung dieses Protein könnte deshalb dazu dienen, weitere Informationen über die Replikation von pRN1 zu gewinnen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die weitere Charakterisierung der Primaseaktivität von ORF904. Es war bekannt, dass ORF904 in der Lage ist, mit einzelsträngiger M13 DNA als Templat einen Primer zu synthetisieren. Die Sequenzanforderungen des Proteins waren unbekannt. Eine Reihe von Oligodesoxynukleotiden wurden untersucht und es konnte ein Templat identifiziert werden, welches von ORF904 für die Synthese eines Primers genutzt werden konnte. Durch systematisches Austauschen der Basen dieses Templates konnte die Primaseerkennungssequenz GTG identifiziert werden. Als minimales Substrat für die Synthese eines Vollängenprimers wurde 5'-N<sub>8</sub>GTGN-3' bestimmt. Verkürzungen des 5'-Endes dieses Substrats führt zur Synthese kürzerer Primer, während eine Verkürzung des 3'-Endes dazu führt, dass das Substrat nicht mehr für die Primersynthese genutzt werden kann.

Es war außerdem bekannt, dass ORF904 Ribonukleotide und Desoxynukleotide für die Primersynthese benötigt, was sehr ungewöhnlich ist und bisher noch nicht beobachtet wurde. Die Quantifizierung des Einbaus radioaktiv markierter Ribo- und Desoxynukleotide zeigte, dass der Primer aus einem initiiierenden Ribonukleotid besteht, welches ausschließlich mit Desoxynukleotiden verlängert wird. Der Startpunkt des Primers befindet sich direkt 5' des Erkennungsmotivs, dies ist ebenfalls ungewöhnlich, andere bisher untersuchte Primasen initiieren die Primersynthese am zentralen Nukleotid der Erkennungssequenz.

Da der Primer, welcher von ORF904 synthetisiert wird, hauptsächlich aus Desoxynukleotiden besteht, könnte eine spätere Entfernung während der Replikation erschwert sein. Deshalb wurde die Kopiergenauigkeit des Enzyms untersucht, indem die Einbauraten nichtkomplementärer Nukleotide untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Selektivität des Enzyms bei der Auswahl des ersten Nukleotids (dem Ribonukleotid) gering ist und dass ATP an dieser Position bevorzugt und gegenüber allen Basen eingebaut wird. Im Gegensatz dazu kommt es beim Einbau der Desoxynukleotide

extrem selten zu Misinkorporationen, die Fehlerrate beträgt hier weniger als 0,02. Dies ist sehr niedrig im Vergleich mit der Mehrheit der bisher untersuchten Primasen.

Die minimale Deletionsmutante von ORF904, welche in der Lage ist einen Primer mit einem Substrat mit Erkennungssequenz zu synthetisieren, umfasst die Aminosäuren 40 bis 370. Diese minimale Primasedomäne hat eine erhöhte Affinität für DNA mit dem Erkennungsmotiv, die Dissoziationskonstante beträgt hier 225 nM, im Vergleich zu DNA mit einem Basenaustausch im Erkennungsmotiv mit einer Dissoziationskonstante von 1200 nM.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ORF904 in der Lage ist, ein einzelsträngiges Oligodesoxynukleotid templatunabhängig zu verlängern. Diese terminale Transferaseaktivität wurde auch bei einer Reihe weiterer archaealer zellulärer und plasmidaler Primasen gefunden. Es wird vermutet, dass diese Proteine zusätzlich an DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind.

Bisher gibt es nur wenige Informationen über den Reaktionsmechanismus von Primasen. Strukturen der Proteine, möglicherweise im Komplex mit einem Substrat, könnten helfen, diese Mechanismen aufzuklären. Deshalb wurde versucht, kurze Oligodesoxynukleotide, welche die Erkennungssequenz von ORF904 enthielten, mit verschiedenen Deletionsmutanten zu kristallisieren, um die Röntgenkristallstruktur des Komplexes zu lösen. Die Struktur der Prim/Pol-Domäne (Aminosäuren 40-255), welche keine Primaseaktivität hat, wurde bereits gelöst. In den Experimenten wurden Oligodesoxynukleotide, welche sich in Länge und Sequenz unterschieden, mit Deletionsmutanten von ORF904, welche die Aminosäuren 40-370 oder 40-526 umfassten eingesetzt. Nur mit der kürzeren Deletionsmutante konnten Kristalle erzeugt werden, welche allerdings keine DNA enthielten. In der Struktur zeigte sich, dass die C-terminale Subdomäne der Deletionsmutante (Aminosäuren 260-370), welche für die Primersynthese essentiell ist, ausschließlich  $\alpha$ -helikal gefaltet vorliegt. Die Anordnung der beiden Subdomänen und ihre Verbindung mit einem nicht auflösbaren, flexiblem Linker führte zu der Vermutung, dass das Protein verschiedene Konformationen einnehmen kann. Dies wurde untersucht, indem eine Reihe von Aminosäureaustauschen erstellt wurden und ihre Primaseaktivität untersucht wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass Y352 und schwächer W314 in die Erkennung des GTG involviert sind, da eine Mutation dieser Aminosäuren zu einem Verlust der Primaseaktivität mit einem Templat mit der Erkennungssequenz führt. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass dieser Verlust der Aktivität vermutlich auf eine Veränderung der Erkennungssequenz zurückzuführen ist, da die Proteine in der Lage waren, mit M13 DNA, welche eine Vielzahl möglicher Sequenzen enthält, einen Primer zu synthetisieren. In der Kristallstruktur liegen das vorher identifizierte aktive Zentrum und die Aminosäuren Y352 und W314 weit voneinander entfernt, aber die Ergebnisse zeigen, dass sich diese Teile des Proteins während der Primersynthese vermutlich in räumlicher Nähe befinden. Dies unterstützte die

Vermutung, dass die aktive Form von ORF904 eine geschlossene Konformation einnimmt und sich von der offenen Form im Kristall unterscheidet.

Um die Replikation von pRN1 genauer untersuchen zu können, wurde versucht ein *in vitro* Replikationssystem aufzubauen. Dafür muss der Replikationsursprung von pRN1 identifiziert werden. Es wurden verschiedene Methoden probiert, aber es gelang nicht diesen Replikationsursprung zu identifizieren. Ein vermuteter Ursprung, welcher mit Hilfe von Shuttlevektoren identifiziert wurde, zeigte keine auffällige Eignung als Substrat für die Primersynthese.

Viele der Proteine, welche in die DNA-Replikation involviert sind, sind in Komplexen organisiert, deshalb könnten weitere Proteine, die an der Replikation von pRN1 beteiligt sind, durch die Identifizierung von Interaktionspartnern von ORF904 gefunden werden. Ein modifizierter ELISA-Assay wurde benutzt, um Protein-Protein-Interaktionen verschiedener zellulärer Proteine mit ORF904 zu detektieren. Interaktionen wurden beobachtet mit PCNA1, welches Teil der archaealen *sliding clamp* ist und mit ORF80, welches ebenfalls auf pRN1 kodiert ist. Für die Interaktion von ORF904 mit diesen Proteinen war die Anwesenheit von ATP und einem Oligodesoxynukleotid notwendig. Verschiedene Deletionsmutanten von ORF904 wurden eingesetzt, um den Teil des Proteins zu identifizieren, welches die Interaktionen vermittelt. Dabei wurde herausgefunden, dass die Aminosäuren 371-526 des uncharakterisierten zentralen Bereichs von ORF904 in der Lage sind mit den gleichen Proteinen zu interagieren wie das Volllängenprotein. In einem vergleichbaren Experiment wurde untersucht, welche Bereiche von ORF904 interagieren, um die für die Helikaseaktivität vermutlich notwendigen Hexamere zu bilden. Es zeigte sich, dass ORF904 in der Lage ist, mit sich selbst in Anwesenheit von ATP und einem Oligodesoxynukleotid zu interagieren, was zeigt, dass dieses Protein wahrscheinlich multimerisiert. Mit den verschiedenen Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass wieder der Bereich der Aminosäuren 317-526 für die Interaktion verantwortlich ist. Möglicherweise ist dieser Bereich von ORF904 allgemein für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich.

Es konnte gezeigt werden, dass ORF904 eine sequenzspezifische Primaseaktivität hat und die Erkennungssequenz sowie die Zusammensetzung des Primers konnten identifiziert werden. Zusätzlich wurde die Struktur der minimalen Primasedomäne gelöst und die Untersuchungen der Punktmutanten zeigen, dass ORF904 möglicherweise eine Konformationsänderung durchführt für die Primersynthese. Es konnten außerdem PCNA1 und ORF80 als Interaktionspartner von ORF904 identifiziert werden. Diese Ergebnisse können helfen, die Replikation von pRN1 besser zu verstehen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Beck, K., Lipps, G., (2007) Properties of an unusual DNA primase from an archaeal Plasmid. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5635-45.

## 6. Summary

The plasmid pRN1 can be used as a convenient model to study the replication of DNA in *Sulfolobus* species belonging to the thermoacidophilic crenarchaeota. Up to now relatively little is known about how this plasmid is replicated. There are three open reading frames on pRN1 which are conserved among a number of related plasmids. The largest of these open reading frames codes for a protein which has been termed ORF904. It could be shown that this protein possesses an N-terminal primase/polymerase activity and a C-terminal ATPase/helicase domain. It is likely that ORF904 is extensively involved in the replication of pRN1. The study of this protein could help to better understand unclear details of plasmid replication.

One of the aims of this thesis was to further characterize the primase activity of ORF904. It had been known that ORF904 is able to synthesize a primer using single stranded M13 DNA as template. The sequence requirements of the protein were unknown. Screening different short oligodeoxynucleotides for their ability to support primer synthesis allowed to identify one suitable defined substrate. By systematically exchanging single bases of the template the primase recognition sequence GTG could be determined. The minimal substrate that is still able to support the formation of a full length primer is 5'-N<sub>8</sub>GTGN-3'. Shortening the 5' end of this minimal substrate leads to a shorter primer, whereas templates with a shorter 3' end are not able to function as primase templates for ORF904.

It had also been observed that ORF904 requires both ribonucleotides and deoxynucleotides for the synthesis of a primer, a very unusual feature that has never been observed in other systems. Quantifying the incorporation of radioactively labelled ribo- and deoxynucleotides showed that the primer always consists of one initial rNTP and is elongated exclusively with dNTPs. In addition the starting point of the primer is the base 5' of the recognition motif, this is also unusual and has not been observed so far for other primases that generally initiate primer synthesis at the central nucleotide of the recognition sequence.

Since the primer that is synthesized by ORF904 consists mainly of deoxynucleotides subsequent excision during the replication might be difficult. Therefore the fidelity of the enzyme was tested by analysing the incorporation rate of non-cognate nucleotides. It was found that the first nucleotide (the ribonucleotide) is selected with low specificity, ATP is preferred in this position and can be effectively incorporated opposite all four bases. In contrast the deoxynucleotides are very rarely misincorporated, the error rate of the enzyme is less than 0,02. This is very low compared to the majority of studied primases.

The minimal deletion mutant that is able to synthesize a primer using a template with recognition sequence was found to encompass amino acids 40-370. This minimal primase

domain also shows an increased affinity for DNA with the recognition motif with a dissociation constant of 225 nM compared to 1200 nM for DNA with a single base change in the motif.

Additionally it was found that ORF904 is able to elongate single stranded DNA in a template independent manner. This terminal transferase activity has also been identified for other archaeal cellular and plasmidal primases and might be a common feature of these enzymes. It is suggested that these primases have additional functions in DNA repair processes.

To date there is still only little information about the reaction mechanisms of primases. Structural information of proteins complexed with substrate is helpful in elucidating these mechanisms. Therefore it was attempted to co-crystallize short oligodeoxynucleotides containing the identified recognition sequence with different ORF904 deletion mutants in order to be able to solve the X-ray structure of the complex. The structure of the prim/pol core domain (amino acids 40-255) which does not possess primase activity had been solved previously. A number of oligodeoxynucleotides which were varied in length and sequence were used in the experiments together with deletion mutants encompassing amino acids 40-370 or 40-526 of ORF904. Crystals were only obtained with the shorter deletion mutant and they did not contain any DNA. The structure showed that the C-terminal subdomain of the deletion mutant (amino acids 260-370) which is essential for primer synthesis has an entirely  $\alpha$ -helical fold. The overall arrangement of the two subdomains and their observed connection with a flexible unresolved linker led to the assumption that the protein is able to undergo a conformational change upon DNA binding. This hypothesis was tested by introducing a number of single amino acid exchanges in the protein and testing the ability of the mutants to synthesize a primer. It could be shown that Y352 and to a lesser extent W314 are involved in the recognition of the GTG because mutating them causes a loss of primase activity on templates containing the recognition motif. In further experiments it could be shown that this loss of activity is likely due to a changed recognition sequence as the proteins were able to synthesize primers on single stranded M13 virus DNA which contains a large variety of possible sequences. In the obtained structure the previously identified active centre of ORF904 and the amino acids Y352 and W314 are distant but the results suggest that both parts of the protein must come in proximity to each other during the synthesis of the primer. This supports the hypothesis that the active conformation of ORF904 is closed in contrast to the open conformation observed in the crystal structure.

To be able to investigate the replication of pRN1 in more detail it was attempted to set up an *in vitro* replication system. For this the replication origin of pRN1 has to be identified. Several approaches were tried but no origin could be definitely identified. The

use of a putative origin region of pRN1 that had been found using modified plasmids failed to show a significantly higher suitability as a primase template.

Most of the proteins involved in the replication of DNA are organized in larger complexes so determining interaction partners of ORF904 might reveal other proteins that are needed for the replication of pRN1. A quantitative assay using a modified ELISA screen was used to identify protein-protein interaction of various cellular proteins with ORF904. An interaction was observed with PCNA1 which is part of the archaeal sliding clamp and ORF80, a protein that is also encoded on pRN1. For these interactions the presence of ATP and an oligodeoxynucleotide was essential. Different smaller deletion mutants of ORF904 were used to map the part of the protein that facilitates the protein interactions. It was found that the amino acids 371-526 of the uncharacterised central part of ORF904 are able to interact comparable to the full length protein. A similar experiment was additionally used to assess which parts of ORF904 interact to form the presumed hexamers that are necessary for helicase activity. It showed that ORF904 interacts with itself in the presence of ATP and oligodeoxynucleotide, which indicates that the protein is able to multimerize. Then the interaction of different deletion mutants was tested and it was again found that the amino acids 371-526 are responsible for the interaction. This shows that this region of ORF904 might be a major protein interaction domain.

It could be shown the primase activity of ORF904 is sequence specific and the recognition sequence as well as the composition of the primer could be determined. In addition the structure of the minimal primase active protein could be solved and the analysis of point mutants indicates that the protein undergoes a conformational change for catalysis. The interaction of ORF904 with PCNA1 and ORF80 could also be identified. Together these findings will help to better understand the replication of pRN1.

## 7. Abkürzungen

A	in DNA: Adenosin, in Proteinen: Alanin
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen (einzelsträngige DNA)
bp	Basenpaare (doppelsträngige DNA)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	in DNA: Cytidin, in Proteinen: Cystein
CTP	Cytidintriphosphat
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppeldestilliertes Wasser
dNTPs	Desoxynukleotide
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Lys	Lysin
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante

MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
N	ein beliebiges Nukleotid an dieser Stelle
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
nt	Nukleotide
OD <sub>405</sub>	optische Dichte bei 405 nm
P	Phenylalanin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rNTPs	Ribonukleotide
RPD	RNA-Polymerase Domäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymidin
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
W	Tryptophan
w/v	Gewicht/Volumen
Y	Tyrosin
ZBD	Zinkbindedomäne

## 8. Referenzen

- Aravind,L., Leipe,D.D. & Koonin,E.V. (1998) Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4205-4213.
- Arezi,B. & Kuchta,R.D. (2000) Eukaryotic DNA primase. *Trends Biochem.Sci.*, **25**, 572-576.
- Arnold,H.P., She,Q., Phan,H., Stedman,K., Prangishvili,D., Holz,I., Kristjansson,J.K., Garrett,R. & Zillig,W. (1999) The genetic element pSSVx of the extremely thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus* is a hybrid between a plasmid and a virus. *Molecular Microbiology*, **34**, 217-226.
- Augustin,M.A., Huber,R. & Kaiser,J.T. (2001) Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nature Structural Biology*, **8**, 57-61.
- Bell,S.P. & Dutta,A. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, **71**, 333-374.
- Berkner,S., Grogan,D., Albers,S.V. & Lipps,G. (2007) Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea. *Nucleic Acids Research*, **35**.
- Berkner,S. & Lipps,G. (2007) Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon. *Journal of Bacteriology*, **189**, 1711-1721.
- Bocquier,A.A., Liu,L., Cann,I.K., Komori,K., Kohda,D. & Ishino,Y. (2001) Archaeal primase: bridging the gap between RNA and DNA polymerases. *Curr.Biol.*, **11**, 452-456.
- Borowiec,J.A., Dean,F.B., Bullock,P.A. & Hurwitz,J. (1990) Binding and Unwinding - How T-Antigen Engages the Sv40 Origin of Dna-Replication. *Cell*, **60**, 181-184.
- Boule,J.B., Rougeon,F. & Papanicolaou,C. (2001) Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 31388-31393.
- Carpentieri,F., De Felice,M., De Falco,M., Rossi,M. & Pisani,F.M. (2002) Physical and functional interaction between the mini-chromosome maintenance-like DNA helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J.Biol.Chem.*, **277**, 12118-12127.
- Contursi,P., Cannio,R., Prato,S., She,Q.X., Rossi,M. & Bartolucci,S. (2007) Transcriptional analysis of the genetic element pSSVx: Differential and

- temporal regulation of gene expression reveals correlation between transcription and replication. *Journal of Bacteriology*, **189**, 6339-6350.
- Cooper, G.M. & Hausman, R.E. (2004) *The Cell a Molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C.
- Corn, J.E. & Berger, J.M. (2007) FASTDXL: A generalized screen to trap disulfide-stabilized complexes for use in structural studies. *Structure*, **15**, 773-780.
- Corn, J.E., Pease, P.J., Hura, G.L. & Berger, J.M. (2005) Crosstalk between primase subunits can act to regulate primer synthesis in trans. *Molecular Cell*, **20**, 391-401.
- Corn, J.E., Pelton, J.G. & Berger, J.M. (2008) Identification of a DNA primase template tracking site redefines the geometry of primer synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, **15**, 163-169.
- Corpet, F. (1988) Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering. *Nucleic Acids Research*, **16**, 10881-10890.
- Cotterill, S., Chui, G. & Lehman, I.R. (1987) DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. DNA primase subunits. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16105-16108.
- Datukishvili, N., Pokholok, D., Lottspeich, F., Prangishvili, D. & Rechinsky, V. (1996) The DNA polymerase-encoding gene from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Gene*, **177**, 271-273.
- Davey, S.K. & Faust, E.A. (1990) Murine DNA polymerase.alpha-primase initiates RNA-primed DNA synthesis preferentially upstream of a 3'-CC(C/A)-5' motif. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3611-3614.
- De Falco, M., Fusco, A., De Felice, M., Rossi, M. & Pisani, F.M. (2004) The DNA primase of *Sulfolobus solfataricus* is activated by substrates containing a thymine-rich bubble and has a 3'-terminal nucleotidyl-transferase activity. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5223-5230.
- Dean, F.B., Dodson, M., Echols, H. & Hurwitz, J. (1987) Atp-Dependent Formation of A Specialized Nucleoprotein Structure by Simian Virus-40 (Sv40) Large Tumor-Antigen at the Sv40 Replication Origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 8981-8985.
- Deb, S.P. & Tegtmeyer, P. (1987) Atp Enhances the Binding of Simian Virus-40 Large T-Antigen to the Origin of Replication. *Journal of Virology*, **61**, 3649-3654.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. & Diaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 434-+.
- Delsolar, G.H., Perezmartin, J. & Espinosa, M. (1990) Plasmid Pls1-Encoded Repa Protein Regulates Transcription from Repab Promoter by Binding to A Dna-Sequence Containing A 13-Base Pair Symmetric Element. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 12569-12575.

- Dionne, I. & Bell, S.D. (2005) Characterization of an archaeal family 4 uracil DNA glycosylase and its interaction with PCNA and chromatin proteins. *Biochemical Journal*, **387**, 859-863.
- Dionne, I., Nookala, R.K., Jackson, S.P., Doherty, A.J. & Bell, S.D. (2003a) A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Cell*, **11**, 275-282.
- Dionne, I., Robinson, N.P., McGeoch, A.T., Marsh, V.L., Reddish, A. & Bell, S.D. (2003b) DNA replication in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemical Society Transactions*, **31**, 674-676.
- Dominguez, O., Ruiz, J.F., de Lera, T.L., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M.A., Kirchhoff, T., Martinez, A., Bernad, A. & Blanco, L. (2000) DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *Embo Journal*, **19**, 1731-1742.
- Dore, A.S., Kilkenny, M.L., Jones, S.A., Oliver, A.W., Roe, S.M., Bell, S.D. & Pearl, L.H. (2006) Structure of an archaeal PCNA1-PCNA2-FEN1 complex: elucidating PCNA subunit and client enzyme specificity. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4515-4526.
- Dracheva, S., Koonin, E.V. & Crute, J.J. (1995) Identification of the Primase Active-Site of the Herpes-Simplex Virus Type-1 Helicase-Primase. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14148-14153.
- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., Prokhorova, T.A. & Walter, J.C. (2002) MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33049-33057.
- Egelman, E.H., Yu, X., Wild, R., Hingorani, M.M. & Patel, S.S. (1995) Bacteriophage-T7 Helicase-Primase Proteins Form Rings Around Single-Stranded-Dna That Suggest A General Structure for Hexameric Helicases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 3869-3873.
- Ellis, J.J., Broom, M. & Jones, S. (2007) Protein-RNA interactions: Structural analysis and functional classes. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, **66**, 903-911.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **60**, 2126-2132.
- Erauso, G., Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M.F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D. & Forterre, P. (1996) Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J. Bacteriol.*, **178**, 3232-3237.
- Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **62**, 72-82.

- Frick,D.N., Baradaran,K. & Richardson,C.C. (1998) An N-terminal fragment of the gene 4 helicase/primase of bacteriophage T7 retains primase activity in the absence of helicase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 7957-7962.
- Frick,D.N., Kumar,S. & Richardson,C.C. (1999) Interaction of ribonucleoside triphosphates with the gene 4 primase of bacteriophage T7. *J.Biol.Chem.*, **274**, 35899-35907.
- Frick,D.N. & Richardson,C.C. (1999) Interaction of bacteriophage T7 gene 4 primase with its template recognition site. *J.Biol.Chem.*, **274**, 35889-35898.
- Frick,D.N. & Richardson,C.C. (2001) DNA primases. *Annu.Rev.Biochem.*, **70**, 39-80.
- Gajiwala,K.S., Chen,H., Cornille,F., Roques,B.P., Reith,W., Mach,B. & Burley,S.K. (2000) Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, **403**, 916-921.
- Gao,G.X., Orlova,M., Georgiadis,M.M., Hendrickson,W.A. & Goff,S.P. (1997) Conferring RNA polymerase activity to a DNA polymerase: A single residue in reverse transcriptase controls substrate selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 407-411.
- Georgescu,R.E., Kim,S.S., Yurieva,O., Kuriyan,J., Kong,X.P. & O'Donnell,M. (2008) Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell*, **132**, 43-54.
- Gorbalenya,A.E., Koonin,E.V. & Wolf,Y.I. (1990) A New Superfamily of Putative Ntp-Binding Domains Encoded by Genomes of Small Dna and Rna Viruses. *Febs Letters*, **262**, 145-148.
- Gottesman,M.E. & Canellakis,E.S. (1966) The terminal nucleotidyltransferases of calf thymus nuclei. *J.Biol.Chem.*, **241**, 4339-4352.
- Grabowski,B. & Kelman,Z. (2003) Archaeal DNA replication: Eukaryal proteins in a bacterial context. *Annual Review of Microbiology*, **57**, 487-516.
- Greve,B., Jensen,S., Phan,H., Brugger,K., Zillig,W., She,Q. & Garrett,R.A. (2005) Novel RepA-MCM proteins encoded in plasmids pTAU4, pORA1 and pTIK4 from *Sulfolobus neozealandicus*. *Archaea*, **1**, 319-325.
- Gruz,P., Pisani,F.M., Shimizu,M., Yamada,M., Hayashi,I., Morikawa,K. & Nohmi,T. (2001) Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47394-47401.
- Handa,N., Ohashi,S., Kusano,K. & Kobayashi,I. (1997) chi\*, a chi-related 11-mer sequence partially active in an *E-coli* recC\* strain. *Genes to Cells*, **2**, 525-536.
- Haring,V., Scholz,P., Scherzinger,E., Frey,J., Derbyshire,K., Hatfull,G., Willetts,N.S. & Bagdasarian,M. (1985) Protein RepC is involved in copy

- number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **82**, 6090-6094.
- Haseltine,C.A. & Kowalczykowski,S.C. (2002) A distinctive single-strand DNA-binding protein from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol.Microbiol.*, **43**, 1505-1515.
- Holm,L. & Sander,C. (1995) Dali - A Network Tool for Protein-Structure Comparison. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 478-480.
- Honda,Y., Sakai,H., Hiasa,H., Tanaka,K., Komano,T. & Bagdasarian,M. (1991) Functional Division and Reconstruction of A Plasmid Replication Origin - Molecular Dissection of the Oriv of the Broad-Host-Range Plasmid-Rsf1010. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 179-183.
- Honda,Y., Sakai,H., Komano,T. & Bagdasarian,M. (1989) Repb' Is Required in Trans for the 2 Single-Strand Dna Initiation Signals in Oriv of Plasmid Rsf1010. *Gene*, **80**, 155-159.
- Hubscher,U., Maga,G. & Spadari,S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annual Review of Biochemistry*, **71**, 133-163.
- Ilyina,T.V., Gorbalenya,A.E. & Koonin,E.V. (1992) Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase-helicase systems. *J.Mol.Evol.*, **34**, 351-357.
- Ito,N., Nureki,O., Shirouzu,M., Yokoyama,S. & Hanaoka,F. (2003) Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis. *Genes to Cells*, **8**, 913-923.
- Iyer,L.M., Koonin,E.V., Leipe,D.D. & Aravind,L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3875-3896.
- Jancarik,J. & Kim,S.H. (1991) Sparse-Matrix Sampling - A Screening Method for Crystallization of Proteins. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 409-411.
- Johnson,S.K., Bhattacharyya,S. & Griep,M.A. (2000) DnaB helicase stimulates primer synthesis activity on short oligonucleotide templates. *Biochemistry*, **39**, 736-744.
- Jones,J.G., Hackett,N.R., Halladay,J.T., Scothorn,D.J., Yang,C.F., Ng,W.L. & Dassarma,S. (1989) Analysis of Insertion Mutants Reveals 2 New Genes in the Pnrc100 Gas Vesicle Gene-Cluster of *Halobacterium-Halobium*. *Nucleic Acids Research*, **17**, 7785-7793.
- Jones,S., Daley,D.T.A., Luscombe,N.M., Berman,H.M. & Thornton,J.M. (2001) Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Research*, **29**, 943-954.

- Jordan, S.R., Whitcombe, T.V., Berg, J.M. & Pabo, C.O. (1985) Systematic Variation in Dna Length Yields Highly Ordered Repressor-Operator Cocystals. *Science*, **230**, 1383-1385.
- Joyce, C.M. (1997) Choosing the right sugar: How polymerases select a nucleotide substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 1619-1622.
- Kang, D.C., Miyako, K., Kai, Y., Irie, T. & Takeshige, K. (1997) In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 15275-15279.
- Kato, M., Ito, T., Wagner, G. & Ellenberger, T. (2004) A molecular handoff between bacteriophage T7 DNA primase and T7 DNA polymerase initiates DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 30554-30562.
- Kato, M., Ito, T., Wagner, G., Richardson, C.C. & Ellenberger, T. (2003) Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis. *Molecular Cell*, **11**, 1349-1360.
- Keck, J.L., Roche, D.D., Lynch, A.S. & Berger, J.M. (2000a) Structure of the RNA polymerase domain of *E-coli* primase. *Science*, **287**, 2482-2486.
- Keck, J.L., Roche, D.D., Lynch, A.S. & Berger, J.M. (2000b) Structure of the RNA polymerase domain of *E. coli* primase. *Science*, **287**, 2482-2486.
- Keeling, P.J., Klenk, H.P., Singh, R.K., Feeley, O., Schleper, C., Zillig, W., Doolittle, W.F. & Sensen, C.W. (1996) Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid*, **35**, 141-144.
- Keeling, P.J., Klenk, H.P., Singh, R.K., Schenk, M.E., Sensen, C.W., Zillig, W. & Doolittle, W.F. (1998) *Sulfolobus islandicus* plasmids pRN1 and pRN2 share distant but common evolutionary ancestry. *Extremophiles.*, **2**, 391-393.
- Kelman, L.M. & Kelman, Z. (2004) Multiple origins of replication in archaea. *Trends Microbiol.*, **12**, 399-401.
- Kettenberger, H. & Cramer, P. (2006) Fluorescence detection of nucleic acids and proteins in multi-component crystals. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **62**, 146-150.
- Khopde, S., Biswas, E.E. & Biswas, S.B. (2002) Affinity and sequence specificity of DNA binding and site selection for primer synthesis by *Escherichia coli* primase. *Biochemistry*, **41**, 14820-14830.
- Kirk, B.W. & Kuchta, R.D. (1999) Arg304 of human DNA primase is a key contributor to catalysis and NTP binding: Primase and the family X polymerases share significant sequence homology. *Biochemistry*, **38**, 7727-7736.
- Kletzin, A., Lieke, A., Ulrich, T., Charlebois, R.L. & Sensen, C.W. (1999) Molecular analysis of pDL10 from *Acidianus ambivalens* reveals a family of related

- plasmids from extremely thermophilic and acidophilic archaea. *Genetics*, **152**, 1307-1314.
- Kornberg,A. & Baker,T. (1992) *DNA Replication*. W.H. Freeman, New York.
- Kramer,M.G., Khan,S.A. & Espinosa,M. (1997) Plasmid rolling circle replication: Identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement for DNA polymerase I for lagging strand synthesis. *Embo Journal*, **16**, 5784-5795.
- Kuchta,R.D., Mizrahi,V., Benkovic,S.J., Benkovic,P. & Johnson,K.A. (1987) Kinetic Mechanism of Dna-Polymerase-I. *Federation Proceedings*, **46**, 2209.
- Kusakabe,T., Hine,A.V., Hyberts,S.G. & Richardson,C.C. (1999) The Cys(4) zinc finger of bacteriophage T7 primase in sequence-specific single-stranded DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 4295-4300.
- Labib,K. & Diffley,J.F. (2001) Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Current Opinion in Genetics & Development*, **11**, 64-70.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, **227**, 680-&.
- Lao-Sirieix,S.H. & Bell,S.D. (2004) The heterodimeric primase of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* possesses DNA and RNA primase, polymerase and 3'-terminal nucleotidyl transferase activities. *J.Mol.Biol.*, **344**, 1251-1263.
- Lao-Sirieix,S.H., Nookala,R.K., Roversi,P., Bell,S.D. & Pellegrini,L. (2005a) Structure of the heterodimeric core primase. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **12**, 1137-1144.
- Lao-Sirieix,S.H., Pellegrini,L. & Bell,S.D. (2005b) The promiscuous primase. *Trends Genet.*, **21**, 568-572.
- Larson,M.A., Bressani,R., Sayood,K., Corn,J.E., Berger,J.M., Griep,M.A. & Hinrichs,S.H. (2008) Hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* initiates primer synthesis on a limited set of trinucleotides comprised of cytosines and guanines. *Nucleic Acids Res.*
- Laskowski,R.A., Macarthur,M.W., Moss,D.S. & Thornton,J.M. (1993) Procheck - A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 283-291.
- Lee,S.J. & Richardson,C.C. (2002) Interaction of adjacent primase domains within the hexameric gene 4 helicase-primase of bacteriophage T7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 12703-12708.
- Leslie,A.G.W. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **62**, 48-57.

- Li,D.W., Zhao,R., Lilyestrom,W., Gai,D.H., Zhang,R.G., DeCaprio,J.A., Fanning,E., Jochimiak,A., Szakonyi,G. & Chen,X.J.S. (2003) Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*, **423**, 512-518.
- Li,X.Y., Li,J., Harrington,J., Lieber,M.R. & Burgers,P.M.J. (1995) Lagging-Strand Dna-Synthesis at the Eukaryotic Replication Fork Involves Binding and Stimulation of Fen-1 by Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 22109-22112.
- Lipps,G. (2006) Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles*, **10**, 17-28.
- Lipps,G. (2004) The replication protein of the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1. *Biochem.Soc.Trans.*, **32**, 240-244.
- Lipps,G., Ibanez,P., Stroessenreuther,T., Hekimian,K. & Krauss,G. (2001a) The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Research*, **29**, 4973-4982.
- Lipps,G., Rother,S., Hart,C. & Krauss,G. (2003) A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.*, **22**, 2516-2525.
- Lipps,G., Stegert,M. & Krauss,G. (2001b) Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archael plasmid copy control protein. *Nucleic Acids Research*, **29**, 904-913.
- Lipps,G., Weinzierl,A.O., von Scheven,G., Buchen,C. & Cramer,P. (2004) Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **11**, 157-162.
- Liu,L., Komori,K., Ishino,S., Bocquier,A.A., Cann,I.K., Kohda,D. & Ishino,Y. (2001a) The archaeal DNA primase: biochemical characterization of the p41-p46 complex from *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.*, **276**, 45484-45490.
- Liu,L.D., Komori,K., Ishino,S., Bocquier,A.A., Cann,I.K.O., Kohda,D. & Ishino,Y. (2001b) The archaeal DNA primase - Biochemical characterization of the p41-p46 complex from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 45484-45490.
- Lucas,S., Toffin,L., Zivanovic,Y., Charlier,D., Moussard,H., Forterre,P., Prieur,D. & Erauso,G. (2002) Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5528-5536.
- Lundgren,M., Andersson,A., Chen,L.M., Nilsson,P. & Bernander,R. (2004) Three replication origins in *Sulfolobus* species: Synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 7046-7051.
- Lysetska,M., Zettl,H., Oka,I., Lipps,G., Krauss,G. & Krausch,G. (2005) Site-specific binding of the 9.5 kilodalton DNA-binding protein ORF80 visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, **6**, 1252-1257.
- Markham,N.R. & Zuker,M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Research*, **33**, W577-W581.
- Marsin,S. & Forterre,P. (1999) The active site of the rolling circle replication protein Rep75 is involved in site-specific nuclease, ligase and nucleotidyl transferase activities. *Mol.Microbiol.*, **33**, 537-545.
- Mastrangelo,I.A., Hough,P.V.C., Wall,J.S., Dodson,M., Dean,F.B. & Hurwitz,J. (1989) Atp-Dependent Assembly of Double Hexamers of Sv40 T-Antigen at the Viral Origin of Dna-Replication. *Nature*, **338**, 658-662.
- Matsui,E., Nishio,M., Yokoyama,H., Harata,K., Darnis,S. & Matsui,I. (2003) Distinct domain functions regulating de novo DNA synthesis of thermostable DNA primase from hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*, **42**, 14968-14976.
- Matsunaga,F., Norais,C., Forterre,P. & Myllykallio,H. (2003) Identification of short 'eukaryotic' Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *Embo Reports*, **4**, 154-158.
- Mendelman,L.V. & Richardson,C.C. (1991) Requirements for primer synthesis by bacteriophage T7 63-kDa gene 4 protein. Roles of template sequence and T7 56-kDa gene 4 protein. *J.Biol.Chem.*, **266**, 23240-23250.
- Metzger,W., Schickor,P., Meier,T., Werel,W. & Heumann,H. (1993) Nucleation of Rna Chain Formation by *Escherichia-Coli* Dna-Dependent Rna-Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, **232**, 35-49.
- Moldovan,G.L., Pfander,B. & Jentsch,S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, **129**, 665-679.
- Murshudov,G.N., Vagin,A.A. & Dodson,E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **53**, 240-255.
- Napoli,A., Valenti,A., Salerno,V., Nadal,M., Garnier,F., Rossi,M. & Ciaramella,M. (2005) Functional interaction of reverse gyrase with single-strand binding protein of the archaeon *Sulfolobus*. *Nucleic Acids Research*, **33**, 564-576.
- Navaza,J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **57**, 1367-1372.
- Oakley,A.J., Loscha,K.V., Schaeffer,P.M., Liepinsh,E., Pintacuda,G., Wilce,M.C.J., Otting,G. & Dixon,N.E. (2005) Crystal and solution structures of the helicase-binding domain of *Escherichia coli* primase. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 11495-11504.

- Pan,H. & Wigley,D.B. (2000) Structure of the zinc-binding domain of *Bacillus stearothermophilus* DNA primase. *Structure*, **8**, 231-239.
- Peng,X., Holz,I., Zillig,W., Garrett,R.A. & She,Q. (2000) Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J.Mol.Biol.*, **303**, 449-454.
- Pettersen,E.F., Goddard,T.D., Huang,C.C., Couch,G.S., Greenblatt,D.M., Meng,E.C. & Ferrin,T.E. (2004) UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, **25**, 1605-1612.
- Pfeifer,G.P., Steigerwald,S.D., Mueller,P.R., Wold,B. & Riggs,A.D. (1989) Genomic Sequencing and Methylation Analysis by Ligation Mediated Pcr. *Science*, **246**, 810-813.
- Pisani,F.M., Demartino,C. & Rossi,M. (1992) A Dna-Polymerase from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Shows Sequence Similarity to Family B-Dna Polymerases. *Nucleic Acids Research*, **20**, 2711-2716.
- Prato,S., Cannio,R., Klenk,H.P., Contursi,P., Rossi,M. & Bartolucci,S. (2006) pIT3, a cryptic plasmid isolated from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* IT3. *Plasmid*, **56**, 35-45.
- Prato,S., Vitale,R.M., Contursi,P., Lipps,G., Saviano,M., Rossi,M. & Bartolucci,S. (2008) Molecular modeling and functional characterization of the monomeric primase-polymerase domain from the *Sulfolobus solfataricus* plasmid pIT3. *FEBS J.*
- Purschke,W.G. & Schafer,G. (2001) Independent replication of the plasmids pRN1 and pRN2 in the archaeon *Sulfolobus islandicus*. *Fems Microbiology Letters*, **200**, 97-102.
- Ramadan,K., Maga,G., Shevelev,I.V., Villani,G., Blanco,L. & Hubscher,U. (2003) Human DNA polymerase lambda possesses terminal deoxyribonucleotidyl transferase activity and can elongate RNA primers: Implications for novel functions. *Journal of Molecular Biology*, **328**, 63-72.
- Ramadan,K., Shevelev,I.V., Maga,G. & Hubscher,U. (2004) De novo DNA synthesis by human DNA polymerase lambda, DNA polymerase mu and terminal deoxyribonucleotidyl transferase. *Journal of Molecular Biology*, **339**, 395-404.
- Ramirez-Aguilar,K.A. & Kuchta,R.D. (2004) Herpes simplex virus-1 primase: a polymerase with extraordinarily low fidelity. *Biochemistry*, **43**, 9084-9091.
- Ramirez-Aguilar,K.A., Low-Nam,N.A. & Kuchta,R.D. (2002) Key role of template sequence for primer synthesis by the herpes simplex virus 1 helicase-primase. *Biochemistry*, **41**, 14569-14579.
- Richard,D.J., Bell,S.D. & White,M.F. (2004) Physical and functional interaction of the archaeal single-stranded DNA-binding protein SSB with RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1065-1074.

- Roberts, J.A., Bell, S.D. & White, M.F. (2003) An archaeal XPF repair endonuclease dependent on a heterotrimeric PCNA. *Molecular Microbiology*, **48**, 361-371.
- Robinson, N.P. & Bell, S.D. (2007) Extrachromosomal element capture and the evolution of multiple replication origins in archaeal chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 5806-5811.
- Robinson, N.P., Dionne, I., Lundgren, M., Marsh, V.L., Bernander, R. & Bell, S.D. (2004) Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell*, **116**, 25-38.
- Rowen, L. & Kornberg, A. (1978) A ribo-deoxyribonucleotide primer synthesized by primase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 770-774.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
- Scherzinger, E., Bagdasarian, M.M., Scholz, P., Lurz, R., Ruckert, B. & Bagdasarian, M. (1984) Replication of the broad host range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid-encoded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 654-658.
- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R. & Otto, S. (1991) Plasmid Rsf1010 Dna-Replication In vitro Promoted by Purified Rsf1010 Repa, Repb and Repc Proteins. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1203-1211.
- Scherzinger, E., Ziegelin, G., Barcena, M., Carazo, J.M., Lurz, R. & Lanka, E. (1997) The RepA protein of plasmid RSF1010 is a replicative DNA helicase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30228-30236.
- Sheaff, R.J. & Kuchta, R.D. (1993) Mechanism of calf thymus DNA primase: slow initiation, rapid polymerization, and intelligent termination. *Biochemistry*, **32**, 3027-3037.
- Sheaff, R.J. & Kuchta, R.D. (1994) Misincorporation of Nucleotides by Calf Thymus Dna Primase and Elongation of Primers Containing Multiple Noncognate Nucleotides by Dna-Polymerase-Alpha. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 19225-19231.
- Soler, N., Justome, A., Quevillon-Cheruel, S., Lorieux, F., Le Cam, E., Marguet, E. & Forterre, P. (2007) The rolling-circle plasmid pTN1 from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus nautilus*. *Molecular Microbiology*, **66**, 357-370.
- Sousa, R. & Padilla, R. (1995) Mutant T7 Rna-Polymerase As A Dna-Polymerase. *Embo Journal*, **14**, 4609-4621.
- Springgate, C.F. & Loeb, L.A. (1975) Fidelity of Transcription by *Escherichia coli* Ribonucleic-Acid Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, **97**, 577-591.

- Steitz,T.A. (1998) Structural biology - A mechanism for all polymerases. *Nature*, **391**, 231-232.
- Steitz,T.A., Smerdon,S.J., Jager,J. & Joyce,C.M. (1994) A Unified Polymerase Mechanism for Nonhomologous Dna and Rna-Polymerases. *Science*, **266**, 2022-2025.
- Studier,F.W. & Moffatt,B.A. (1986) Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, **189**, 113-130.
- Sun,W. & Godson,G.N. (1996) Interaction of *Escherichia coli* primase with a phage G4ori(c)-E. coli SSB complex. *J.Bacteriol.*, **178**, 6701-6705.
- Sun,W. & Godson,G.N. (1998) Structure of the *Escherichia coli* primase/single-strand DNA-binding protein/phage G4oric complex required for primer RNA synthesis. *J.Mol.Biol.*, **276**, 689-703.
- Sun,W.L. & Godson,G.N. (1993) Binding and Phasing of *Escherichia coli* Single-Stranded Dna-Binding Protein by the Secondary Structure of Phage-G4 Origin of Complementary-Dna Strand Synthesis (G4Oric). *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 8026-8039.
- Swart,J.R. & Griep,M.A. (1995a) Primer synthesis kinetics by *Escherichia coli* primase on single-stranded DNA templates. *Biochemistry*, **34**, 16097-16106.
- Swart,J.R. & Griep,M.A. (1993) Primase from *Escherichia coli* Primes Single-Stranded Templates in the Absence of Single-Stranded Dna-Binding Protein Or Other Auxiliary Proteins - Template Sequence Requirements Based on the Bacteriophage-G4 Complementary Strand Origin and Okazaki Fragment Initiation Sites. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 12970-12976.
- Swart,J.R. & Griep,M.A. (1995b) Primer synthesis kinetics by *Escherichia coli* primase on single-stranded DNA templates. *Biochemistry*, **34**, 16097-16106.
- Tabor,S. & Richardson,C.C. (1981) Template Recognition Sequence for Rna Primer Synthesis by Gene 4 Protein of Bacteriophage-T7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, **78**, 205-209.
- Tornaletti,S. & Pfeifer,G.P. (1995) Uv-Light As A Footprinting Agent - Modulation of Uv-Induced Dna-Damage by Transcription Factors Bound at the Promoters of 3 Human Genes. *Journal of Molecular Biology*, **249**, 714-728.
- Toth,E.A., Li,Y., Sawaya,M.R., Cheng,Y.F. & Ellenberger,T. (2003) The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7. *Molecular Cell*, **12**, 1113-1123.
- Traut,T.W. (1994) Physiological Concentrations of Purines and Pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **140**, 1-22.

- Tseng, T.Y., Frick, D.N. & Richardson, C.C. (2000) Characterization of a novel DNA primase from the *Salmonella typhimurium* bacteriophage SP6. *Biochemistry*, **39**, 1643-1654.
- Tye, B.K. (1999) MCM proteins in DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 649-686.
- von Scheven, G. Charakterisierung der DNA-Bindung des Replikationsproteins ORF904. Diplomarbeit Universität Bayreuth. 2004.
- Warbrick, E. (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays*, **22**, 997-1006.
- Weisshart, K., Friedl, S., Taneja, P., Nasheuer, H.P., Schlott, B., Grosse, F. & Fanning, E. (2004) Partial proteolysis of Simian virus 40 T antigen reveals intramolecular contacts between domains and conformation changes upon hexamer assembly. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 38943-38951.
- Yamaguchi, M., Hendrickson, E.A. & Depamphilis, M.L. (1985) Dna Primase-Dna Polymerase-Alpha from Simian Cells - Sequence Specificity of Initiation Sites on Simian Virus-40 Dna. *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 1170-1183.
- Yeo, H.J., Ziegelin, G., Korolev, S., Calendar, R., Lanka, E. & Waksman, G. (2002) Phage P4 origin-binding domain structure reveals a mechanism for regulation of DNA-binding activity by homo- and heterodimerization of winged helix proteins. *Mol. Microbiol.*, **43**, 855-867.
- Ziegelin, G., Scherzinger, E., Lurz, R. & Lanka, E. (1993) Phage-P4 Alpha-Protein Is Multifunctional with Origin Recognition, Helicase and Primase Activities. *Embo Journal*, **12**, 3703-3708.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3406-3415.



**Tabelle 9-2: Substrate für die terminale Transferase**

Name	Sequenz (5'→3')
Tt_1 (TP42)	TTCTGCACAAAGCGGTTCTGCAGTGCTCCGAGAACGGGTTTCG
Tt_2	GTGCTCGAGTTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTTGCTTCTAAGTACTTCTT

**Tabelle 9-3: Substrate für die Kristallisation**

Name	Sequenz (5'→3')
kri_1	TCTGTGCTT
kri_2	CTTCTTCTGTGCTT
kri_3	TTTCTTCTTCTGTGCTT
kri_4(hyb mit kri_2,3)	AGAAGAAG
kri_5(hyb mit kri_2,3)	AGAAG
kri_6	GCTGTGCACTCTTC
kri_7	CGCGCTGTGCACT
kri_8	CGCGCGCTGTGCACTCT
kri_9	TCTTCTGTGCACTCTTC
kri_10(hyb mit kri_7,8)	AGCGCG
kri_11(hyb mit kri_7,8)	AGCGCGCGCG
kri_12	TTGTGC
kri_13	GTGTGTGTGT
kri_14	GTGTGTGTGTGT
kri_15	GTGTGTGTGTGTGT
kri_16	TGTGTGTGTGT
kri_17	TGTGTGTGTGTGT

**Tabelle 9-4: Substrate für die Analyse der Punktmutanten**

Name	Sequenz (5'→3')
pol_1 (TP42)	TTCTGCACAAAGCGGTTCTGCAGTGCTCCGAGAACGGGTTTCG
pol_2	CGAACCCGTTCTCGGAGCAC
pm_1	TTTTTTTTTGTGCACTTT
pm_2	TTTTTTTTTATGCACTTT
pm_3	TTTTTTTTTCTGCACTTT
pm_4	TTTTTTTTTTTGTGCACTTT
pm_5	TTTTTTTTTGAGCACTTT
pm_6	TTTTTTTTTGCGCACTTT

pm_7	TTTTTTTTGGGCACTTT
pm_8	TTTTTTTTGTACACTTT
pm_9	TTTTTTTTGTCCACTTT
pm_10	TTTTTTTTGTTCACTTT
pm_11	TTTTTTTTGTGTTT
pm_12	TTTTTTTTNNNTTT
pm_13	TTTTTTTTNTGTTT
pm_14	TTTTTTTTNNGTTT
pm_15	TTTTTTTTNTNTTT

**Tabelle 9-5: Primer für die LM-PCR**

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
linkerA	GCGGTGACCCGGGAGATCTGTATTC
linkerB	GAATACAGATC
Lm_1	TCTCTACTTTCCTAACTCTCTG
Lm_2	TTGCGGATACAATT
Lm_3	AAACAGTATTAATAAAGCGTTAATCCTACCT
Lm_4	TTGCGGATACAATTTTGATCCACAA
Lm_5	GGATACAATTTTGATCC
Lm_6	GCTAACACGATAAGGCAAAC
Lm_7	GCGTTAATCCTACCTCCACC
Lm_8	CTGAAGGAAAAGCTAACTCTAACTCAACT
Lm_9	ATGTGAAAAAACAAGAAGAACGGG
Lm_10	TTTTCGATAAGACATTCACG
Lm_11	TATCGTTTTACCTGATGCGTATAC
Lm_12	TGCTAACTATGTTTCCTTTC
Lm_13*	CGACATCTTATGACATCTTACGAC
Lm_14	CCCGGCGTGTGGCCCTAGATCACTT
Lm_15	TCATTATCTCTTCTTAGCTTTTGCTCTC
Lm_16	ATGCCGACTTCTAACAACATCTTAC
Lm_17	ATGGGATCCCATATGAGTGATCTGAAGGA
Lm_18	CTTTCATTTCTATACCCAAACTCTCTG
Lm_19	TGTATGGTCTACCCATTTG
Lm_20	GGTGGAGGTAGGATTAACGCTTTATTAATACTGTTT
Lm_21	TTGTGGATCAAAAATTGTATCCGCAA
Lm_22	AGCTTTTCCTTCAGATCAC
Lm_23	CTAAATAACACGGTGGAGGTAGGATTAACGCTTTATTAATACTGTTTGCC

Lm_24	CGTCACGGCTTTTCAAACAA
Lm_25	CCTGGAATAGCGTAATTATACCCCT
Lm_26	CACTAGTGCCAGAATATCGA
Lm_27	TTAAGCAAAAGCCTGAGCAA
Lm_28	AGGGAAAGATTGTCTAAGAT
Lm_29	CGGGATTGTGAGTTAGCAGA
Lm_30	GTGGCGTTGAATAGTTTTGC
Lm_31	GGCATTGCGGAAACGTTCTTCTGTCC
Lm_32	GTCAAACATAGGGAAAGATTGTCTAAGA
Lm_33	ACAGGAGTTCGTCACGGCTTTTCAAACA
Lm_34	GTTGAGAGTAAGAAACAGAAGCAAA

**Tabelle 9-6: Primer für die Herstellung von *stem-loop* Region und Kontrolle**

Name	Sequenz (5'→ 3')
Stem_1	ATCGCCGCGCCTTCAAGTTTTCAATTTTTTAAATTG
stem_2	ATCGGCGGCCGCTACTATACAAATATTATCACGGG
con_1	TGGAGCTCCAGTGGAATTCCCCATTTCTCTA
con_2	CTGGAGCTCCAGCCAGAATATCGATAACCGA

**Tabelle 9-7: Substrat für die Interaktionsassays**

Name	Sequenz (5'→ 3')
int_1	AATTCTCCCTCTTCTTCTGTGCACTCTTCTTCTCCC

**Tabelle 9-8: Primer für die Klonierung der Deletions- und Punktmutanten**

<b>Name</b>	<b>Sequenz(5'→ 3')</b>	<b>Klonierung von</b>
N40-NcoI	CATGCCATGGGCTCAAGTGAGAGAATTAGATATGC	pET28c-N40-C370-His, pET28c-N40-C526-His
N40_o904_SacII _lang	TCCCCGCGGCGTCAAGTGAGAGAATTAGATATGC	pET28c-strep-N40-904, pET28c-His-strep-N40-904
His_strep_904a	CATCATCATCATCATTGGAGCCACCCGCAGTTC	pET28c-His-strep-N40-904
His_strep_904b	CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAT	pET28c-His-strep-N40-904
NotI-Stop-XhoI- strep	GCGGCCGCTTACTCGAGTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA CCC	pET28c-N753-strep-His, pET28c-N753-C845-strep- His
N753-C845- strep.rev2	CGAACTGCGGGTGGCTCCACCCCCCGTACTTATATTGTTA T	pET28c-N753-C845-strep- His
N753-strep.rev2	CGAACTGCGGGTGGCTCCACCCATCAAACCGCACGTGCTCT T	pET28c-N753-strep-His
His-strep-904a	TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGCATAAAACAAAAGAAG TAA	pET28c-His-strep-904
N371_NdeI	CCCATATGAAAAGGAAAGCACAAAAGAC	pET28c-His-strep-N371
His-strep-N371a	TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGCAAAAGGAAAGCACA AAAAG	pET28c-His-strep-N371
N527-SacII	GGGCCGCGGGCATAACAGTTGAAGATATAG	pET28c-His-strep-N527
orf76His	CCTCGAGCAGGAGTTCGTCACGGCTTTTCAAAC	pET28c-Orf80(76)-His
Y367A.for	TGGAGTGTAGTAAAGAAGGCCTTAGAAGCTTTTCGAGCAC	pET28c-N40-C370- His_Y367A
Y367A.rev	GTGCTCGAAAGCTTCTAAGGCCTTCTTTACTACACTCCA	
Y352A.for	AAAGTGAATACACAGAAAGCTTTTGTATAACTCTTTC	pET28c-N40-C370- His_Y352A
Y352A.rev	GAAAGAGTTATAACAAAAGCTTCTGTGTATTCCACTTT	
W347A.for	GCAAAAGAAAATGAAAAGGCGAATACACAGAAATATTTT	pET28c-N40-C370- His_W347A
W347A.rev	AAAATATTTCTGTGTATTCGCCTTTTCATTTTCTTTTGC	
W314A.for	ATCGATAGGAGTAGAGGGATGCGCATGTTATACTCTAC	pET28c-N40-C370- His_W314A
W314A.rev	GTAGAGTATAACATGCGCATCCCCTCTACTCCTATCGAT	
F260A.for	GACACGGTGGTGGAGGCTGAGGAGTTGCGCAAGGAATTA	pET28c-N40-C370- His_F260A
F260A.rev	TAATTCCTTGCGCAACTCCTCAGCCTCCACCACCGTGTC	
H141A.for	TTATGCACAAACACGGTTGCTGGCGGGATCCACATCTAT	pET28c-N40-C370- His_H141A
H141A.rev	ATAGATGTGGATCCCGCCAGCAACCGTGTGTTGTGCATAA	

Qc_del1_for_ EcoRI	CAAAGGAGTGGTTAGAAGGAACGGTGGTGGGAATTCGAGGA	pET28c-N40-C370- His_Del1
Qc_del1_rev_ EcoRI	TCCTCGAATTCACCCACCGTTCCTTCTAACCACTCCTTTG	

## 9.2. Kristallisation

Alle durchgeführten Screens und die Optimierungsansätze, sowie die Kristalldaten sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 9-9: Kristallisationsscreens**

<b>Protein</b>	<b>Konzentration mg/ml</b>	<b>Zusätze mM</b>	<b>DNA</b>	<b>Screen</b>
N40-C370	25	/	kri_1	Nextal Classics
	25	/	kri_1	Hampton Index
	40	/	kri_1	Nextal Classics
	50	/	kri_1	Nextal Classics
	50	/	kri_1	Hampton Index
	50	/	kri_1	Matrix   PEG-Ion
	60	/	kri_1	Hampton Index
	60	10 ATP	kri_1	Hampton Index
	60	10 ATP, 10 dGTP, 1 MgCl <sub>2</sub>	kri_1	Hampton Index
	50	10 ATP, 1,25 MgCl <sub>2</sub> , 0,16 ZnCl <sub>2</sub>	kri_3	Hampton Index
	50	"	kri_3	Nextal Classics
	50	"	kri_3	Matrix   PEG-Ion
	60	"	kri_3	Hampton Index
	60	"	kri_3	Nextal Classics
	60	"	kri_3	Matrix   PEG-Ion
	N40-C526	20	"	kri_3
20		"	kri_3	Nextal Classics
20		"	kri_3	Matrix   PEG-Ion
30		"	kri_3	Hampton Index
30		"	kri_3	Nextal Classics
30		"	kri_3	Matrix   PEG-Ion
N40-C370	60	10 ATP	kri_6	Nextal Classics
	60	10 ATP	kri_6	Hampton Index
	60	10 ATP	kri_6	JBS HTS I
	60	10 ATP	kri_6	JBS HTS II
	60	10 ATP	kri_6	Matrix   PEG-Ion
	60	10 ATP	kri_7	Nextal Classics
	60	10 ATP	kri_7	Hampton Index
	60	10 ATP	kri_7	JBS HTS I
	60	10 ATP	kri_7	JBS HTS II
	60	10 ATP	kri_8	Nextal Classics
<b>Protein</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Zusätze</b>	<b>DNA</b>	<b>Screen</b>

	<b>mg/ml</b>	<b>mM</b>		
N40-C370	60	10 ATP	kri_8	Hampton Index
	60	10 ATP	kri_8	JBS HTS I
	60	10 ATP	kri_8	JBS HTS II
	60	10 ATP	kri_9	Nextal Classics
	60	10 ATP	kri_9	Hampton Index
	60	10 ATP	kri_9	JBS HTS I
	60	10 ATP	kri_9	JBS HTS II
	60	10 ATP	kri_8/kri_11	Nextal Classics
	60	10 ATP	kri_8/kri_10	Nextal Classics
	60	10 ATP	kri_9/kri_10	Nextal Classics
	60	10 ATP	kri_9/kri_10	Hampton Index
	100	10 ATP	kri_9	Nextal Classics
	70	10 ATP	kri_13	MPD Suite
	70	10 ATP	kri_13	Natrix   PEG-Ion
	70	10 ATP	kri_13	PEGs Suite
	70	10 ATP	kri_14	MPD Suite
	70	10 ATP	kri_14	Natrix   PEG-Ion
	70	10 ATP	kri_14	PEGs Suite
	70	10 ATP	kri_15	MPD Suite
	70	10 ATP	kri_15	Natrix   PEG-Ion
	70	10 ATP	kri_15	PEGs Suite
	70	10 ATP	kri_16	MPD Suite
	70	10 ATP	kri_16	Natrix   PEG-Ion
	70	10 ATP	kri_16	PEGs Suite
	70	10 ATP	kri_17	MPD Suite
	70	10 ATP	kri_17	Natrix   PEG-Ion
	70	10 ATP	kri_17	PEGs Suite

**Tabelle 9-10: Optimierungsansätze mit N40-C470 (60 mg/ml)**

DNA	Screen	Bedingung
kri_1	NC	0,1 M HEPES pH 7.5; 1,4 M Na-Citrat
kri_1	HI	2,1 M Malat, pH 7.0
kri_1	HI	0,02 M MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M HEPES pH 7.5 ; 22 % Polyacrylsäure
kri_3	HI	0,1 M HEPES pH 7.5 ; 0,5 M Mg- Formiat
kri_3	HI	0,1 M Tris pH 8.5; 0,3 M Mg-Formiat
kri_3	Natrix	0,1 M KCl ; 0,01 M MgCl <sub>2</sub> ; 0,05 M Tris pH 8.5 ; 30 % PEG 400
kri_9	NC	0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100 mM Tris pH 8.5; 30 % PEG 4000
kri_9	JBS-HTS I	100 mM Tris pH 8.5; 800 mM LiCl ; 32 % PEG 4000

**Tabelle 9-11: Kristalldaten des Kristalls von N40-C370.****X-ray diffraction data**

Space group	C2
Cell constants (Å)	
<i>a</i>	125.718
<i>b</i>	46.556
<i>c</i>	77.993
β	124.612
Resolution (Å)*	60-1.85 (1.92-1.85)
Rsym (%)†	9.1 (64.5)
<I/σI>‡	7.7 (1.3)
No. observations	537575
No. unique observations	30362
Completeness (%)	95 (78)

\* Highest resolution of data set with highest resolution bin in parentheses.

†  $R_{sym} = \sum h \sum i | \langle I_h \rangle - I_i(h) | / \sum h \sum i I_i(h)$ , where  $I_i(h)$  is the mean intensity of the  $N$  reflection.

‡ Defined as Mean (I) / sd; § R-factor =  $\sum h |F_o - F_c| / \sum h |F_o|$ .

**Refinement statistics**

Resolution (Å)	50-1.85
R-factor§	0.2
$R_{free}$ ¶	0.25
R.m.s.d. # bond lengths (Å)	0.017
R.m.s.d. bond angles (Å)	0.968
Overall B-factor (Å <sup>2</sup> )	26.27
φψ angle distribution**	
in core region	260 (91.2)
in allowed region	25 (8.8)
in disallowed region	0 (0)

## Number of atoms

protein	2617
ions	6
solvent	176

---

¶  $R_{\text{free}}$  is calculated from 5% of the data which were omitted during the course of the refinement.

#R.m.s.d. is the root mean square deviation from ideal geometry.

\*\* As defined by PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), the percentage distribution is given in parentheses.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde von Februar 2004 bis Juli 2008 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter Leitung von PD Dr. Georg Lipps angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die das interessante Thema, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Krauss für die Möglichkeit, die Arbeiten an seinem Lehrstuhl durchzuführen und für die Unterstützung.

Ich möchte außerdem Prof. Patrick Cramer danken, für die Möglichkeit einen Teil der Arbeiten in seinem Labor durchführen zu können. Dazu möchte ich mich noch herzlich bei Claudia Buchen und Dr. Alessandro Vannini für die nette und geduldige Betreuung und Hilfe bedanken und danke Alessandro außerdem für die Lösung der Strukturen und generell seinen Einsatz und Enthusiasmus für das Projekt.

Meiner Laborkollegin Silvia danke ich für ihre vielfältige Hilfe und Unterstützung, ihre guten Ideen und die gute Zusammenarbeit. Den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Irina, Dong, Kristina, Linda und Martin danke ich für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung.

Außerdem möchte ich Vera Kitowski für die Hilfe bei der Herstellung und Untersuchung der Punktmutanten danken.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, 14.10.2008